

# **MTA Doktora pályázat**

## **Jelátviteli zavaroktól az onkometabolizmusig – daganatsejtek bionergetikai alkalmazkodása**

**Sebestyén Anna**

Budapest

2020



## TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
<b>Tartalomjegyzék</b>	3-7
<b>I. Bevezetés</b>	9-
<b><i>I. 1. Transzformáló növekedési faktor béta (TGF<math>\beta</math>) és Notch érzékenység változások daganatbiológiai szerepe, példák a szabályozási zavarok megjelenésére</i></b>	10-
I.1.1 A transzformáló növekedési faktor-béta (TGF $\beta$ )	10-
I.1.1.1. TGF $\beta$ termelése, aktivitása és jelátviteli mechanizmusai	10-
I.1.1.2 A TGF $\beta$ tumorpromoter és -szuppresszor hatásainak kettőssége	12-
I.1.1.3. TGF $\beta$ érzékenység elvesztése, TGF $\beta$ -mediált változások a daganatokban	
I.1.1.4. TGF $\beta$ -útvonal mint daganatterápiás target, potenciális kezelési lehetőségek, biomarkerek	15-
I.1.2 Notch jelátviteli útvonal aktivitás/működés változásainak daganatbiológiai jelentősége	15-
I.1.2.1. Notch szignál	
I.1.2.2. Notch útvonalat érintő mutációk, Notch szignál aktivitás változások daganatokban	16-
I.1.2.3. Notch útvonal mint target a daganatok kezelésében	16-
<b><i>I.2. mTOR jelátviteli hálózati csomópont aktivitás változásának daganatbiológiai szerepe</i></b>	18-
I.2.1 mTOR komplexek szerepe a jelátviteli hálózatban	18-
I.2.2 mTOR szabályozási zavarok jelentősége humán betegségekből	23-
I.2.3. mTOR hiperaktivitása daganatokban	26-
I.2.4. mTOR mint target a daganatok kezelésében	30-
<b><i>I.3. Anyagcsereváltozások tumorbiológiai jelentősége</i></b>	32-
I.3.1. Bioenergetikai változások a daganatsejtekben	33-
I.3.2. Metabolikus alkalmazkodási stratégiák, metabolikus fenotípusok a daganatokban	33-
I.3.3. Metabolit, onkometabolit koncentráció változások a daganatokban	37-
I.3.4. Tumorsejtek anyagcseréjét befolyásoló hatóanyagok, metabolikus off-target hatások	39-
<b><i>I.4. In vitro és in vivo kísérletek eredményeinek értelmezése in situ patológiai vizsgálatok segítségével</i></b>	41-
I.4.1. Rezisztencia és mTOR vizsgálatokba bevont lymphoid daganatok	41-
I.4.1.1. Leukémiák (CLL és ALL)	41-
I.4.1.2. Lymphomák	42-
I.4.2. mTOR és metabolikus vizsgálatokba bevont szolid daganattípusok	43-
I.4.2.1. Különböző carcinomák (colon-, tüdő- és emlőcarcinomák)	43-
I.4.2.2. Egyéb ritka daganatok (gliomák, lymphangioliomyomatosis és rhabdomyosarcomák)	44-

I.4.3. <i>In vitro, in vivo</i> modellek korlátai és legújabb lehetőségei a daganatbiológiai kutatásokban	45-
<b>II. Célkitűzések</b>	47-
<b>III. Módszerek</b>	49-
<b>III.1. <i>In vitro</i> sejtvonalak, izolált primer sejtek tenyésztése és kezelése</b>	49-
<b>III.2. 3D spheroid tenyészetek, 3D biotinta, 3D bionyomtatás</b>	51-
<b>III.3. Primer leukémia sejtek, normál perifériás mononukleáris sejtek izolálása</b>	53-
<b>III.4. <i>In vitro</i> vizsgálatokat követő proliferáció, apoptózis mérések, áramlási citometriai vizsgálatok</b>	53-
<b>III.5. Foszfataz aktivitás mérés</b>	54-
<b>III.6. Molekuláris vizsgálatok</b>	54-
III.6.1. Notch inhibitor rezisztens HL sejtvonalak onkogén mutációinak, illetve más sejtek IDH mutációjának vizsgálata	55-
III.6.2. PCR vizsgálatok (mRNS, miRNS expresszió analízis)	56-
III.6.3. Smad4 siRNS csendesítés	56-
III.6.4. RICTOR amplifikáció vizsgálatok	56-
<b>III.7. Expresszió vizsgálatok fehérje szinten</b>	57-
III.7.1. TGF $\beta$ , p-4EBP1 illetve p-S6 ELISA mérések	57-
III.7.2. Western blot és WES Simple analízis	57-
III.7.3. <i>In situ</i> fehérje expressziós vizsgálatok (IHC, immuncitokémia, fluoreszcens immuncitokémia és Duolink módszerekkel)	58-
III.7.3.1. Immuncitokémia, fluoreszcens immuncitokémia, Duolink	58-
III.7.3.2. Immunhisztokémia	58-
<b>III.8. Metabolikus folyamatok karakterizálásához beállított és felhasznált analitikai és biokémiai mérések</b>	61-
III.8.1. Tumorsejtek szubsztrát oxidációjának vizsgálata radiaktívan jelölt acetát és glükóz segítségével	61-
III.8.2. Intracelluláris metabolitok mennyiségi meghatározása LC-MS-sel	61-
III.8.3. Energiaszubsztrát hasznosítás vizsgálatok LC-MS-sel <sup>13</sup> C stabil izotóp jelölést követően	61-
III.8.4. Oxigénfogyasztás és extracelluláris acidifikáció mérése Seahorse technikával	62-
<b>III.9. <i>In vivo</i> xenograft modellek</b>	62-

<b>III.10. A vizsgálatokban érintett betegcsoportok és jellemzőik, etikai engedélyek</b>	63-
<b>III.11. Alkalmazott statisztikai módszerek</b>	66-
<b>IV. Eredmények</b>	67-
<b>IV.1 Apoptózis indukció, proliferáció gátlás lymphomákban, izolált humán leukémia sejtekben és más daganatokban</b>	67-
IV.1.1. Nem onkológiai hatású készítmények apoptózis indukáló hatásai lymphomákban (mevastatin, mycophenolsav)	67-
IV. 1.1.1. A mevastatin myeloma sejtek növekedését gátló hatásainak igazolása	68-
IV. 1.1.2. Immunszuppresszív kezelések pro- és anti-tumorális hatásainak vizsgálata	69-
IV. 1.1.3. Poszttranszplantációs vesedaganatok mTOR aktivitásának jellemzése, tacrolimus kezelés hatása	71-
IV.1.2 Notch receptor útvonal szabályozási zavarai, Notch szignál gátlók hatásainak, szenzitizálásának vizsgálata leukémiákban, lymphomákban	74-
IV.1.2.1. Keringő humán B-CLL sejtek Notch receptor és ligand expressziójának jellemzése; Notch ligand, illetve Notch szignál inhibitor kezelések hatásának vizsgálata humán lymphoma, leukémia sejtekben, azok TGF $\beta$ vagy kemoterápiás szer indukált hatásaiban	75-
IV.1.2.2. Konstitutív NOTCH1 aktivitás humán Hodgkin lymphoma sejtekben, NOTCH inhibitor és rapamycin kezelés pro-apoptotikus hatásainak vizsgálata	77-
IV.1.3. TGF $\beta$ indukált apoptózis lymphoma sejt vonalakban	79-
IV.1.4. Rapamycin TGF $\beta$ szenzitizáló hatása lymphomákban	83-
<b>IV.2. mTOR aktivitás változások és azok jelentősége lymphomákban és leukémiákban</b>	85-
IV.2.1. Lymphoma sejt vonalak mTOR hiperaktivitása, a mitózisban jellegzetes mTORC1 aktivitás függő fokozott riboszómális S6 fehérje foszforiláció	86-
IV.2.2. Humán Hodgkin és Non-Hodgkin lymphomák mTOR aktivitásának jellemzése, annak prognosztikai összefüggései	88-
IV.2.2.1. Hodgkin lymphomák	89-
IV. 2.2.2. Diffúz nagy B sejt es lymphomák	91-
IV.2.3. Gyermekkorai akut lymphoid leukémia sejtek jellemző mTOR hiperaktivitása és ennek lehetséges epigenetikai regulációs háttere, jelentősége	93-
<b>IV.3. mTOR aktivitás változások és azok jelentősége bizonyos szolid daganatokban, carcinomákban</b>	97-
IV.3.1 Humán coloncarcinoma esetek mTORC1 és C2 komplex-függő mTOR hiperaktivitása és ennek prognosztikai jelentősége	98-
IV.3.2 Bizonyos tüdődaganatok mTOR aktivitásának vizsgálata	102-

IV.3.2.1. Az mTORC1/2 komplex fehérjék mennyisége primer és agyi áttétet adó tüdő adenocarcinomákban <i>in situ</i>	103-
IV.3.2.2. Az mTORC2 aktivitás marker H-score értékelés és a Rictor amplifikáció összefüggésének vizsgálata kissejtes tüődaganatokban	104-
IV.3.2.3. Az mTORC1 és C2 komplexek <i>in situ</i> vizsgálata humán lymphangioliomyomatosisban	106-
<b><i>IV.4. Tumorok mTOR hiperaktivitása és annak bioenergetikai szabályozásban játszott szerepe</i></b>	108-
IV.4.1. Szubsztráthasznosítási, bioenergetikai útvonal különbségek jellemzése	109-
IV.4.2. mTOR aktivitás függő onkometabolit termelés vizsgálata	111-
IV.4.3. IDH mutáns és vad típusú glioma sejtvonalak metabolikus jellemzése, a glioma sejtek gamma-amino-vajsav (GABA) oxidációs képessége	113-
<b><i>IV.5. Metabolikus plaszticitás és az mTOR hiperaktivitás</i></b>	116-
IV.5.1. A metabolikus plaszticitás mint potenciális target bizonyos szolid daganatok daganatok kezelésében	117-
IV.5.1.1. Humán gliomák metabolikus plaszticitása mint potenciális target	117-
IV.5.1.2. Gyermekekori rhabdomyosarcomák mTOR hiperaktivitása és metabolikus jellegzetességei	122-
IV.5.1.3. Humán emlőcarcinomák metabolikus plaszticitása mint potenciális target	125-
IV.5.2. A metabolikus targetek felhasználásának lehetőségei: rapamycin+doxycycline kezelések daganatnövekedést gátló hatása <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i>	131-
<b><i>IV.6. Modellrendszerek metabolikus állapotot befolyásoló hatásának szerepe daganatbiológiai kísérletekben</i></b>	132-
IV.6.1. 3D Bionyomtási laboregység létrehozása, a technológia beállítása, humán emlőcarcinoma biotinták létrehozása és 3D „szövetek” nyomtatása, xenotranszplantálása	132-
IV.6.2. 2D, 3D spheroid, illetve 3D bionyomtatott szövetek, különböző xenograftok növekedésének és egyes metabolikus tulajdonságainak jellemzése	133-
<b>V. Megbeszélés</b>	135-
<b><i>V.1. Nem onkoterápiás kezelések daganat ellenes off-target hatásai</i></b>	135-
<b><i>V.2. Daganatok mTOR hiperaktivitása mint potenciális terápiás target, szenzitizáló hatások</i></b>	136-
<b><i>V. 3. Az mTOR hiperaktivitás és a metabolikus szabályozási változások, a metabolikus plaszticitás összefüggései</i></b>	139-
<b><i>V.4. A metabolikus plaszticitás mint terápiás target (mTOR inhibitorok és metabolikus inhibitor kombinációs kezelések várható jelentősége)</i></b>	143-

<b>VI. A tézisek, eredeti megfigyelések összefoglalása és az eredmények újdonságtartalmának, hasznosításának bemutatása</b>	145-
<b>VII. A tézisek rövid összefoglalása</b>	151-
<b>VIII. Köszönetnyilvánítás</b>	153-
<b>IX. Irodalomjegyzék</b>	154-
<b>X. Értekezés alapját képező közlemények</b>	183-
<b>XI. További fontos saját közlemények</b>	185-
<b>XI. Tudománymetriai adatok (MTMT szerint jóváhagyott)</b>	189-
<b>XII. Rövidítésjegyzék</b>	191-

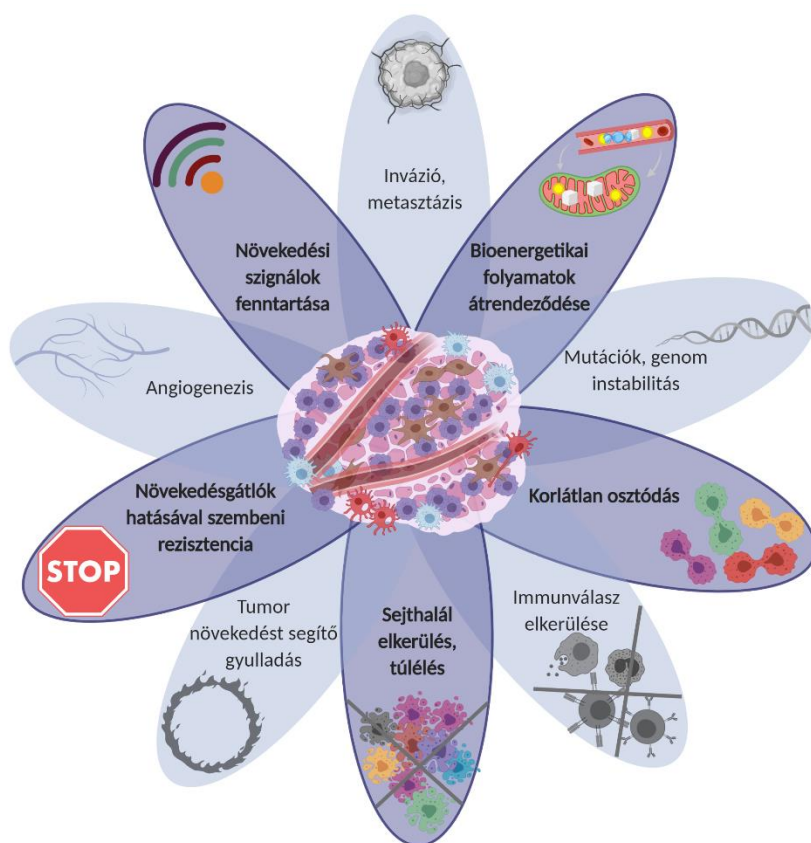




## I. Bevezetés

A 2000-es évek elején a daganatos sejtek, a daganatszövet sokféleségéről és különböző tulajdonságairól, változásairól szerzett ismeretek mennyiségi növekedése, majd ezek áttekintése segítette a daganatok általános jellegzetességeinek átgondolását. Hanahan és Weinberg rendszerezte és foglalta össze elsőként a daganatok legfontosabb tulajdonságait, majd 2011-ben további négygel egészítette ki ezeket (1,2). A tumorokra általánosan jellemző olyan szabályozási zavarok megjelenése, amelyek a tumortömeg növekedését és a tumorsejtek terjedését támogatják, ezek: a korlátlan osztódás, az apoptózis gátlása, a sejtnövekedést gátló hatások elkerülése, a proliferáció fenntartása, a tumorszövet érésképződésének, inváziós és áttétképző képességének fokozódása, a genom instabilitása, a mutációk és a tumort támogató gyulladások megjelenése, a tumorelles immunválasz elkerülése, továbbá az energetikai folyamatok átprogramozása (3,4). (1. ábra)

PhD fokozatszerzésemet követően az előbbi tényezők közül többel is foglalkozhattam. Az **apoptózis-rezisztencia** egyes tényezőivel, a negatív regulációs tényezők közül a transzformáló növekedési faktor béta (**TGF $\beta$** ) **szabályozó hatásának elvesztésével**, annak összetett daganatbiológiai szerepével kezdtem posztdoktori kutatómunkámat. Ezzel összefüggésben a **jelátviteli hálózat zavarai**val foglalkozva számos daganattípus **emelkedett mTOR aktivitását** írtuk le, majd az mTOR bioenergetikai szabályozásban mára már közismertté váló daganatbiológiai szerepével kapcsolatban kezdtük el egyes **daganatok metabolikus változásainak, in situ metabolikus heterogenitásának** jellemzését és jelentőségének vizsgálatát.



**1. ábra A daganatos sejtek jellegzetes változásainak összefoglaló ábrája** (Hanahan és Weinberg munkája alapján (1,2)). Az ábrán színes szimbólumokkal, illetve sötétebb színű szirmokkal emeltem ki azokat a területeket, amelyeket saját munkámban érintettem.

A daganatokban gyakori jelenség, hogy a pozitív hatású szabályozó útvonalak állandó növekedési stimulust biztosítanak – nem kapcsolnak le, a negatív tényezők hatásai pedig már nem érvényesülnek. Míg utóbbiak a mikrokörnyezet sejtjei esetében továbbra is kifejtik hatásukat, addig a daganatsejtek a gátlókkal szembeni rezisztencia és a növekedési faktorok folyamatos hatásának kialakulása miatt szelektív növekedési előnyre tehetnek szert a szervezetben. A változások háttérében komplex szabályozási zavarok, genetikai hibák, onkogén aktiváció, tumor gén inaktiváció, jelátviteli útvonal aktivitás változások jelennek meg. Normális esetben a jelátviteli hálózat a sejt mikrokörnyezetétől és aktuális állapotától függően befolyásolja a sejtek differenciációját, proliferációját, túlélését vagy egyéb sejt-, szervspecifikus funkcióit (5,6). Amennyiben ebben a hálózatban gének funkcióinak kiesése vagy egyes útvonalak szabályozatlan, fokozott aktivitása jelenik meg, akkor a sejtek növekedésének szabályozása felborul. A hálózatban számos citokin, növekedési faktor útvonal és egyéb a sejt aktuális állapotát monitorozó jelpálya áll kapcsolatban egymással. A daganatok többségében a növekedési faktor vagy citokin útvonalak hiperaktivitása, a növekedés negatív szabályozóinak elvesztése előbbieket miatt igen fontos tényező (7,8).

### ***1.1. Transzformáló növekedési faktor béta (TGF $\beta$ ) és Notch érzékenység változások daganatbiológiai szerepe, példák a szabályozási zavarok megjelenésére***

A sejt és szöveti fejlődés fontos tényezője számos olyan növekedési faktor, amelyek megváltozó hatásainak a daganatok növekedés szabályozási zavaraiiban szerepe lehet.

#### ***1.1.1 A transzformáló növekedési faktor-béta (TGF $\beta$ )***

A TGF $\beta$  jelátviteli útvonal működés zavara számos betegség, köztük a daganatok kialakulásának és növekedésének is egyik fontos tényezője, tumortípustól függően (9,10). A TGF $\beta$  hatásai elengedhetetlenek pl. a sebgyógyulásban, míg túltermelődése számos fibrózissal járó betegségben jól ismert (pl. HCV, alkoholos vagy autoimmun májbetegségek, antibiotikum, diabetes indukált vesebetegségek, szisztémás szklerózis stb.).

A TGF $\beta$  funkciói közül több befolyásolja a daganatok növekedését és mikrokörnyezetét (11). A daganatsejtek elveszíthetik TGF $\beta$  érzékenységüket, így a tumorsejtek TGF $\beta$  mellett is proliferálnak; korlátlan replikációs potenciál alakulhat ki (hTERT – telomeráz reguláció elmarad) (12, 13); az autokrin vagy parakrin TGF $\beta$  pedig segítheti az epithelialis daganatsejtek mesenchymális átalakulását (epithelialis mesenchymalis transzformáció – EMT), az inváziót, metasztázist, az angiogenezist és az immunszuppresszív hatású mikrokörnyezet kialakítását is (14,15,16). Előbbieknek megfelelően korábban a TGF $\beta$  -val szembeni érzékenyítés, mára azonban a TGF $\beta$  tumorpromoter szerepének gátlása került előtérbe (17,18).

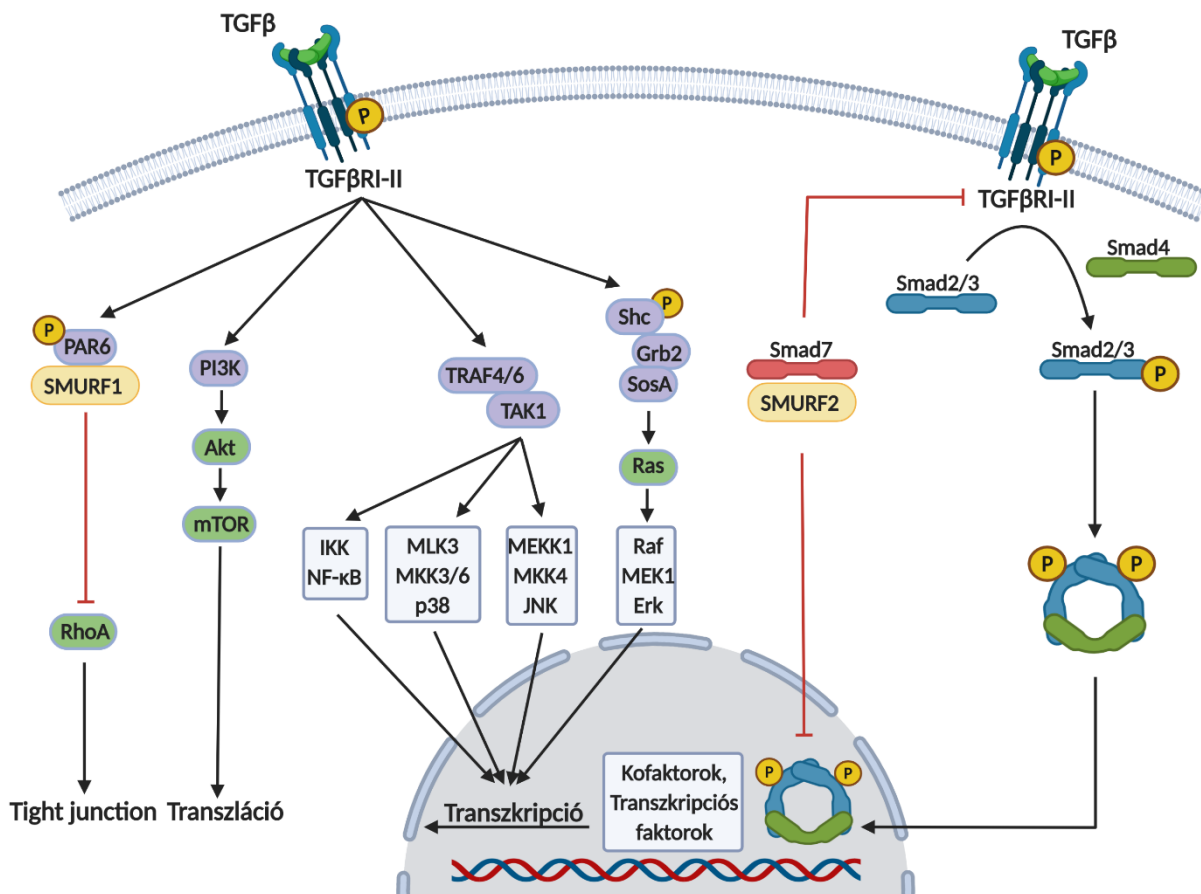
##### ***1.1.1.1. TGF $\beta$ termelése, aktivitása és jelátviteli mechanizmusai***

A három TGF ligand fehérje (TGF $\beta$ 1-3), prekursor formában termelődik, az extracelluláris térben inaktív formában található, aktiválása többféle módon is történhet (enzimatis hasítás, fehérje kölcsönhatások, mikrokörnyezeti hatások révén – proteázok,

katepszin, transzglutamináz, latencia-asszociált fehérje deglikolizáció, reaktív oxigén gyök (ROS), savas mikrokörnyezet, integrinkötés). Szerkezetük nagyon hasonló, biológiai hatásuk azonban nem azonos (19). Aktivált formáik transzmembrán receptorkomplexhez kötődnek (I-s típusú receptorok – TGF $\beta$ RI/ALK5/ALK1 – és II-es típusú szerin/treonin-kináz receptorok dimere), amelyben a II-es típusú receptor autofoszforilációját az I-es típusú receptor foszforilációja, aktivációja követi. Ezután a TGF $\beta$ RI foszforilálja a Smad2 és Smad3 molekulákat, amelyek heterodimer vagy trimer formában a Smad4 (ún. Co-Smad) molekulával komplexet alkotnak és a sejtmagba jutnak, ahol transzkripciós faktorokhoz és különböző target gének promoter régióihoz kötődve befolyásolják célgénjeik expresszióját (20). A Smad-transzkripciós faktor komplexek működését a komplexhez kötődő egyéb kofaktorok és korepresszorok is módosítják (korepresszorok pl. Evi-1, Ski, SnoN). A Smad molekulacsalád egyik tagja a Smad7 inhibitor Smad fehérje is, amely többféle módon gátolhatja a Smad szignál működését: a. a receptorhoz kapcsolódó Smadok szerkezetéhez hasonló alegységeivel kötődik a TGF $\beta$ RI-hoz, így kompetitíven gátolja a receptorasszociált Smadok aktivációját; b. foszfatázok aktiválásával előidézi a receptor aktiválódást követő foszforiláció csendesítését; c. SMURF2 ubiquitin ligáz hatását elősegítve a receptor komplex lizoszómális lebontását fokozhatja (21). A TGF $\beta$  sokrétű szabályozó funkcióit a TGF $\beta$  reszponzív gének sokféleségének példái is jól mutatják: a. korai válasz gének – *TIEG*, *FOS*, *JUN*, *JUNB*, *MYC* (22); b. sejtciklus-szabályozó gének – *CDC25A*, *CDKN1A*, *CDKN2B* (23, 24); c. extracelluláris márixfehérje gének – *COL1A1*, *COL1A2*, *SERPINE*, *TIMP* (25); d. adhéziós molekulák – integrinek; e. növekedési faktorok – IGF1, IL6, PDGFB stb. (26,27,28)

Az elsődleges TGF $\beta$ -Smad szignál hatásainak szabályozása több szinten történhet: a ligandkötés megakadályozásával (számos mátrixfehérje – Bambi, noggin, decorin, chordin – vagy a szolubilis receptor kompetitív hatásai), intracelluláris jelátviteli gátlókkal (pl. FKBP12, TRAP1, TRIP1), negatív feedback hatásokkal (jelátviteli elemek expresszió változásai, fehérje turnover, lebomlás – ubiquitin proteaszóma rendszer és szumoiláció, egyéb útvonalak foszfatázai és kinázai) (29,30). Előbbieken túl, mára azok az alternatív jelátviteli folyamatok is feltártak, amelyben a jelátviteli hálózat más útvonalainak elemei is részt vesznek.

Néhány alternatív nem-Smad útvonal lehetőséget mutat be a 2. ábra, pl. Rho, p38 MAPK, JNK, Erk vagy akár Ras és az mTOR útvonalakon keresztül (11). A TGF $\beta$ RI fokozhatja az ShcA tirozin foszforilációját, ami a Grb2-SosA komplex kialakulását követően aktiválja a Ras/Raf/MAPK útvonalat, vagy a TRAF4/6 poli-ubiquitinilációját fokozva a TAK1 aktiváción keresztül elősegítheti az MKK4 vagy a p38 MAPK, illetve JNK aktivitását (31, 32, 33). További lehetőség a PAR6 fehérje foszforilációját követő SMURF1-mediált RhoA ubiquitiniláció, aminek a sejtkapcsolatok fellazításában lehet szerepe (34). Végül a TGF $\beta$ R komplexek a PI3K p85 szabályozóegység kötésén keresztül a PI3K/Akt útvonal aktivitását is fokozhatják (35). A különböző alternatív és az elsődleges útvonalak az adott sejt típusának, aktuális állapotának megfelelően állnak rendelkezésre vagy lehetnek blokkoltak is a jelátviteli hálózatban. Utóbbi ad magyarázatot arra, hogy a TGF $\beta$  hatásai jelentősen függenek a sejt típusától és aktuális állapotától, így a hipotetikus jelátviteli lehetőségeket mindig ennek függvényében kell értelmezni az adott helyzetekben (2. ábra) (36).



**2. ábra TGFβ jelátviteli mechanizmusok sematikus összefoglalása.** Az ábrán az elsődleges Smad útvonal (jobb oldal) és az alternatív útvonalak is fel lettek tüntetve, további magyarázatok a szövegben.

### *1.1.1.2 A TGFβ tumorpromoter és -szuppresszor hatásainak kettőssége*

A '80-as, '90-es években a TGFβ sejtszintű, leginkább növekedésgátló hatásait, elsősorban tumorszuppresszor funkcióit jellemezték, majd egyre több adat bizonyította a növekedési faktor komplex, Janus-arcú szerepét. Jól megfigyelhető ez a kettősség, a tumorszuppresszor és promoter szerepváltás az epitheliális daganatok kialakulása, progressziója során, ami a tumor heterogenitásának és a tumorszövet evolúciójának is következménye. A normál hámsejtek proliferációját gátló hatás a daganatos sejtek többségében nem érvényesül, így a termelődő vagy a mikrokoznyezetben aktiválódó TGFβ a lokális környezetben szelektív előnyt nyújt a daganatsejtek növekedéséhez. A TGFβ a nem daganatos epithel sejtek proliferációját blokkolja, akár apoptózist is indukál, míg a daganatsejtek (a TGFβ rezisztenciamechanizmusok, és más onkogén proliferációs stimulusok miatt) egyre nagyobb számban keletkeznek elfoglalva helyüket. Az előbbiekkal párhuzamosan a TGFβ további, mikrokoznyezeti elemekre gyakorolt hatásaival segíti a tumorangiogenezist, a mátrix átépülését, a migrációt, gátolja a tumorelles immunválaszt biztosítva a növekedés és a metasztázisképzés feltételeit (3. ábra) (37,38).

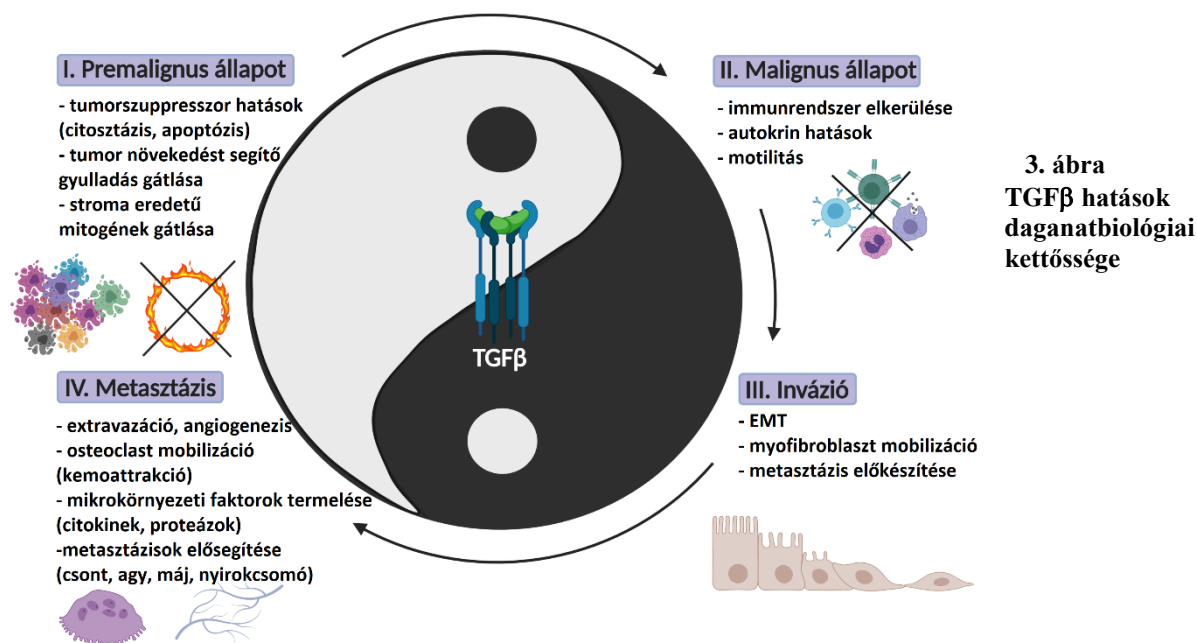
A TGFβ sejtciklust, proliferációt gátló hatásának fő eleme a különböző ciklinfüggő kinázokat gátló fehérjék expressziójának fokozása (pl. p15, p21, p19 vagy p27), a c-myc, E2F1

vagy akár egyes ciklinek mint a CDC25A expresszió gátlása (20). A sejtciklus gátlással összefüggésben apoptózis indukció is felléphet. Bizonyos apoptózis, illetve anti-apoptózis gének esetében a TGF $\beta$ /Smad útvonal közvetlen génregulációs hatásait írták le egyes daganatsejtekben (GAAD45, BIM, BIK, DAPK, FAS, BCL-XL), de ismert a ROS képződésben (39), a humán telomer rövidülésben szerepet játszó hTERT expressziót biztosító vagy autofágiát indukáló szerepe is (40,41).

A tumor növekedés későbbi fázisában ugyan a TGF $\beta$  daganatsejt növekedés gátló hatásai már nem érvényesülnek, de a mesenhymális átalakulásban (EMT) a TGF $\beta$  hatására bekövetkező E-cadherin, vimentin, N-cadherin expresszió változások csökkentik a sejtek adhézióját, polaritását. A sejt-sejt kapcsolatok gyengülnek, motilitási, inváziós, végül metasztatikus tulajdonságok erősödnek, illetve ezzel párhuzamosan egyéb a környezeti vagy más hatásokkal szembeni rezisztencia mechanizmusok aktiválódnak a tumorsejtekben (42,43,44). Ezekben a folyamatokban jelentős szerepe van a Smad útvonal transzkripciós hatásainak (SNAIL, ZEB, TWIST), de az alternatív útvonal funkciónak is jut szerep. Például az Erk aktivitás változása fontos tényezője a citoskeletális reorganizációnak, míg ezek mellett a TGF $\beta$  szignál aktivitása erősíti a Notch, Wnt és integrin hatásokat is (45).

A metasztázisok kialakulása progresszív, multifaktoriális és dinamikus folyamat, amely a teljes szervezetet érinti; következménye a betegség súlyosbodása, majd a daganatos halálozás (46). A metasztázisok kialakulását nemcsak a daganatos sejtek, de mikrokörnyezetük (gyakorlatilag a teljes szervezet) is befolyásolja, előbbiek komplexitása határozza meg a daganatos őssejtek túlélését a primer daganatban és/vagy előbbiek szóródását követően elakadásukat, megtapadásukat és növekedésük aktiválását a különböző szervekben. A mikrokörnyezetben a TGF $\beta$ -nak számos a tumor növekedését, terjedését elősegítő hatása jól ismert. Ilyenek a mikrokörnyezet nem tumoros sejtjeire gyakorolt hatásai. Szöveti fibroblasztokban pl. számos egyéb kemokin, citokin termelését fokozva átprogramozzák a sejteket olyan faktorok termelésére (VEGF, bFGF), amelyek stimulálják az érképződést, mátrix metalloproteázok (pl. MMP2,9,10) termelését (47). A csontba jutó daganatsejtek esetében a tumorsejt kolonizációját támogatva a TGF $\beta$  megváltoztathatja a csont szerkezetét; az osteoblastok RANKL termelésén keresztül az osteoclastok működését pozitív *feedback* mechanizmuson át segítve (48).

A TGF $\beta$  mára igen jól ismert immunológiai hatásai is nagy jelentőségűek a tumor mikrokörnyezetében. A TGF $\beta$  egyik legfontosabb szerepe az immuntolerancia fenntartása, a gyulladások kezdeti és későbbi folyamatait egyaránt befolyásolva. Immunszuppresszív szerepe érinti a B- és T-sejtek, dendritikus sejtek, makrofágok, NK-sejtek működését, leginkább gátló hatásokkal a különböző sejtípusok esetében. Előbbiek mellett az immunszuppresszív regulátor T-sejtek differenciációját segíti, illetve a citotoxikus T-sejtek perforin, granzymeA/B, Fas ligand és interferon gamma termelését csökkentve is hozzájárul az immunválasz csendesítéséhez a lokális mikrokörnyezetben (49). Alapvetően gátolja az NK-sejtek tumorelles funkcióit, segíti az immun védekezést elkerülő (immunescape) mechanizmusokat. Előbbiek alapján a jelenlegi immun (immunediting) terápiák (anti-PD-L1) mellett felmerül a TGF $\beta$  hatások csendesítésének potenciális lehetősége is egyes daganatok kezelésében (50,51).



3. ábra  
TGFβ hatások  
daganatbiológiai  
kettőssége

### I.1.1.3. TGFβ érzékenység elvesztése, TGFβ-mediált változások a daganatokban

Daganatmegelőző állapotokban bekövetkező TGFβ szabályozó funkciók kiesésekor gyakran megfigyelhetők a TGFβR-ok, illetve a Smad proteinek mutációi, mennyiségi változásai. TGFβRII gén loss-of-heterogeneity (LOH) gyakran jellemzi a tüdő- és a gyomordaganatokat; a génmikroszatellita régióiban különböző mismatch repair mutációkat találtak a vastagbél-, gyomor-, hasnyálmirigy-, nem kissejtes tüdődaganatokban, gliomákban és nőgyógyászati daganatokban. Gyakori a 3-as exon egy régiójának változása, de természetesen egyéb mutációk is előfordulhatnak. A *TGFβRI*-es gén esetében is megfigyeltek deléciókat, mutációkat vagy epigenetikai változásokat pl. emlő-, colon, fejnyak-, gyomor pankréász és prosztatadaganatokban is (52). A jelátvitel központi eleme a Smad4 molekula, nem véletlen, hogy a leggyakrabban ennek a funkcióvesztését vagy expresszió csökkenését okozó változásokat tapasztaltak daganatokban. A Smad4 LOH ~30-60% az emlő-, prosztatata-, neuroblasztoma, méhnyakrák, fejnyaki, tüdő-, colon- és gyomordaganatokban, ~90% pankréász daganatok esetében, ahol a mutációk és deléciók is igen gyakoriak. A pankréász daganatokban figyelték meg legmagasabb százalékban a Smad2 mutációit is, de ezek előfordulhatnak még colon- és ritkábban emlő-, prosztatata- és fejnyakrákban (53,54).

A jelátviteli elemek negatív szabályozóinak expresszióváltozásai, epigenetikai szabályozási zavarai is jellemzik daganatokban a Smad útvonalat. A Smad7 overexpressziója pl. vastagbél-daganatokban, a SMURF overexpressziója pedig myeloma és CLL sejtek esetében is előfordulhat és eredményeként a TGFβR-ok sejtfelszíni mennyiségének csökkenését figyelték meg (55). A tumorok, amelyek az előbbi változások miatt elvesztik TGFβ érzékenységüket, párhuzamosan gyakran jelentős mennyiségű TGFβ-t termelnek, ami a tumor környezetében számos az előző alfejezetben említett tumornövekedését támogató hatásával segíti a daganatsejtek túlélését, migrációját vagy akár metasztázisát is. Nem meglepő, hogy a TGFβ fokozott expressziója és szinte valamennyi esetben összefüggése a rossz prognózissal

emlő-, colon-, nyelőcső-, gyomor-, máj-, tüdő-, prosztata- és pankreász daganatokban is jól ismert (52).

#### ***1.1.1.4. TGF $\beta$ útvonal mint daganatterápiás target, potenciális kezelési lehetőségek, biomarkerek***

A növekedési faktor pleiotróp hatásai miatt a TGF $\beta$  útvonal célzása sokféle nehézségbe ütközhet. Míg a korai terápiás próbálkozások a TGF $\beta$  tumorsejtek proliferációt gátló és apoptózist elősegítő hatásainak fokozását, addig a jelenlegi vizsgálatok a progresszió lelassítása vagy megakadályozása céljából a TGF $\beta$  tumorpromoter hatásainak csökkentését pl. prometasztikus és immunszuppresszív hatásainak gátlását célozzák. A legkülönbözőbb TGF $\beta$  gátló kezelések vannak még mindig vagy inkább újra preklinikai/klinikai fejlesztésben – TGF $\beta$  neutralizáló fehérjék, antitestek, receptor kináz inhibitorok, antisensek közül a legjelentősebb zajló fejlesztéseket egy táblázatban foglaltam össze (1. Táblázat).

**1. Táblázat Legjelentősebb TGF $\beta$  útvonalat célzó készítmények és folyamatban levő vizsgálatok**

név	target	hatóanyag típusa	daganattípus (fázis)
AP12009 (trabedersen)	TGF $\beta$ 2	antisense oligo	astrocytoma, glioblastoma (fázis III)
lucanix			NSCLC (fázis II-IV)
GC-1008 (fresolimumab)	TGF $\beta$ 2/TGF $\beta$ 1	antitest	glioblastoma, emlőrák, NSCLC, veserák melanoma, mesothelioma (fázis I-II)
PF-03446962	TGFR-ALK1		előrehaladott vastagbél-daganat, mesothelioma és egyéb szolid tumorok (fázis I/II)
IMC-TR1	TGF $\beta$ R2		előrehaladott szolid daganatok (fázis I/II)
LY2157299 (galunisertib)	TGF $\beta$ R1	kináz inhibitor	előrehaladott HCC, prosztata, pankreászrák, glioma, emlőrák,
TEW-197			előrehaladott szolid daganatok (fázis I)
Kombinációs lehetőségek: immunterápia – durvalumab, nivolumab (anti-PD1); pomalidomide (immunmoduláns), atezolizumab, ramacimumab (IgG1) radioterápia vagy kemoterápia (temozolomide, carboplatin, gemcitabine, lomustine, paclitaxel, capecitabine) kináz inhibitorok (sorafenib, regorafenib) NSAA (enzalutamide)			

#### ***1.1.2 Notch jelátviteli útvonal aktivitás/működés változásainak daganatbiológiai jelentősége***

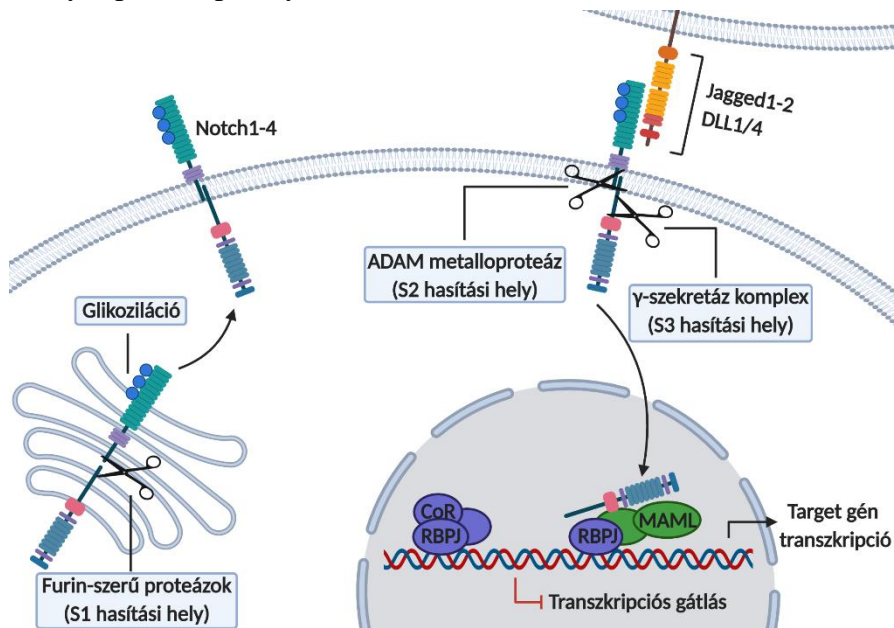
A Notch receptorok nagyon konzervatív szerkezetű sejt-felsőzíni receptorok, amelyek a sejt-sejt kapcsolatokban, sejt-sejt kommunikációban játszott funkcióikon keresztül a differenciációval és ezzel összefüggésben a sejtek túlélésével is kapcsolatban állnak. Az útvonal legjobban jellemzett hatásai még mindig az immunsejtek fejlődésének és működésének szabályozásában ismertek – lymphoid progenitor sejtek, T-B-sejt differenciáció döntésmechanizmusai. Azt, hogy az útvonalaknak az egész szervezet fejlődését érintő szerepe van a különböző *knock out* (KO) egérmodellekben megfigyelhető embrionális és perinatális

letalitás, az öröklött szindrómákban megjelenő szervi rendellenességek (pl. CADASIL és Alagille szindróma), illetve az elmúlt évtized genom szekvenálási eredményei, a feltárt mutációk és azok daganatbiológiai jelentőségei is alátámasztják (56,57,58).

### 1.1.2.1. Notch szignál

A Notch receptorok érése és aktivációja alapvetően három különböző proteáz hasítási folyamattól függ (59). Transzlációt, majd glikozilációt követően a Notch receptor érésében a furinszerű proteázoknak van szerepük, ezek biztosítják a megfelelő heterodimer receptorok (Notch1-4) szerkezetének kialakítását és membrán lokalizációját (60). A ligandok (szomszédos sejtfelszíni Jagged1-2, Delta-like – DLL1,3,4) kötése után előbb az extracelluláris térben hasad a molekula, ez lehetővé teszi, hogy az ADAM metalloproteázok (ADAM10, 17) hasítva a receptort létrehozzák a csonka Notch receptort (NEXT) (61,62). Míg a szomszédos sejtben bekövetkezik a ligand és az extracelluláris receptor rész endocitózisa (ezt E3 ubiquitin ligázok segítik), addig a célsejtben a gamma-szekretáz hasítás segíti (63,64) a Notch intracelluláris domén (NICD) internalizációját, majd nukleáris transzlokációját. Ezután a kötődő transzkripciós faktorokkal (RBPJ/CSL) és koaktivátorokkal (MAML) a DNS-hez kötődve befolyásolja a Notch-responsive gének működését (leginkább enhancerként megszüntetve az promoterek gátlását) (65,66,67). Majd az NICD C-terminális doménjének foszforilációja (PEST domén), ubiquitin ligázok köztük az FBXW7 fehérje kötődése segítheti az NICD lebontását, de másjellelű poszttranszlációs módosítások is befolyásolhatják transzkripciós hatásait, turnover-t (PEST domén metiláció, hidroxiláció, acetiláció) (68,69). (4. ábra)

A Notch receptorok hatásai igen komplexek, pleiotróp hatásaik következményei a célgének sokféleségével magyarázhatók. Összetett szabályozást biztosít az is, hogy az NICD kölcsönhatásait több jelátviteli útvonallal írták le pl.  $\beta$ -catenin (70), Smad-ok (71), HIF1 $\alpha$  (72). Az útvonal sejt típusától függő hatásait alátámasztja, hogy több mint 100 Notch1 targetgén azonosítását követően három különböző típusú sejtben mindössze 5 közös gént találtak, amely egyike a Myc (pl. Nrarp, Hey1, Notch3) (73).



4. ábra Notch szignál sematikus ábrázolása. A magyarázatot ld. a szövegben.



### ***1.1.2.2. Notch útvonalat érintő mutációk, Notch szignál aktivitás változások daganatokban***

A Notch onkogén szerepét elsők között a Notch1 esetében írták le. T-ALL sejtekben azonosították a gén C-terminálisának ritka transzlokációját a T-sejt receptor béta-láncéhoz [t (7;9)]. Ez olyan chimera gént hoz létre, ami hasított Notch1 fehérje expressziót eredményez a sejtekben. Később igazolták, hogy a T-ALL-es betegek közel 50%-át érinti valamilyen Notch1 receptor mutáció vagy funkció-, expresszióváltozás (74,75). Ezek az előbbihez hasonlóan ligand független magas Notch szignál aktivitással járnak (76). Más szolid tumorok esetében is leírtak hasonló genetikai hibákat, amelyek konstitutívan aktivált Notch1 vagy Notch2 szignált biztosítanak a tumorsejteknek (tripla negatív emlődaganatok 77, adenoid cisztikus carcinomák 78). Néhány további hematológiai malignitásban, B-sejtes lymphomákban és B-CLL-ben (79,80,81,82) is leírtak Notch aktivitás változással összefüggő mutációkat. Ezeknek hatásai azonban egyértelmű konstitutív szignál aktivitással nem jellemezhetők, bár emelkedett Notch expresszió jellemezheti a szöveti környezetben megjelenő leukémia, lymphoma sejteket. Mutációk másik típusánál funkcióvesztést igazoltak, amelyek például decoy receptorok megjelenésével párosulhatnak az adott daganatokban (kissejtes tüdő carcinoma (83,84,85), fejnycrák (86), low-grade IDH mutáns gliomák 87). Előbbieknél ritkábban előfordulhatnak a Notch útvonalban más, nem a receptorokat, hanem az útvonalat szabályozó más mutációk is (pl. FBXW7).

A legjobban jellemzett onkogén hatás a Notch szignál tumornövekedést pozitívan befolyásoló hatása ALL sejtekben, ami Myc, NF-kB proto-onkogén overexpressziót és az ezekkel összefüggő változásokat vonja maga után (88-92). Jól ismert Notch-1 targetgén még lymphoid sejtekben a Hes1 transzkripció represszor (93), amelynek a sejtek túlélését támogató hatásokban lehet szerepe. További érdekes daganatbiológiai hatása a Notch szignál aktivációnak, az aktivitás szabályozási zavaraival párhuzamosan megjelenő össejtszerű fenotípusos változás, pl. EMT átalakulások, illetve egyes angiogenikus, differenciációs vagy hormonális hatások (ösztrógen receptor – ER – útvonal 94, 95). Előbbiekén keresztül a Notch hiperaktivitás a daganatsejtek hosszútávú túlélésében, a daganat kiújulásában, illetve a metasztázisok kialakulásában is tumorpromoter tényező, utóbbiak szolid daganatokban, emlőcarcinomák és gliomák esetében merültek fel (96-100).

### ***1.1.2.3. Notch útvonal mint target a daganatok kezelésében***

A Notch útvonal gátlása kismolekulasúlyú inhibitorok, monoklonális ellenanyagok és egyes természetes hatóanyagok alkalmazásával is elérhető (101). A kismolekulasúlyú hatóanyagok között többféle gamma-szekretáz inhibitor fejlesztése zajlott, zajlik: legelterjedtebb kísérleti illetve klinikai gyakorlatban az N-N-difluorofenilacetil-L-alanil-S-fenilglicin-t-butil-észter és származékai, de sok új hatóanyag is rendelkezésre áll (MK-0752, RO4929097, PF-03084014); vannak anti-Dll4 (enoticumab), illetve Notch monoklonális antitestek is. Előbbiek mellett a genistein, kurkumin, quercetin esetében is igazoltak Notch gátló hatásokat, így egyes vizsgálatokban ezeket is alkalmazzák, mint potenciális Notch inhibitor kezelések (102, 103, 104). Bizonyos munkacsoportok olyan preklinikai hatásokról is beszámolnak, amelyben aktivált Notch receptorhoz (NICD) kötődő hatóanyaggal (SAHM1 – módosított MAML1 molekula részlet) a proteaszomális degradáción keresztül gátolják a Notch

szignál hatását (105). Az MK-0752 klinikai toxicitási és egyéb vizsgálatait, valamint a preklinikai kísérletek többségében biztatók, de a mellékhatások miatt a kombinált kezelésekben dóziscsökkentések szükségesek, amik a terápiás eredmények romlását eredményezhetik (101). Ez a gátló docetaxel kombinációban előrehaladott metasztatikus emlődaganatokban mutatott jobb eredményeket a betegekben (106).

## ***1.2. mTOR jelátviteli hálózati csomópont aktivitás változásának daganatbiológiai szerepe***

Az mTOR (mammalian target of rapamycin) szerin-treonin kináz a '70-es években a Húsvét-szigeteken (Rapa Nui) felfedezett talajbaktériumból izolált gombaellenes, majd később immunszuppresszív hatóanyagként vizsgált és alkalmazott gátlószeréről kapta a nevét (107). A kináz a sejten belül két eltérő összetételű, funkciójú és inhibitor érzékenységgű fehérjekomplexben található (108). Ezek a jelátviteli hálózatban csomóponti szabályozóként összegzik a sejt állapotáról és környezetéből érkező információkat (sejtek energia- és tápanyag-ellátottságát, a növekedési és környezeti faktor receptorok útvonalainak aktivitását), majd ezeknek megfelelően szabályozzák a sejtproliferációt, a fehérjeszintézist, a túlélés folyamatait (109). Előbbiekben túl a komplexek szerepe anabolikus, illetve katabolikus folyamatokban, a tápanyagfelhalmozásban, az autofágiában és a sejtanyagcsere egyensúlyának fenntartásában is egyre jobban jellemzett (110).

### ***1.2.1 mTOR komplexek szerepe a jelátviteli hálózatban***

Az mTOR kináz sokoldalú hatásaiban fontos szerepe van a két szerkezeti és targetfehérjében is eltérő komplexnek, az mTORC1 és mTORC2-nek. A jelenleg ismert gátlók segítik az érintett hatások vizsgálatát, de egyelőre olyan gátlószer még nem áll rendelkezésre, amely kizárólag az mTORC2 hatásait befolyásolná. Az mTOR foszfatidil-inozitol-3-kináz kötő fehérje (PIKK molekula családba sorolható) szerkezetének jellegzetességei, a vázfehérjék és a komplexek egyéb elemei is meghatározzák az inhibitorok, illetve a targetfehérjék kötődését. A kinázban, a C-terminális FAT doménhez (FRAP-ATM-TRRAP=FAT-domén) legközelebb a kináz domén (KD-domén), az N-terminális felé ez után az FRB-domén (FKBP-12 kötő régió), majd egy következő FAT domén és végül két alfa hélixből álló HEAT motívum található (Huntington elongációs faktor) (111).

Mindkét mTOR komplex közös eleme az mTOR kináz és az mLST8 fehérje. A C1 és C2 komplexek további elemei azonban különböznek nemcsak számukban, hanem azok Raptor (mTORC1 karakterisztikus eleme) vagy Rictor (mTORC2 karakterisztikus eleme) vázfehérjékkel együtt kialakuló térszerkezetében is (112). A kináz FRB régiójában, illetve a szomszédos FAT domén egyes elemeiben vannak azok a részek, amelyek a mTOR-Raptor és mTOR-Rictor kötések és ezzel a két különböző komplex szerkezetének kialakulásáért felelnek.

Az mTORC1 komplexben a Raptor-mTOR-mLST8 fehérjék kapcsolódása olyan térszerkezetet hoz létre, amelynek következménye pl. az mTORC1 komplex lizoszómális, késői endoszómális lokalizációja (113); illetve olyan szerkezet kialakulása, amelyben az FRB-doménhez, az FKBP-12 fehérjén keresztül a névadó inhibitor molekula – rapamycin (114) –, és az S6 kináz (S6K) vagy más mTORC1 targetfehérje kötni képes (115). Az mTOR

komplexekhez kapcsolódó egyéb kisebb elemek is befolyásolják, elsősorban gátolják, az mTORC1 komplex működését (DEPTOR az FAT doménhez kötődve, míg a PRAS40 a Raptoron keresztül) (116).

Az mTORC2 inhibitor érzékenységevel, funkcióival és lokalizációjával kapcsolatban sok új adat jelent meg az elmúlt években, ezekben még több vitatott pont is van. Egyre többen támasztják azonban alá, hogy ez a komplex is membrán lokalizált helyzetben található és aktiválódik (117). Egyes korai *in situ* IHC vizsgálatok – elképzelhető, hogy aspecifikus immunreakciók miatt – a sejtmagban is megfigyelték a Rictort (118). A legújabb eredmények azonban a sejtmagban nem, csak a plazmamembránban, a mitokondrium membránjában és az endoszómákban igazolták az mTORC2 komplex előfordulását (119). Az mTORC2 komplexben Raptor helyett Rictor vázfehérje található, így a molekulában az FRB régió zártabb szerkezetben helyezkedik el, ezért az FKBP12-rapamycin kötődni és az mTORC2 komplex aktivitást direkt módon gátolni nem képes (120, 121). Az mTORC2 funkciót az mTORC1 komplexéhez hasonlóan gátolja a DEPTOR, további szabályozó funkcióval bír a Rictorhoz az mTORC2 komplex elemeként kötődő mSIN1, illetve a Protor1/2 (122).

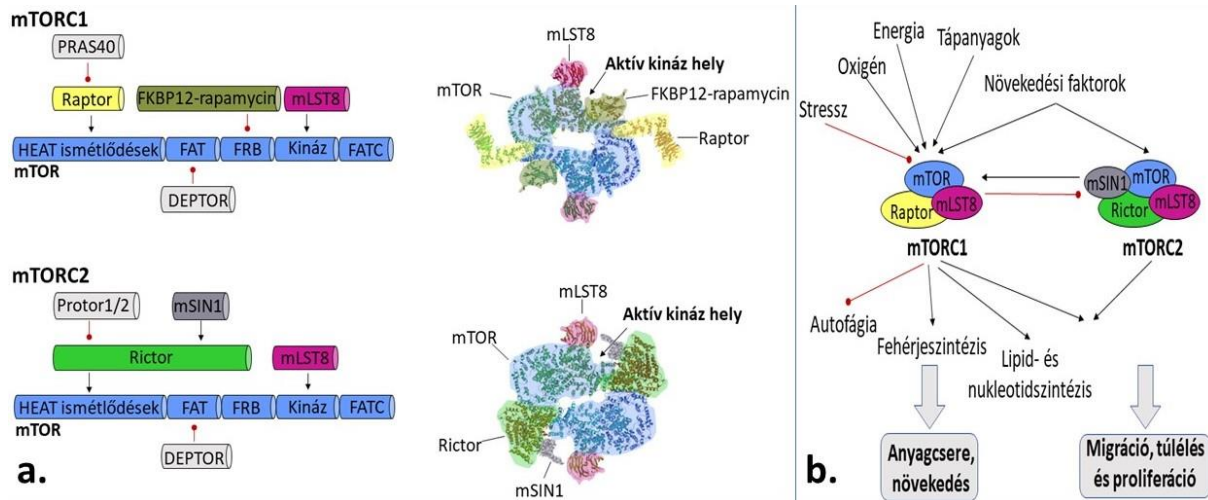
Miután a kétezres évek elején igen korszerű biokémiai, sejtbiológiai és génmanipulációs vizsgálatokkal nemcsak élesztőben, hanem humán vizsgálatokban is alátámasztották a két komplex (123,124,125) előfordulását, újabb és újabb targetfehérjéken keresztül, számos celluláris folyamatban igazolódott a két komplex szerepe (126). Elsők között az S6K1 és 4EBP1 mTORC1 célfehérjéket, illetve az SGK, PKC, illetve az Akt speciális motívumait, mint mTORC2 foszforilációs célpontokat azonosították (127,128,129). Párhuzamosan ezekkel az mTOR komplexek szabályozási folyamatait és az mTOR jelátviteli útvonal negatív/pozitív *feedback* mechanizmusait is jellemezték.

Ismert, hogy a legtöbb növekedési faktor útvonal érintett a két komplex aktivitásának szabályozásában (RTK-RAS-MEK-ERK vagy RTK-PI3K-AKT utak). Igazolva az mTOR komplexek növekedésben játszott precíziós regulátor szerepét – elsősorban a C1 komplex esetében – a glükóz, glutamin, zsírsavak mennyisége, a hipoxia, az energiaellátottság, az aminosavak koncentrációja és egyéb celluláris stresszhatások is befolyásolják (5. ábra) (130,131,132).

Megfelelő tápanyag- és energiaellátottság mellett a Rag heterodimer a lizoszómához horgonyozza az mTORC1 komplexet, így az Rheb GTP-áz fehérje foszforilálhatja és aktiválhatja az mTOR kinázt – amennyiben a növekedési faktor útvonalak biztosítják aktivitásának feltételeit (pl. PI3K/Akt aktiváció, TSC1/TSC2 foszforiláció vagy RAS-mediált ERK, RSK). mTORC1 aktiváció után a targetek közül kitüntetett szerepe van az S6K1 foszforilációnak mint *feedback* mechanizmusnak, ativáció után foszforilálva az IRS1-et, az S6K1 gátolja a PI3K-Akt szignál további hatásait (133,134). Az útvonal aktivitását negatívan szabályozza az ubiquitin proteaszóma rendszer is, az FBXW7 fehérjék mutációja esetében például csökken az mTOR kináz lebontása és fokozott mTOR aktivitás figyelhető meg (135).

Az AMPK mint az energiaellátottság egyik fontos szenzora, az AMP szint emelkedésével párhuzamosan a Raptor foszforilálásával, illetve akár közvetett módon a TSC2-n keresztül is gátolhatja az mTORC1-et (136). A súlyos DNS károsodások is gátat szabhatnak az mTORC1 függő növekedési folyamatoknak, az ATM-p53-mediált AMPK aktiváció előbbi hatásain keresztül (137). Az aminosav szintek csökkenése szenzor mechanizmusaiakon keresztül (ld. később – CASTOR, GATOR, SAMTOR, KICSTOR) szintén gátolhatják a Rag heterodimer közvetett

mTORC1 lizoszómális aktivációt kialakító hatásait, gátolva ezzel az mTORC1-et (138,139). (6. ábra)



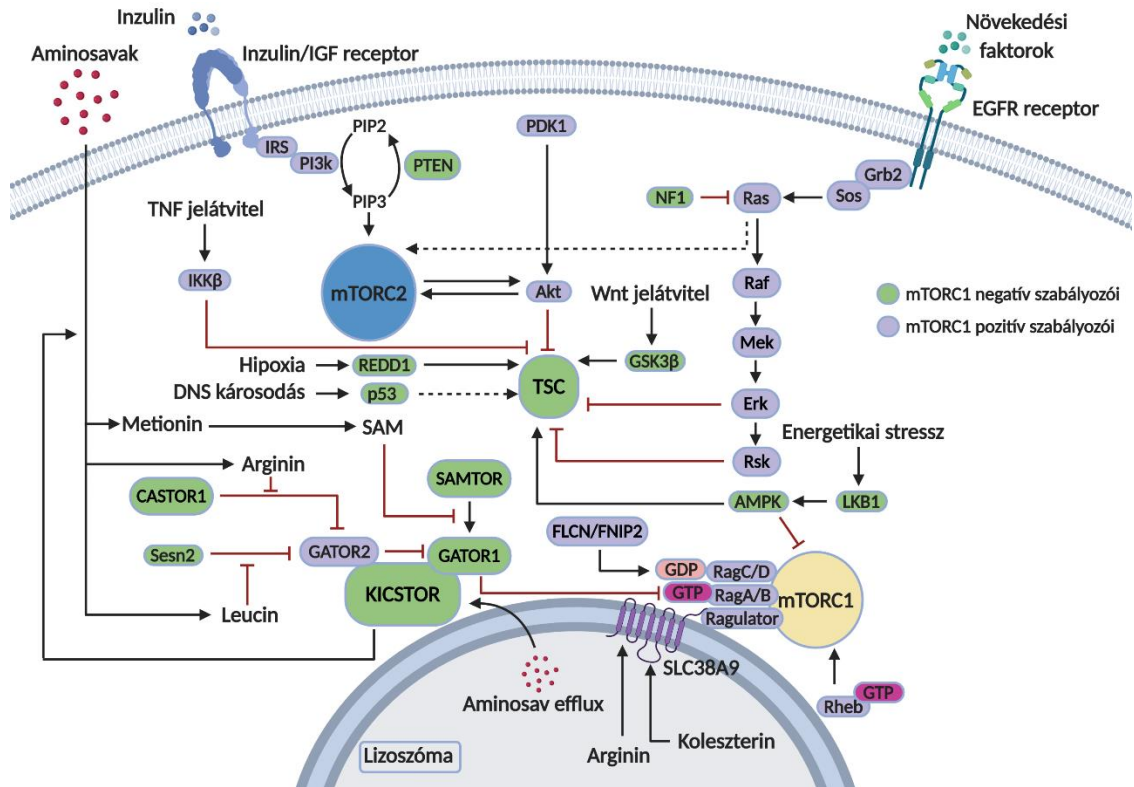
**5. ábra mTOR kináz, mTOR komplexek szerkezete és szabályozó szerepe, illetve jelátviteli hálózati kapcsolatainak vázlata.** A két mTOR komplexet alkotó fehérjék és a röntgen krisztallográfiás eredmények alapján készült vázlatos szerkezete (a.); a két komplex szabályozó funkcióinak összefüggései (b.)

Az mTORC1 komplex célfehérjéi foszforilálásával vesz részt a mRNS transzláció, a fehérjeszintézis, degradáció (protein turnover), a nukleotidszintézis szabályozásában, illetve nagyon fontos eleme a katabolikus és anabolikus folyamatok kontrolljának is. A transzlációs folyamatokban az S6K-t követő riboszómális S6 fehérje foszforiláció, illetve az RNS polimeráz I-III aktiváció és a PDCD4 inaktiválása nemcsak a riboszómák szerkezetére kifejtett hatások révén segítik a transzláció folyamatait (140). A 4EBP1 fehérje foszforilációja, a PDCD4-hez hasonlóan különböző elongációs iniciációs faktorok (pl. eIF4E, illetve eIF4B) felszabadításával segíti a transzlációt (141).

Az mTORC1 komplex az MTHFD2 (metil-tetra-hidro-folát-reduktáz) ATF4 függő expresszió fokozásán át központi szabályozója a tetrahydrofolát ciklusnak, a purin szintézisnek, de a komplex pirimidin szintézis szabályozó hatásai más úton is érintik a nukleinsav anyagcserét (CAD – carbamil-foszfotranszferáz – aktivációja) (142). A fehérjék turnoverében a fehérjeszintézisben jellemzett mTOR funkciók mellett, az autofágia vagy a lizoszómák, proteaszómák kialakulását gátló hatások is (pl. ULK1, ATG1, UVRAG, TFEB vagy Erk5) nagy jelentőségűek (143). Az mTORC1 eddigi hatásait kiegészíti a lipidanyagcsere szabályozásában fontos SREBP több szintű aktiválása (S6K foszforiláció vagy lipin hatásainak gátlása), illetve a glükóz, glutamin és aminosav anyagcserét érintő regulációs szerep is, amelyek az mTORC1 komplex anyagcsereszabályozó hatásaival függnek össze. Az SREBP1-2 és PPAR $\gamma$  aktivitás fokozódás a zsírsav és lipid szintetikus folyamatokat segíti, alacsony szterol szint fokozza pl. az endoplazmatikus reikulumból a sejtmagba jutó SREBP mennyiségét, így a lipidek, koleszterol szintézisét (144,145).

Párhuzamosan a komplex *de novo* purin és pirimidin anyagcserét támogató hatásai a DNS szintézis, a sejtosztódás növekedés igényeit szolgálják az osztódó sejtekben. A felépítő folyamatokhoz, a makromolekulák szintéziséhez azonban energiára és szénforrásokra is szüksége van a magas mTOR aktivitású, növekvő sejteknek. Nem véletlen, hogy ennek érdekében az mTOR aktivitás glikolízis támogató hatásai is megjelenhetnek a növekedés bioenergetikai egyensúlyának

megteremtésében. Az mTORC1 serkenti a glükózfelvételhez szükséges transzporterek expresszióját, a glikolitikus enzimek termelését, és egyes mitokondriális bioenergetikai folyamatokat, pl. a mitokondriumok keletkezését is (146).

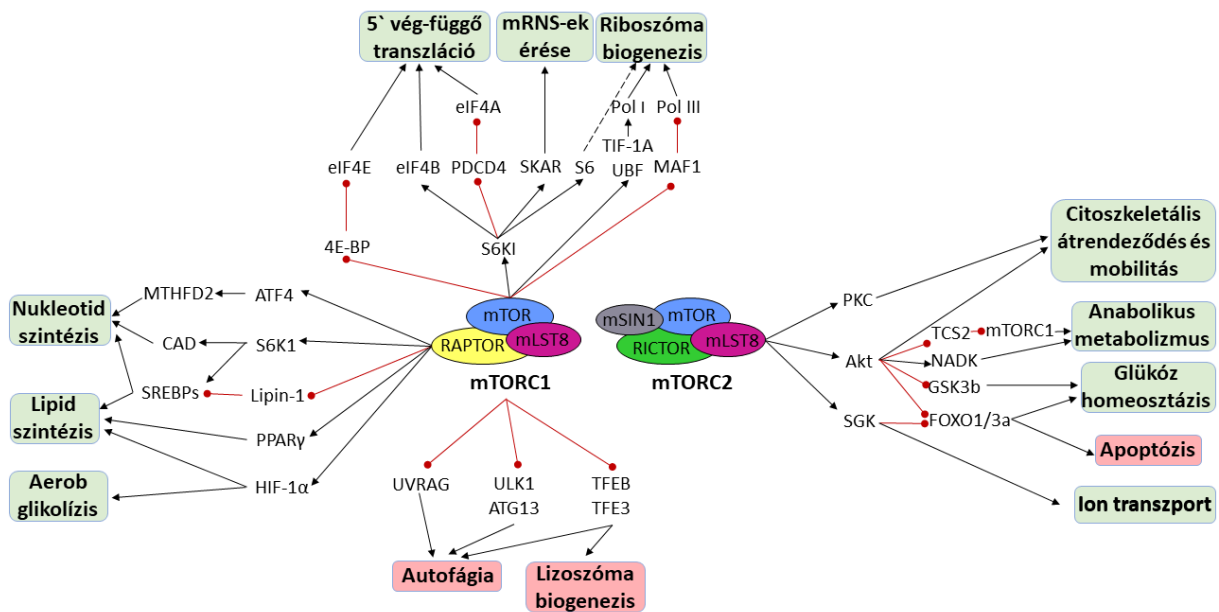


**6. ábra mTOR kináz, mTOR komplexek jelátviteli hálózati kapcsolatainak vázlata.** az mTOR kináz aktivitás szabályozása a jelátviteli hálózatban, a részletesebb magyarázat a szövegben található.

Ebben a szabályozásban kitüntetett szerepe van a HIF1 $\alpha$  függő glikolitikus enzim expresszió változásoknak (GLUT1, MCT1, HK2, LDHA), de a pentóz-foszfát út enzimeinek expressziójában is fontos szerepe van az mTORC1-nek (147,148). Előbbi esetében nem szabad elfeledkezni a hipoxia és a ROS mTOR aktivitást érintő, elvileg negatív hatásairól sem. Ezek esetében a szöveti szintű mikrokörnyezeti különbségek, a sejt állapotától függően pillanatok alatt változtathatják a lokális mTORC1 aktivitást a szövetben. Így tudják fentartani a pseudohipoxia daganatnövekedést segítő hatásait, míg párhuzamosan kompenzálhatják a ROS-szint emelkedés káros celluláris hatásait is (pl. HIF1 $\alpha$  és SOD szabályozás különbségei és dinamikus változása, illetve ezek potenciális szerepe a terápiarezisztenciában egy jelenleg is intenzíven kutatott terület) (149).

Az mTORC1 komplex lizoszómális lokalizációjának kitüntetett szerepe van, a sejtek növekedésekor a fehérjék felépítéséhez szükséges aminosavak elérhetőségének monitorozásában; pl. a leucin, arginin, s-adenozil-metionin lizoszómális aminosav szintek függvényében a CASTOR/SAMTOR/GATOR/KICSTOR és Rag GTP-ázok ki- illetve

bekapcsolják az mTORC1 aktivitást a sejt aktuális állapotának megfelelően. Ez biztosítja, hogy csak megfelelő aminosav szintek mellett növekedhetnek a sejtek (150,151). Ismert az is, hogy az mTOR komplexeknek szabályozó hatása a glutamin anyagcserében és ebben az mTORC1 komplex mellett. A legújabb adatok szerint az mTORC2 is részt vesz. Az mTORC1 komplex aktivitása direkt módon fokozza a GLS fehérje termelését, és megakadályozza a sirtuin-4 GDH enzim gátló hatását is. Míg mTORC2 aktivitás függően az Akt megakadályozza a FOXO3/FOXO4 nukleáris transzlokációját és ezzel a glutamin-szintáz szint emelkedését (152). Az mTOR függő szabályozó hatások és glutaminolízis tumor növekedést támogató szerepe közötti összefüggés számos daganat esetében merül fel. A terápiarezisztenciában, illetve az mTOR gátlókkal szembeni rezisztenciamechanizmusok kialakulásában azonban a két komplex különböző hatásainak és ezen keresztül a két komplex mennyiségi viszonyainak pontos szerepe további vizsgálatokat igényel (7. ábra) (153).



**7. ábra mTOR komplexek különböző target fehérjéi és a szabályozott biológiai folyamatok, aktivitások.** Adott komplexek targetfehérjéi, a serkentő (fekete nyíl), illetve gátló (piros pontvégű vonal) foszforiláció, valamint az érintett, szabályozott folyamatok lettek feltüntetve az ábrán.

A RICTOR, mTOR illetve mLST8 kiütésekor megfigyelték a sejtvez átépülésének rendellenességeit is, ennek következményeként károsodott kemotaxist és migrációt, a daganatok csökkent metasztázis képzését írták le. Mivel ezekben az esetekben a jellegzetes mTORC1 funkciók nem sérültek, azonosításra kerülhettek egyes mTORC2-mediált szabályozó folyamatok, köztük a PDK1, az SGK1 és az Akt kináz bizonyos foszforilációi (154), amelyekkel összefüggnek az mTORC2 komplex jellegzetes szabályozó hatásai: a sejtvez átépülés irányítása; mTORC2 függő autofágia gátló hatások; valamint az mTORC2 glükóz anyagcserében és oxidációban felmerülő szerepe.

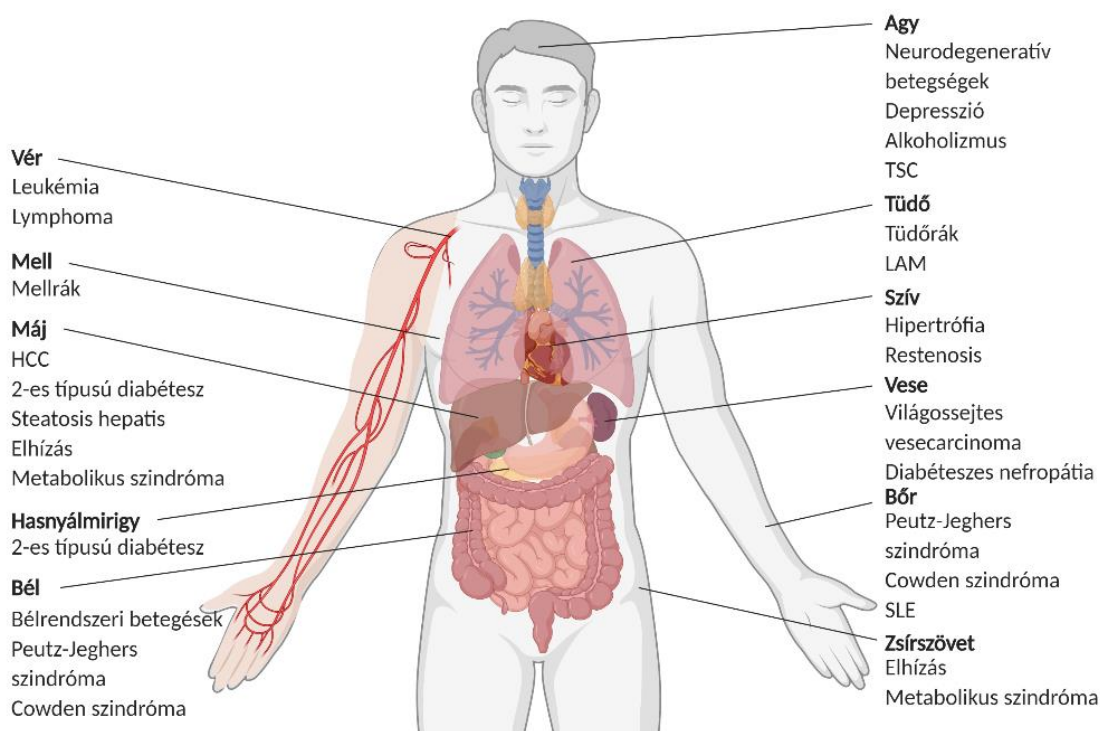
Az utóbbi két hatás még kevésbé jellemzett és az is fontos, hogy ezek többsége az Akt sokoldalú hatásai között is szerepel (a migráció, az apoptózis, a túlélés és az autofágia szabályozása), bár a különböző mértékű és lokalizációjú Akt foszforilációknak specifikus

funkciói is lehetnek. Bizonyos esetekben elengedhetetlen a Ser473-as Akt foszforiláció, amelyre csak az mTORC2 képes (155). Az mTORC2 hatásai közé tartozik még a stresszfaktorok esetében a FOXO1/3a transzkripciós faktorok foszforilációja a NAD kináz aktivitás szabályozásában vagy a két mTOR komplex közötti szabályozó mechanizmusok visszacsatolása is (TSC2 gátlása, mSIN1 foszforiláció) (156), ezek pontosabb megismerése szintén segíthet az mTOR inhibitor rezisztencia mechanizmusok feltárásában a jövőben.

### *1.2.2 mTOR szabályozási zavarok jelentősége humán betegségekben*

Az egyik fontos jellemzője az mTOR útvonalnak, hogy hasonló (konzervatív) valamennyi eukarióta sejtben élesztőtől emlősökig. A bioenergetikai különbségekhez nemcsak a sejteknek, hanem a magasabb rendűek esetében a szerveknek, sőt az egész szervezetnek alkalmazkodnia kell, így az mTOR aktivitás jól szabályozott szerepének fiziológiai jelentősége nem meglepő. A daganatokban megfigyelt kóros mTOR hiperaktivitáson túl számos betegség kialakulásában, progressziójában írták le az mTOR aktivitás zavarát az elmúlt két évtizedben. Ugyan munkámban elsősorban a malignitások mTOR hiperaktivitásával, ezek metabolikus jelentőségével foglalkoztam, az mTOR szabályozási zavarok életmóddal vagy az öregedési folyamatokkal összefüggő változásainak, szerepének áttekintése is segíti a komplex szabályozás daganatbiológiai jelentőségének megértését (8. ábra).

Az mTOR aktivitás bioenergetikai szerepe a szervezet anabolikus és katabolikus egyensúlyának biztosításában, adott szövetekben a funkcióktól és az aktuális állapottól is függ. A hipotalamusz arcuate nucleus funkciózavara és az mTOR aktivitás változás szerepe az **elhízás** hátterében jól ismert; az éhségérzetet magas tápanyag- és hormonkoncentráció (leptin, inzulin) mellett az emelkedett mTORC1 aktivitás csökkenti (157). Elhízáskor, az elérhető tápanyagbőség azonban folyamatosan magas mTORC1 aktivitást okoz, ami sejtípustól függő változásokat indít el a sejtekben.



**8. ábra mTOR aktivitás zavarok szerepe ismert a legkülönbözőbb szerveket érintő megbetegedésekben.** Az ábrán a különböző szerveket, szervrendszereket érintő mTOR aktivitás zavarokkal összefüggő néhány ismert betegséget (amelyekben az mTOR aktivitás mint potenciális target is szerepet játszhat) soroltam fel

Ennek egyik következménye az inzulin független mTORC1 aktivitás emelkedés következtében kialakuló S6K1-n keresztüli negatív visszacsatolás, ami az IRS1 gátlását, az Akt függő folyamatok kiesését okozva szerv specifikusan segíti a **II-es típusú diabetes** kialakulását (158): a. az éhségérzet csökkenés elmarad, így folyamatos táplálékfelvétel inger jellemző a hipotalamuszban, b. a zsírtömeg emelkedésével a szabad zsírsavak szintje nő, c. az izomszövetekben fokozódik a fehérjék lebontása, a glikogénszintézis és szisztémás inzulinrezisztencia alakul ki, d. mTORC1 aktivitás következményeként hiperlipidémia jellemző a májban, és az inzulin rezisztencia következtében fokozott glükoneogenezis és hiperglikémia jön létre, e. az inzulinigényt a hasnyálmirigy sejtek nem képesek kiszolgálni, az első fázisban még fokozódó inzulintermelés után a sejtek kimerülnek; inzulin hiányában az Akt szignál a sejtek túlélését támogató mechanizmusait sem biztosítja, a sejtek elpusztulnak, végül már nem termelődhet inzulin; kialakul a II-es típusú diabetes. A zsírszövet mennyiségének emelkedése fontos rizikófaktor a II-es típusú diabetes kialakulásában. A magas tápanyag-, inzulin- és gyulladásos citokin koncentráció fokozza az mTORC1 aktivitását és közvetlenül is hozzájárul a zsírszövet képződéséhez.

Az anyagcsere és az inzulinszignál szabályozásán keresztül az mTOR-nak szerepe van **kardiovaszkuláris** folyamatokban is. Diabetesben és elhízaskor a magas glükózsint, így kialakuló állandóan magas mTOR aktivitás fokozza az angiotenzin II termelést, az erek simaizomsejt proliferációját, ami az **atherosclerosis** és a **magasvérnyomás** kialakulását is elősegíti. A megjelenő inzulinrezisztencia tovább emeli mTORC1 aktivitást, az a szívizomsejtek növekedését serkentve **kardiális hipertrófiához** vezet (159,160). Nem véletlen,



hogy a kalóriamegvonás jótékony hatásai mellett az előbbi folyamatok időben megkezdett diétával még visszafordíthatók lehetnek.

Az előbbiekhöz képest az mTOR komplexek **immunregulátor** szerepe a veleszületett és a szerzett immunválaszokban talán még komplexebb. Az mTOR aktivitás változása a legkülönbözőbb immunsejtek: a neutrofil-, a hízó-, az NK-, a különböző T- és B-sejtek, makrofágok és dendritikus sejtek funkcióit érinti. A rapamycin elsőként jellemzett immunológiai hatása a T-sejtek proliferációját érintő mTOR funkció gátlás, a T-sejt anergia volt. Több immunológiai jelentőségű citokin, növekedési faktor hatása szabályozza az mTOR aktivitását (161,162). Az IL-2, IL-4 és CD28 potenciális aktivátora az mTORC1-nek T-sejtekben, míg a PD1 gátolja az mTOR-t a T-sejtek felszínéhez kötődve. A BCR (B cell receptor) szignál emeli, gátlói csökkentik a B-sejtek mTOR aktivitását. A TLR (Toll-like receptor) és CD40 a PI3K/mTOR tengelyen keresztül segíti az antigén-mediált B-sejt aktivációt. Az előbbieken túl az mTORC1 monitorozva a sejt állapotát és egyéb környezeti szignálok hatását (ATP/AMP arány, hypoxia, stressz, leptinek) befolyásolja a lymphocyták proliferációját, differenciációját és metabolikus aktivitását. Nyugvó sejtekben, így a nyugvó lymphocytákban is a katabolikus folyamatok aktívabbak, az mTOR gátolt és a szükséges fehérjék szintéziséhez a minimális energiát az autofágia nyújtja. Aktivációt követően a T- és B-sejtekben anabolikus folyamatok indulnak, amihez általában intenzívebb glikolízis biztosítja az energiát és az „alapanyagokat” (163). Ezek a változások jól ismert immunológiai útvonalak hatásaival is kapcsolatosak, amely szignálok többsége érinti az mTOR csomópontot, elsősorban az mTORC1-et. Ezzel összefügg, hogy az AMPK aktivitás vagy a glükolízis gátló kezelések a rapamycinhez hasonló hatásúak, T-sejt anergiához vezetnek. Az adaptív immunválaszban a dendritikus sejtek, az antigén prezentáló sejtek funkciói, a kostimulációs molekulák és citokinek (pl. IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , IL-10) termelése, az antigénfelvétel és -feldolgozás mTOR aktivitás nélkül nem valósul meg. A myeloid fagociták TLR szignál-mediált patogének indukált citokin, kemokin receptor funkciói, az I-es típusú IFN válasz is PI3K/mTOR szabályozás alatt áll. Az is fontos azonban, hogy ezeknek az útvonalaknak a gátlása, mTOR gátlók alkalmazása előbbi összetett szabályozó mechanizmusok kontrollját felborítva hozzájárulhat a lokális, steril, immunszuppresszív hatás mellett kialakuló gyulladásos folyamatokhoz is, ami az mTOR gátló kezelések egyik nem elhanyagolható mellékhatása. (164)

Az mTOR-szignálnak, a fehérjeszintézis és az autofágia szabályozásában játszott szerepe neurológiai folyamatokat is érint. Az mTORC1 aktivitás segíti a **tanulással, memóriával** összefüggő fehérjék termelését, egyes szinapszisok kialakulását. Egerekben magas mTOR aktivitást mutattak ki a *nucleus accumbens*-ben rendszeres alkoholfogyasztás mellett és ezt összefüggésbe hozzák az mTOR **függőséget szabályozó** hatásaival (165, 166, 167, 168). Az antidepresszánsok emelik az mTOR aktivitását ezzel összefüggésben az mTOR-függő szinapszisok kialakulását (166). Egyszeri rapamycin kezeléssel gátolni lehet az alkoholfüggőség egyes viselkedési zavarait, pl. a rohamivást (169). Az **epilepsiában** tüzelő neuronok mTOR hiperaktivitása is ismert jellemző (170). Az mTOR autofágia gátló hatásainak pedig a **neurodegeneratív kórképekben** van jelentősége. Parkinson-, Alzheimer- vagy Huntington-kór esetében a kóros fehérjék felhalmozódásában az mTOR aktivitás autofágia gátlásának szerepe egyre jobban ismert (171,172). Nemcsak kísérletes adatok, hanem a

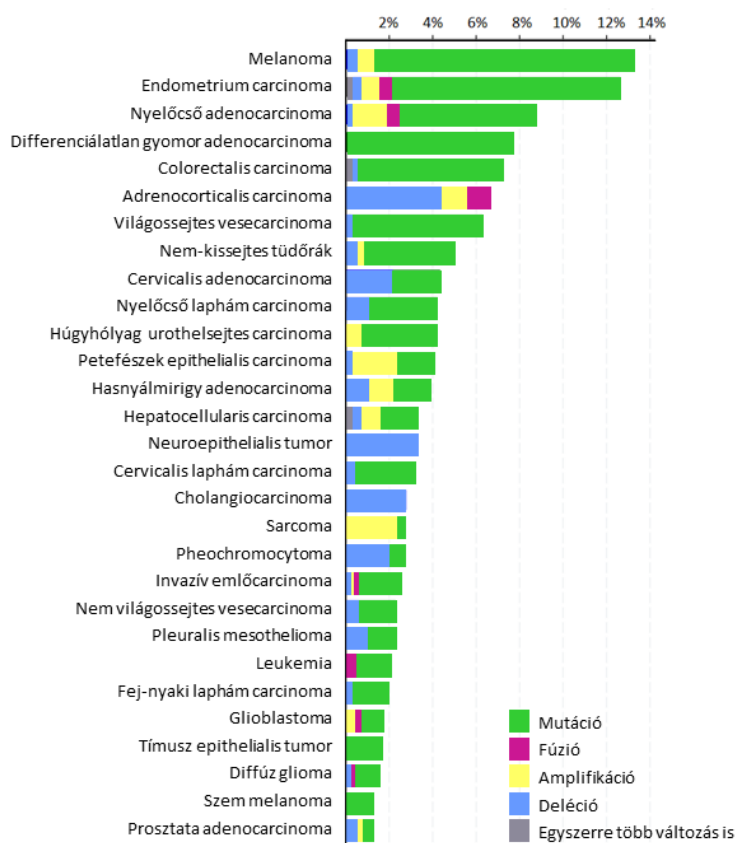
kurkumin és más gyógynövénykészítmények, illetve a specifikus mTOR gátlók jótékony hatását mutatják a vizsgálatok az előbbi toxikus fehérje felhalmozódás csökkentésében (173).

### ***1.2.3. mTOR hiperaktivitása daganatokban***

Az **öregedéssel** párhuzamosan zajló folyamatok lassítása számos betegségben fontos szempont. Több vizsgálat megerősíti, hogy a kalóriaszegény diéta és az mTOR gátlók meghosszabbítják a várható élettartamot, lelassítják az öregedési folyamatokat. Az elmúlt évtized eredményei alapján napjainkra elfogadott, hogy az mTOR aktivitás által szabályozott folyamatok a kor előre haladásával felerősítik a sejtek és a szövetek öregedését, így felmerül annak a lehetősége, hogy az mTOR gátlással és kalóriarestrikcióval lassítsuk a biológiai órát (174,175). Előbbiekben fontos mTORC1 aktivitás támogatott változások a következők: a. proteinszintézis és transzlációs stresszhatások miatt kialakuló oxidatív stressz, felhalmozódó káros, metabolikus melléktermékek (pl. ROS mitokondrium károsító hatásai); b. az autofágia gátlása, ami miatt a sejtben keletkező kóros szerkezetű organelumok vagy fehérjék megsemmisítése, megújulása zavart szenved, ezek felhalmozódnak a sejtekben; c. a magas mTOR aktivitás egyes eredmények szerint elvezethet az őssejt pool kimerüléséhez és szenescens fenotípusos jellegzetességek megjelenéséhez, illetve ezekkel párhuzamosan gyulladáscsökkentő citokinek termeléséhez a mikro környezetben; d. továbbá a sejtek tápanyag és energia szenzitivitása is csökken, így adott folyamatok, akár kóros sejtek növekedése szabályozatlanná válik a szövetben. Ezeknek a változásoknak a többsége az öregedő sejtek mellett a daganatos sejtekben is megfigyelhető, persze más összefüggésben, mivel a daganatokban a tumorpromoter funkciók felerősödése és a tumorszuppresszor funkciók kiesése áll a háttérben.

Mivel az mTOR aktivitás olyan biológiai folyamatok szükséges feltétele, mint a fehérjeszintézis, glükózhasznosítás, sejtosztódás, proliferáció, növekedés vagy túlélés, nem meglepő, hogy funkciózavara, elsősorban hiperaktivitása a daganatok megjelenésével, kialakulásával és progressziójával is kapcsolatba hozható. Daganatokban hiperaktivitása alapvetően háromféle mTOR szignálváltozással hozható összefüggésbe: a. mTOR kináz génmutációk, b. az mTOR komplexet, illetve elemeit és aktivitásukat direkt módon szabályozó fehérjék mutációi, c. a jelátviteli hálózatban bekövetkező változások elsősorban onkogén illetve tumorszuppresszor génmutációk vagy aktivitás változások, amelyek az mTOR kináz aktivitását is fokozzák.

Az egyik első átfogó tanulmányban 2014-ben is már több mint 30 mTOR kináz domént érintő, konstitutív aktivációt okozó mutációt azonosítottak a legkülönbözőbb daganatok esetében (176). Ezek jelentőségét és továbbiak előfordulásának gyakoriságát azóta számos tumorban jellemezték (9. ábra). A szolid daganatok közel 5%-a hordoz mTOR kináz aktiváló mutációkat, amelyek pl. endometriális tumorokban, melanómákban, gyomor-, béldaganatokban, illetve vese- és tüdő daganatokban is előfordulhatnak (177).



**9. ábra mTOR kináz genetikai változások gyakorisága daganatokban** (pontmutációk, fúziók, amplifikáció, deléció vagy egyszerre többféle géntváltozás) – adatbázisok adatai alapján

Az mTOR komplex elemek közül a Rictor amplifikáció és fokozott expresszió jelentőségét emlődaganatokban, kissejtes tüdődaganatokban, fejnyaki daganatokban és gyomor adenocarcinómákban írták le (178,179, 180,181,182). A Rictor fehérje mennyiségének emelkedését és ezzel az Akt aktivitás fokozódását azonban számos további daganat esetében is megismertük az elmúlt évtizedben. Munkacsoportunk is több daganattípus fokozott Rictor expresszióját és mTORC2 aktivitását jellemezte. Egyéb mutációk, amelyek a jelátviteli hálózatban az útvonal hiperaktivitását vagy negatív szabályozásának kiesését okozhatják, a Rictor amplifikációnál jóval gyakrabban fordulnak elő. Ilyenek pl. a PI3KCa, az Akt1, PTEN, TSC1, TSC2 vagy az LKB1 mutációk. A PI3KCa mutációi emlő-, nőgyógyászati daganatokban (>20%), illetve vastagbél daganatokban gyakoriak; a PTEN mutációk az endometriális és központi idegrendszeri daganatokban fordulnak elő 10%-nál gyakrabban.

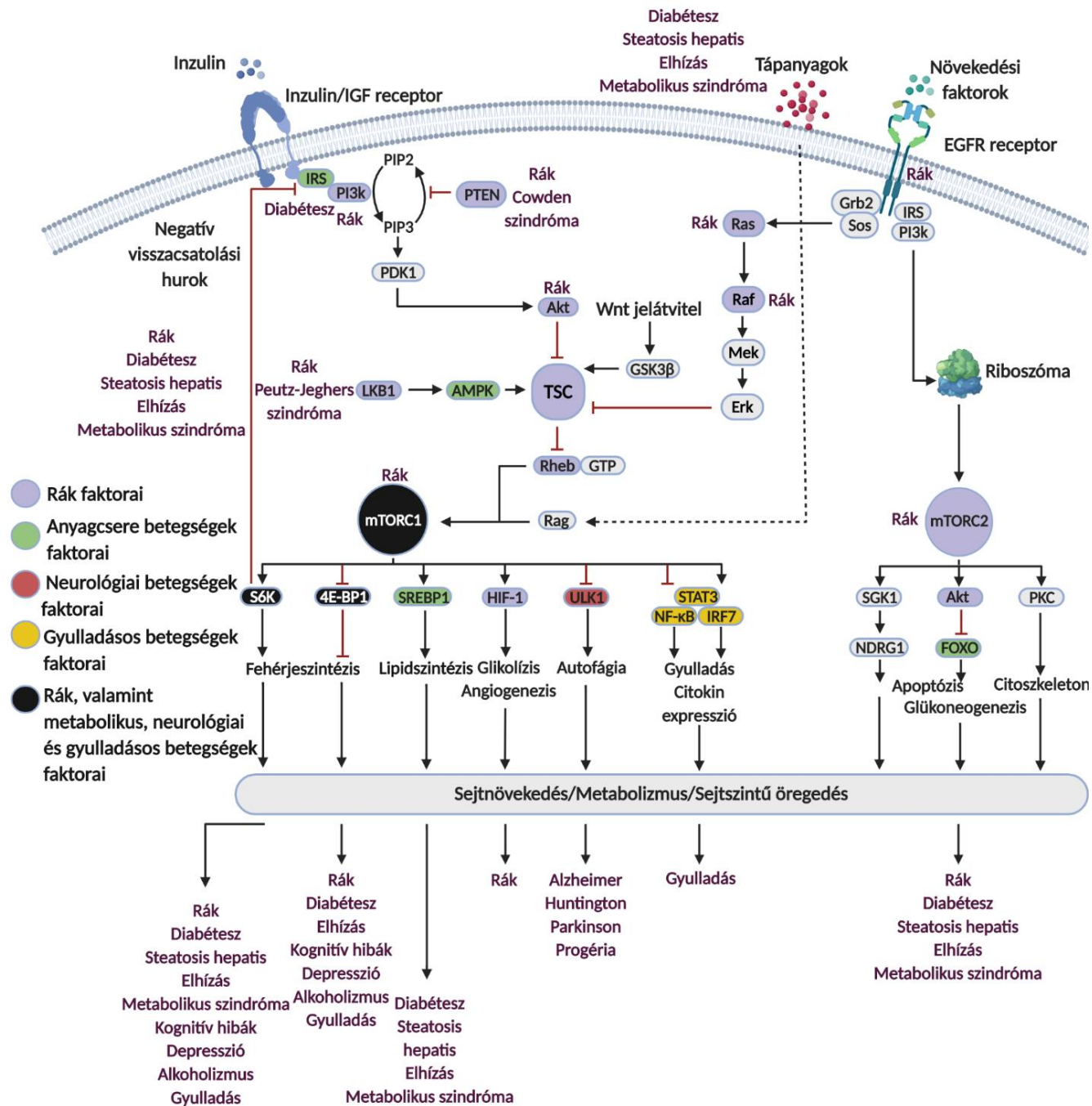
A TSC1 mutációk húgyúti és endometriális daganatok 5-6%-ában, a TSC2 pedig az endometriális daganatok mellett, méhnyakrákok, máj- és tüdődaganatok 4-7%-ában fordul elő. A PTEN vagy a TSC1/2 kiesése prosztata-, endometrium-, emlő-, petefészekrákban, melanómákban és glioblastomákban; utóbbi veserákok mellett inkább jóindulatú daganatokban jellemző (pl. hamartoma, angiofibroma, rhabdomyoma) (183,184).

Akt1 mutáció frekvenciája már alacsonyabb (3-5%) (pl. emlő-, vastagbél-, tüdő-, gyomor- és petefészekrákban) (185), de az Akt2, illetve az Akt3 mutációi előfordulhatnak pl. pankreasz-, petefészek-, emlő-, fejnyak- és vastagbeldaganatokban (186). Az LKB1 mutációk pedig a méhnyakrák, vékonybél- és tüdődaganatok 10-15%-ában jelennek meg. Azokban a daganatokban, amelyekben gyakoriak a Ras/Raf mutációk, a TSC1/2 funkció gátlása segíti az mTOR aktivitás fokozódását pl. melanómákban, tüdő- és coloncancerokban.

Természetesen nem szabad megfeledkezni azokról a növekedési faktor receptor mutációkkal (pl. EGFR, HER2) összefüggő közvetett mTOR hiperaktivitásokról sem, amelyek adott daganattípusoknál jelenlegi célzott terápiás jelentőségük miatt sem kérdőjelezhetők meg. Az mTOR hiperaktivitás háttérében PI3K hiperaktivitás figyelhető meg, amelyben a katalikus alegység ritkább mutációi mellett leginkább a növekedési faktor receptorok aktiváló mutáció állnak (187,188,189) (pl. gyomor-, emlő-, vastagbél-, endometrium, tüdő, és petefészekrákban, gliómákban, hematológiai daganatokban is). Előbbiek alapján nem meglepő, hogy a rosszindulatú daganatok több mint 50-70%-ában konstitutív mTOR kináz aktivitást figyelhetünk meg (190). Amelyekhez bizonyos esetekben kimutatható Rheb overexpresszió társulhat, mint az mTOR hiperaktivitás oka (pl. lymphomák, fej-nyaki- és emlődaganatok) (191).

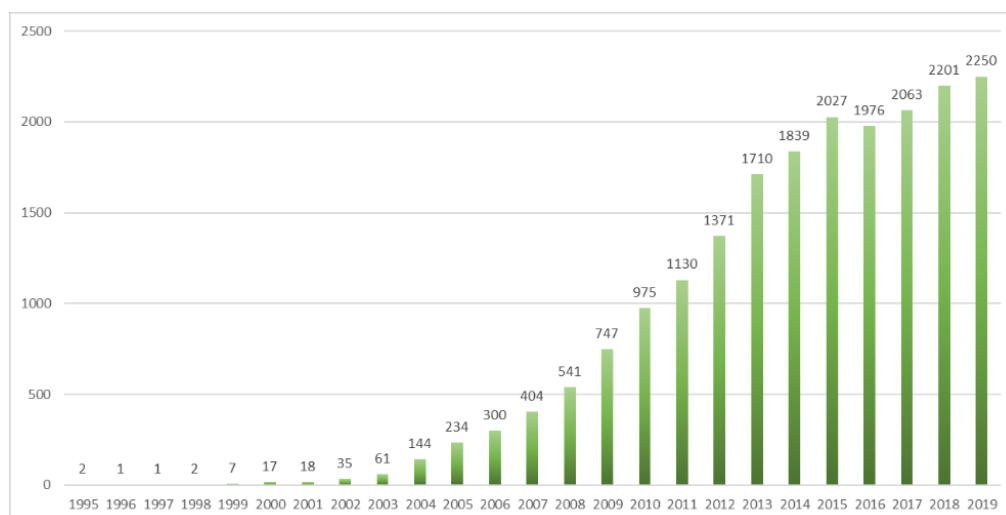
Az mTOR hiperaktivitásnak jelentőséget tulajdonítanak a terápiarezisztencia kialakulásában is. Az elmúlt évtized legtöbb, a daganatok mTOR hiperaktivitását és a legkülönbözőbb daganatos betegségek prognózisát érintő vizsgálatában, a magas mTOR aktivitás és a rosszabb túlélési adatok között szignifikáns összefüggést mutattak ki (192). Az mTOR kináz aktivitása ezért is, illetve a jelátviteli hálózatban betöltött központi szerepe és számos egyéb útvonallal fennálló kapcsolatai miatt is lehet ideális target (10. ábra). Például a PI3K, PTEN mutáció megjelenése esetén HER2 ellenes terápiarezisztens tumorokban a mutáció következményei targetálható mTOR kináz gátlóval (193,194,195). Ezek alapján mTOR hiperaktivitás igazolása mellett, a jelenlegi terápiákkal szemben érzékenyíthetővé válhat adott daganat mTOR inhibitor kombinált terápiákban, igaz a mellékhatások kezelése sok beteg esetében ilyenkor azért nem kis kihívást jelent.

Az előbbi mutációkat és jelátviteli aktivitás zavarokat, azok összefüggését az mTOR hiperaktivitással áttekintve, nem meglepő, hogy, ha a PubMed adatbázisban az „*mTOR*” és a „*cancer*” kulcsszavakra keresünk, akkor a találatok száma is mutatja, hogy a növekvő érdeklődés a daganatok mTOR aktivitásának kutatásai iránt már a kétezres években megjelent (11. ábra). Ekkor figyelték meg először vesetranszplantáció után megjelenő vesedaganatok kezelésében az immunszuppresszióban a rapamycin konverzió tumorelles hatását (196). 2005 után ez a figyelem, és a daganatok mTOR aktivitásával kapcsolatos közlemények száma is exponenciálisan növekedett.



**10. ábra** AZ mTOR kináz központi szerepe a jelátviteli hálózatban és ezek összefüggése egyes betegségek kialakulásával. Az ábrán az mTOR aktivitás szabályozása alatt álló számos faktor szerepel, amelyek esetében azok megváltozott funkciói jól ismertek meghatározott az ábra alján felsorolt humán betegségekben.

Az érdeklődés az mTOR aktivitás zavarokkal kapcsolatos kutatások iránt az elmúlt 5 évben sem csökkent, számos daganat típus esetében jellemzésre került a magas mTOR aktivitás, illetve ezek háttérében álló jelátviteli szabályozási zavar. Jelenleg pedig újabb és újabb inhibitorok hatás- és fázisvizsgálata folyik vagy zárul le különböző eredményekkel.



**11. ábra mTOR + cancer/tumour keresési találatok évekre bontott eredménye a PubMed adatbázisban**

#### ***1.2.4. mTOR mint target a daganatok kezelésében***

Az első törzskönyvezett mTOR gátlószer a rapamycin, amely először transzplantációban immunszuppresszáns hatóanyagként került alkalmazásra (197). Jelenleg, mint klasszikus – elsőgenerációs – mTOR gátlók a rapamycinnek, illetve származékainak (temsirolimus, everolimus, deforolimus) immunszuppresszáns hatásai mellett a daganat növekedésgátló hatásai is egyre nagyobb hangsúlyt kapnak. Vesetumrok után, az mTORC1 aktivitás ciklin D1 fehérje túltermelést és a daganatnövekedést biztosító szerepét bizonyítva elsőként a köpenysejtes lymphoma (MCL) kezelésében vezették be alkalmazását (198). Napjainkban már az inhibitorok több generációjának fejlesztése, tesztelése is zajlik (199). A rapalógok a rapamycin származékai, jobb oldékonyaságú és stabilitási tulajdonságú allosztérikus inhibitorok. A három jelenleg klinikai alkalmazásban elérhető rapalóg a temsirolimus (CCI-779), az everolimus (RAD001) és a ridaforolimus (MK-8669).

Tumorellenes kezelésekben általában alacsony dózisban lehetőség szerint naponta alkalmazzák a rapalógokat pl. AML-ben (temsirolimus), előrehaladott vesedaganatok, neuroendokrin daganatok, hasnyálmirigy- és emésztőrendszeri, illetve egyes tüdő- és emlődaganatok esetében (everolimus). Az előbbi elsőgenerációs mTOR gátlókat (rapalógok) mono-, és gyakrabban kombinációs terápiákban alkalmazhatják (200,201,202). A monoterépiás rapalóg kezelések sajnos nem hozták a várt eredményeket, kombinációk esetében viszont a mellékhatások jelentenek gyakori problémát, így párhuzamosan hatóanyagfejlesztések, fázisvizsgálatok is folynak sok esetben (2. Táblázat) (203).

A rapalógok mellett folyamatosan jelennek meg az újgenerációs, mTORC1-et és mTORC2-t is gátló kettős inhibitorok (pl. vistusertib), illetve egyéb duál inhibitorok (pl. dactolisib). Ezek különböző klinikai fázisvizsgálatokban vagy egyes esetekben egyedi engedélyezésekkel érhetőek még csak el. Az újgenerációs mTOR gátlók az mTOR kináz aktivitását a komplextől függetlenül, C1 és C2 komplexben is gátolják; illetve más, a jelátviteli hálózatban lévő kináz – pl. Akt vagy a PI3K – aktivitását is gátolhatják. A második generációs

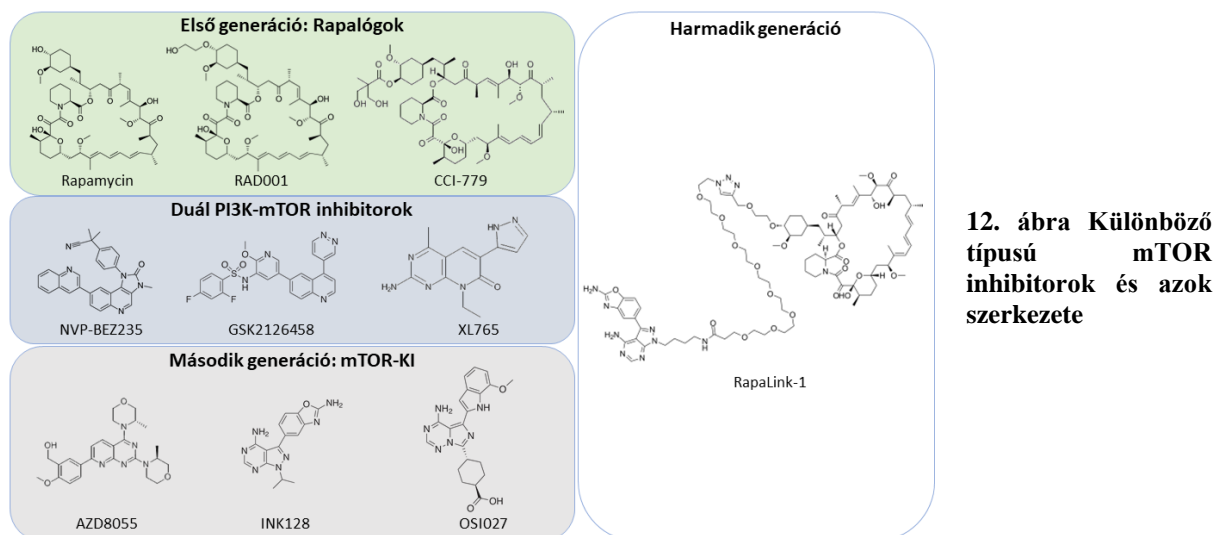
gátlókat a kináz katalitikus aktivitása ellen tervezve fejlesztették, általában ATP kompetitív hatásúak. Ilyenek pl. a PP242, illetve származéka az MLN0128 (INK128), ugyanebbe a csoportba sorolható a jelenleg már az AstraZenecához tartozó kinolon, régi nevén Torin1 és a Torin2 is (213). A duál inhibitorok a negatív „*feedback loop*” hatások kiküszöbölésére is lehetőséget adnak, elsőként ezek között a PI103, majd ennek származékai jelentek meg (PI450, PI620, NVPBEZ235 (dactolisib) vagy az XL765 (SAR245409)).

## 2. Táblázat mTOR target kezelési lehetőségek különböző daganatos betegségekben

Név	Osztályozás	Target	Állapot	Hivatkozások
Rapamycin (sirolimus)	mTOR gátló	mTORC1	Klinikai alkalmazás	204-207
Temsirolimus (CCI-779)			Klinikai alkalmazás	204, 206, 207, 208
Everolimus (RAD001)			Klinikai alkalmazás	204, 206, 207, 208
Ridaforolimus (AP23573)			Klinikai alkalmazás	205-207
LY294002		mTOR útvonala	Megállított	209
OSI-027			Klinikai vizsgálat	209-210
Ku-0063794			Fejlesztés alatt	210
PP242			Fejlesztés alatt	210-211
WYE-687			Megállított	210
INK-128			Klinikai vizsgálat	209-211
WAY-600			Megállított	210
AZD2014			Klinikai vizsgálat	209-211
AZD8055			Klinikai vizsgálat	209-211
RapaLink			Fejlesztés alatt	211-213
PP30		mTOR kináz gátló	Fejlesztés alatt	210
Torin1		mTORC1/mTORC2 gátló	PI3K/AKT/mTOR útvonala	Fejlesztés alatt
PI-103	PI3K/mTOR gátló	PI3K útvonala	Megállított	209, 211
PI-450			Megállított	211
PI-620			Megállított	211
PI-540			Megállított	211
GCD-0541			Megállított	215
WYE354			Megállított	216
WJD008			Megállított	216
WAY600			Megállított	216
Ku0063794			Megállított	216
GCD-0941			Klinikai vizsgálat	217
NVP-BEZ235		Klinikai vizsgálat	209, 210, 211, 218	
XL765		Megállított	209, 218	
GDC-0980		Fázis II	209, 211	
SF1126	pan-PI3K gátló	Megállított	209	
Everolimus+PLS-123	Kombináció	mTOR gátló+BTK gátló	Fejlesztés alatt	219
Everolimus+fulvestrant		mTOR gátló+anti-ösztrogén	Fejlesztés alatt	220
Everolimus+exemestan		mTOR gátló+anti-ösztrogén	Klinikai alkalmazás	220
Rapamycin+STX-0119		mTOR gátló+STAT2 gátló	Fejlesztés alatt	221
Rapamycin+sorafenib		mTOR gátló+VEGFR gátló	Fejlesztés alatt	217

Rövidítések: BTK-Bruton's tyrosine kinase, STAT-Signal transducer and activator of transcription, VEGFR-vascular endothelial growth factor receptor

A jelenlegi fázisvizsgálatokban a súlyosbodó mellékhatások és az alacsony hatékonyság sok esetben a kísérletek leállításához vezetett. A rapalóg rezisztenciák kialakulásának felismerése pedig az úgynevezett harmadik generációs inhibitorok fejlesztését indította el. Ezek közül a RapaLinks hatóanyag fejlesztése az mTOR kináz FRB kötő doménjében (A2034V és F2108L), illetve a kináz domén (M2327I) azonosított mutációk hatásainak kiküszöböléséhez kezdődött el (214, 222), és ugyan még csak kísérleti szakaszban tart, de várhatók pozitív eredmények (12. ábra).



A mono- és kombinációs kezelésekben a mellékhatások jelentik a legnagyobb kihívást a klinikusok számára. A hagyományos kemoterápiához képest a toxikus mellékhatások enyhébbek ugyan, de egyes esetekben az egyéni érzékenységi különbségek miatt a mellékhatások olyan súlyosak, hogy a kezelést fel kell függeszteni (223). A kezelés során 10%-ban jelentkezik pneumonitis, ami a betegek rendszeres légzéskontrollját igényli, míg az immunszuppresszív hatások a fertőzésre fogékonyságot, korábbi fertőzések (például: hepatitis B, gombainfekciók) fellángolását okozhatják. Bőrkiütések, stomatitis mellett metabolikus mellékhatások hipofoszfátémia, hiperglikémia fordul elő, ezek kezelése is gondos odafigyelést igényel.

### ***1.3. Anyagcsereváltozások tumorbiológiai jelentősége***

Az mTOR aktivitás egyik fontos szerepe a sejtek növekedés szabályozása közben, a növekedéshez szükséges bioenergetikai háttér biztosításának „felügyelete”, a sejt katabolikus és anabolikus egyensúlyának biztosítása is. Ennek érdekében a metabolikus alkalmazkodásban adott anyagcsereútvonalak átprogramozása valósulhat meg, pl. autofágia gátlás felszabadulása az mTOR inaktivációjakor, illetve gátlása hiperaktivitásakor vagy a lipidszintézis és a lipidoxidáció egyensúlya a sejtekben. Talán pont ezért ma már az mTOR aktivitás változások daganatbiológiai szerepének vizsgálata elképzelhetetlen a daganatok metabolikus alkalmazkodásának vizsgálata nélkül. A daganatok jellegzeteségei közé tartoznak az anyagcsereútvonalak átrendeződései; a tumorszövetben, a tumor sejtjeiben a metabolikus



folyamatok aktivitása, azok aránya különböző lehet (224). Az elhízás és egyes daganatok kialakulása közötti összefüggések, valamint metabolikus hatású, nem onkológiai kezelések daganatnövekedés gátló hatásainak felismerése egyre nagyobb figyelmet kapott az utóbbi években (225,226). A daganatok metabolikus térképezésekor genomikai, transzkriptomikai adatok egészülnek ki metabolomikai, biokémiai vizsgálatok eredményeivel.

### ***1.3.1. Bioenergetikai változások a daganatsejtekben***

Otto Warburg a metabolikus alkalmazkodás egyik elemét már a múlt század húszas éveiben felismerte. Leírta a daganatok többségére jellemző, az oxigénellátottságtól független, fokozott mértékű tejsavas glikolízist, a róla elnevezett Warburg-effektust. Ennek lényege, hogy a tumorsejtek a glükózt tejsavvá alakítva ugyan 1 mól glükóz lebontásával kevesebb ATP-t nyernek, azonban a folyamat nagyon gyorsan biztosít energiát és építőelemeket a növekedéshez (227). Párhuzamosan pedig az intracelluláris térben megjelenő tejsav (a savas környezet) mikrokörnyezeti hatásai tovább segítik a tumor növekedését, terjedését a szervezetben (pl. a lokális immunszuppresszió; a mátrixbontó enzimek aktiválása, a szöveti elemek lebontása; a fibroblasztok VEGF, az endotél sejtek VEGFR2 termelésének fokozása; az érképződésének, illetve a sejtek migrációjának elősegítése (metasztázisképzés) (228).

Az előbbiekkal összefüggésben egyes tumorok fokozott glükózfelvételét, mint jellegzeteséget, a tumornövekedés és a metasztázisok klinikai követésében hasznosíthatjuk (PET-CT vizsgálatok 18F-fluoro-2-dezoxi-glükóz (FDG) – szöveti felhalmozódás). A PET-CT vizsgálatok korlátai is mutatják azonban, a daganatok metabolikus alkalmazkodásának többféle lehetőségét, hiszen a módszer a glükózt nem (vagy kevéssé) hasznosító daganatok – pl. prosztata-, egyes emlődaganatok stb. – esetében nem megfelelő, ami a daganatok anyagcsere vizsgálataival párhuzamosan további radionyomjelzők (pl.  $^{11}\text{C}$ -acetát vagy  $^{11}\text{C}$ - és  $^{13}\text{C}$ -laktát) fejlesztését indította el (229).

Warburg elméletét később Herbert Crabtree (glikolízis-oxidatív foszforilációs váltások – 230, 231) munkája, majd napjaink eredményei után is többszörösen újra kell értelmezni. Cantley és Thompson munkatársai a 2000-es évek elején a jelátviteli zavarokkal összefüggő anyagcsereváltozások kapcsán figyelték meg pl. a PKM2 (piruvát-kináz 2 izoforma) fokozott termelésének, egyes jelátviteli zavaroknak, a PI3K/Akt/mTOR hiperaktivitásnak összefüggéseit a tumorsejtek glikolitikus eltolódásával (232, 4). Ebben az időszakban egyes anyagcsere enzim mutációkkal kapcsolatba hozható felhalmozódó metabolitok daganatbiológiai jelentőségének leírása közben jelent meg az irodalomban az onkometabolitok fogalma is (233).

Bár a legújabb eredmények kizárólagos, csak a tumorokra jellemző metabolikus jellegzetességeket ugyan nem mutatnak, a tumorsejtek, a daganatszövet metabolikus átprogramozásának vizsgálatával és megismerésével olyan változásokat ismertünk meg, amelyek nemcsak a diagnosztikában, a terápiás eredmények követésében mint markerek, de a daganatok kezelésében új célpontokként is megjelenhetnek.

### ***1.3.2. Metabolikus alkalmazkodási stratégiák, metabolikus fenotípusok a daganatokban***

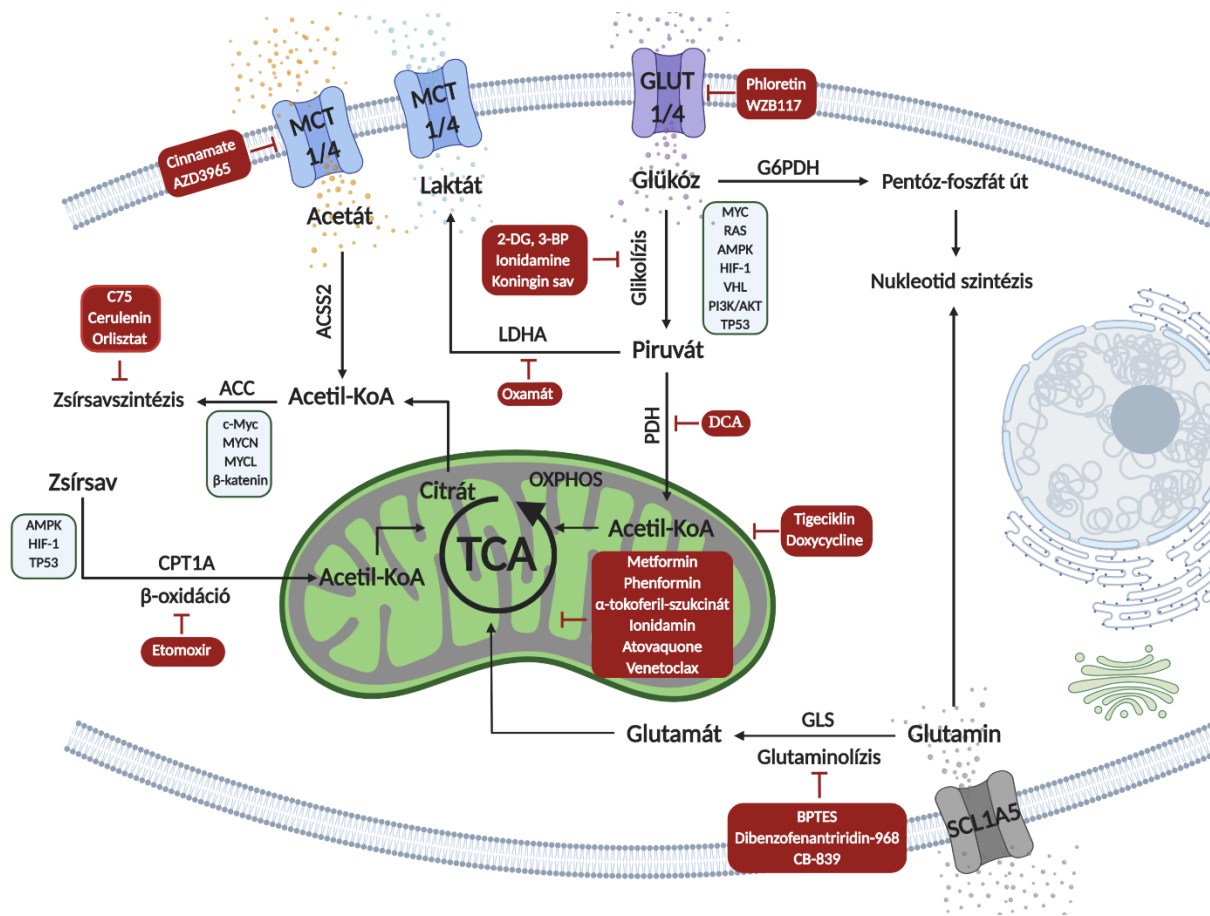
Az Warburg-effektust mint a **glikolitikus fenotípust** évekkal ezelőtt még a daganatok domináns anyagcsere jellegzetességének tartották és a mitokondrium funkcionális

károsodásával hozták összefüggésbe. Az elmúlt évtized eredményei megmutatták azonban, hogy a tumorsejtek többsége bioenergetikai szempontból ép mitokondriumokkal rendelkezik (illetve ellenkező esetben akár a mikrokörnyezeti sejtektől átvéve ép mitokondriumokkal pótolhatja mitokondriumait), tehát oxidatív foszforilációra képes (OXPHOS) (234,235). Tudjuk azt is, hogy intenzív növekedéskor a sejtekre és így a daganatsejtek többségére a glikolízis jellemző. A tumorszövetben a sejtek egy része azonban – és ezek lehetnek a legveszélyesebbek és legagresszívebbek – gyakorlatilag nemcsak intenzív Warburg glikolízist folytat, hanem az oxidatív foszforilációban párhuzamosan sok ATP-t is termel, ún. hidrid fenotípussal rendelkezik. A tumorszövet alkalmazkodásában ezek a hibrid sejtek teremtik meg az extrém metabolikus plaszticitást, forrásai lehetnek a terápiarezisztens és a metasztázisképző sejtklónoknak (4).

Az intracelluláris metabolikus átrendeződésekben jól ismert onkogén szabályozási zavarokkal összefüggésben glükóz, karboxilát és aminosav transzporterek (pl. GLUT, MCT, ASCT), illetve egyes anyagcsereenzimek (pl. PKM2, PFK, LDHA) expresszióváltozásait is megfigyelhetjük, amiben a génregulációs, jelátviteli változásoknak (pl. *MYC*, *RAS*, *AMPK*, *HIF-1*, *VHL*, *PI3K*, *AKT*, *TP53*) közvetlen vagy közvetett szerepük is lehet. Ezek többsége jellemzi a magas glikolitikus aktivitású, FDG-PET-CT pozitív daganatokat. Nem meglepő, hogy az elmúlt időben az életmódváltoztatás/életmódváltás, a különböző diéták és egyes metabolikus gátlószerek (pl. glikolízis gátlók, metformin) kitüntetett figyelmet kapnak egyes daganatok megelőzésében vagy akár kezelésében (236).

A piruvát-kináz alacsony aktivitású (PKM2) és a laktát-dehidrogenáz A (LDHA) izoforma mennyiségének növekedése elősegíti a piruvát-laktát (piroszőlősav-tejsav) átalakulást és a glikolitikus intermedierek hasznosítását. Ilyen metabolikus helyzetben a citrátciklusba (TCA) glükóz-piruvát forrásból származó acetyl-KoenzimA (acetyl-KoA) alig jut, ami a citrátciklus metabolit-feltöltésének (kata- és anaplerózis) egyensúlyát felboríthatná. A glikolízis intermedierek azonban az előbbiek ellenére a szintetikus folyamatok építőköveit (pl. glükóz-6-foszfát, ribulóz-5-foszfát, dihidroxi-aceton) és megfelelő ATP szintet is biztosítják. Az egyensúly fenntartásában többféle citrátköri feltöltő mechanizmus játszhat szerepet. A glutaminolízis, a glutamin-glutamát- $\alpha$ -ketoglutarát átalakulás útján biztosítja a citrátciklus feltöltését és jelentős mennyiségű ATP termelés forrása is lehet (237). Az  $\alpha$ -ketoglutarát (aKG) mennyiségének emelkedése majd pl. izocitrát-citrát átalakulás – reverz útvonal – segíti a zsírsav- és a lipidszintézist. A gyorsan osztódó szövetek, tumorsejtek glutaminigényét az előbbi bioenergetikai folyamatok is magyarázzák. A glutaminhasznosítás azonban más hatásaival is hozzájárul a tumorszövet növekedésének biztosításához; fontos intermediereket nyújt a fehérje- és nukleotidszintézisben, az N- és O-glikolizációban, az antioxidáns glutation képződésén keresztül segíti az oxidatív stresszhatások kivédését, illetve bioenergetikai és transzamináz szubsztrát is lehet (238). Ezekben a folyamatokban a fehérjebontásból származó aminosavak, köztük a glutamin, a szervezet 10-15%-ának energiaellátását is pótolhatja, míg ismert az is, hogy egyes aminosavak esszenciálisak is lehetnek bizonyos tumorsejtek növekedésében. Az anyagcsere-folyamatok epigenetikai szabályozási zavarokban játszott tumorbiológiai jelentőségét mutatják azok az eredmények, amelyek a treonin, a metionin, az S-adenozil metionin (SAM) szint fenntartásának hiszton- és DNS-metilációban játszott szerepét hangsúlyozzák (239). Energiaínségben a fehérjék, aminosavak felhasználása mellett a zsírsavak és ketontestek redukív karboxilációja, oxidációja is nagy jelentőségű, és a reverz Warburg-

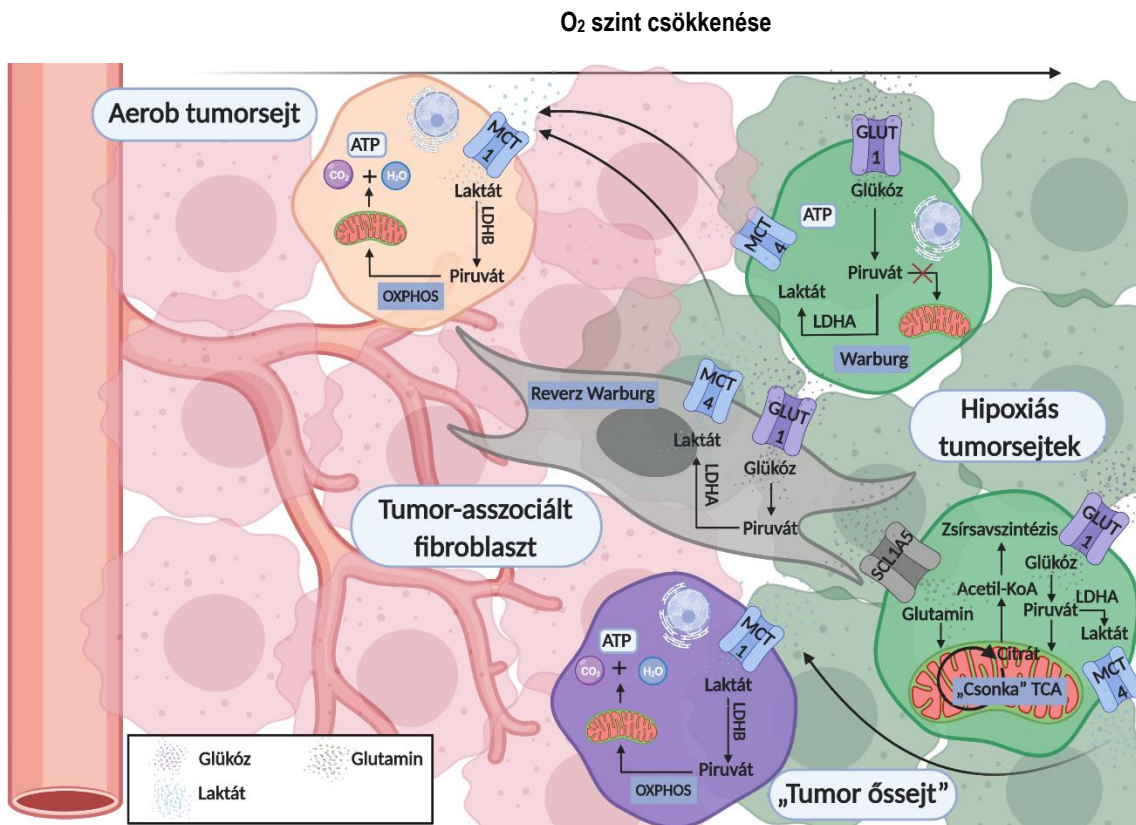
effektus laktát visszaforgatásával is nyújt bioenergetikai szubsztrát kapacitás forrást a metabolikus alkalmazkodásra képes sejteknek (240). A  $\beta$ -oxidáció és lipidszintézis szabályozó folyamataiban számos onkogén és transzkripciós faktor útvonal (c-Myc, MYCN, MYCL,  $\beta$ -katenin) vesz részt, a lipidszintézis és lipidoxidáció egyensúlya, az új membránok szintézisének dinamikus alkalmazkodása a daganatos progresszióban fontos tényező. A daganatkialakulásban egyre több esetben válik ismertté az elhízás, a diabetes és a metabolikus szindróma – mint lipidmetabolizmust is érintő „kóros” állapotok – szerepe. Ezekben például az acetyl-CoA karboxiláz (ACC – zsírsavszintézis sebesség-meghatározó enzim) és a karnitin-palmitoltranszferáz 1A (CPT1A – zsírsavanyagcsere fontos enzime) aktivitás és mennyiségi változásainak, a lipidlebontó és -szintetikus folyamatok egyensúlyának lehet kiemelkedő hatása adott daganatok esetében (13. ábra).



**13. ábra Metabolikus útvonalak.** Különböző metabolikus útvonalak vázlatos ábrázolása, szabályozásában szerepet játszó egyes onkogének, illetve az adott folyamatok esetében felhasználható gátlószerek. Részletes magyarázatokat ld. a szövegben

Oxigén jelenlétében, a glikolízisben keletkező piruvát acetyl-KoA-vá alakulva a TCA ciklusba lépve különböző intermedierek, illetve a mitokondrium mátrixban  $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$  és  $\text{FADH}_2$  termelődnek. Utóbbiak az elektrontranszportláncban, a terminális oxidációban ATP-t nyújtanak az **OXPHOS fenotípusú** sejteknek. A fent említett citrátciklust feltöltő mechanizmusok, a glutaminolízis és lipidbontás termékei vagy a fehérjék, aminosavak bontása más intermediereken keresztül is bekapcsolódhatnak az oxidációs, bioenergetikai folyamatokba.

Ideális állapot a tumorsejtekben, ha a Warburg-glikolízis, a citrátciklust feltöltő és az OXPHOS mechanizmusok egyaránt elérhetőek és egyensúlyban vannak. A legújabb elképzelések szerint a **hibrid metabolikus fenotípusú** sejtekben, egy időben aerob laktát-termelő glikolízis és párhuzamosan OXPHOS is működik (4, 237). Bár egyes hipotézisek szerint, ezt a fenotípust a megfelelő folyamatok gyors re- és inaktivációjaként kell elképzelni, ami szerint a hibrid fenotípus inkább a tumorszövet, illetve a szöveti metabolikus szimbiózis eredménye. A metabolikus fenotípusok áttekintése közben a nyugvó sejtek – és így az ún. „daganat őssejt” – alacsonyabb metabolikus aktivitását is meg kell említenünk. Ezekről több összefoglaló közlemény is születik napjainkban, az adatok között azonban vannak ellentmondások. A munkák többsége az ős- és a nyugvó sejtek OXPHOS bioenergetikai hátterét hangsúlyozza, az ilyen OXPHOS metabolikus jellegzetességű tumor őssejteket, „dormant” sejteket, a terápiarezisztencia kialakulásában játszott szerepüket egyre több tumortípusban vizsgálják jelenleg (242) (14. ábra).



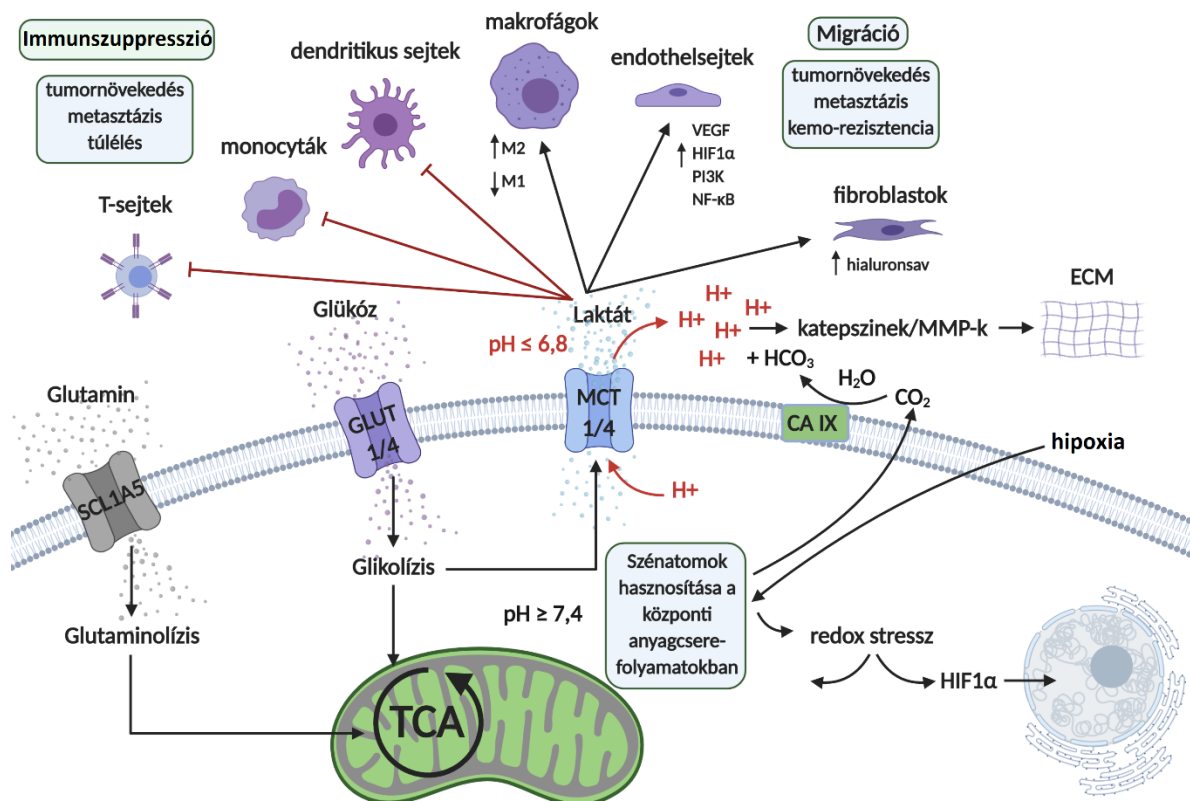
**14. ábra Szöveti környezetben megfigyelhető metabolikus szimbiózis.** Az erekől különböző távolságra elhelyezkedő sejtek esetében az oxigénellátottság is meghatározhatja adott normál, illetve tumorsejtek metabolikus alkalmazkodásának szükségességét. Ennek megfelelően a hipoxiás vagy pszeudohipoxiás tumorsejtek által a mikrokörnyezetbe jutó laktát a jobban oxigenizált területek tumor vagy normál sejtjei segítségével optimálisan használódik fel, oxidálódik, illetve a különböző transzporterek segítségével felvehető egyéb szubsztrátok citrátciklust feltöltő mechanizmusai is segítik a bioenergetikai egyensúly szöveti fenntartását.

A növekvő tumorban kialakuló oxigénhiányos (hipoxiás) területek, a jelenlegi terápiás kezelések hatásai, a tumorsejtek inváziója és keringésbe lépése, az EMT és a metasztázisok helyén az új mikrokörnyezet a tumorsejtek alkalmazkodását érintő folyamatok. Ezek a sejtek anyagcsereváltozásai, metabolikus átprogramozása nélkül nem, vagy csak ritkán lehetnek sikeresek. Az alkalmazkodást az onko- és szuppresszor gének (pl. *MYC*, *TP53*, *PTEN*, *TSC1/2*),

a jelátviteli útvonalak (pl. PI3K/mTOR/Akt, Ras) szabályozatlan működése segíti (243,244). A HIF1 $\alpha$  (HIF1) expresszió fokozódása serkenti az angiogenezist (pl. VEGF), míg ezzel egyidőben a glikolízis enzimek, a glükóz transzporterek expresszió fokozódása a glutaminolízist, illetve a csonka citrátkör alapú zsírsavszintézist. Az ATP szint csökkenése (pl. tápanyaghiány) aktiválja az AMP aktivált protein-kinázt (AMPK), gátolja az mTOR aktivitást, ezzel a lebontó folyamatokat támogatja, aktiválja az autofágiát, a lizoszóma-biogenezist. Így a tumorsejtek túlélhetnek egy alacsonyabb metabolikus aktivitású szinten. A tumorsejtek egy részében a glikolitikus flux, a glutaminolízis, míg másokban az OXPHOS lesz aktívabb, a zsírsavszintézis is változhat, energia hiányában csökkenhet. A keringő tumorsejtekre az OXPHOS metabolizmus és a kiegyensúlyozott redoxi-állapot fenntartása jellemző (245). A metasztatikus, pl. a májba, csontba metasztatizáló sejtek inkább Warburg-fenotípusúak, míg az agyi- és a tüdőmetasztázisokban az OXPHOS fenotípus jellemzőbb (246). Ezek a változások persze a tumorsejt típusától is függenek, de a metabolikus alkalmazkodás széles spektruma (metabolikus plaszticitás) a sejtek túlélésének, új környezethez alkalmazkodásának, így a kialakuló rezisztenciának egyik fontos tényezője.

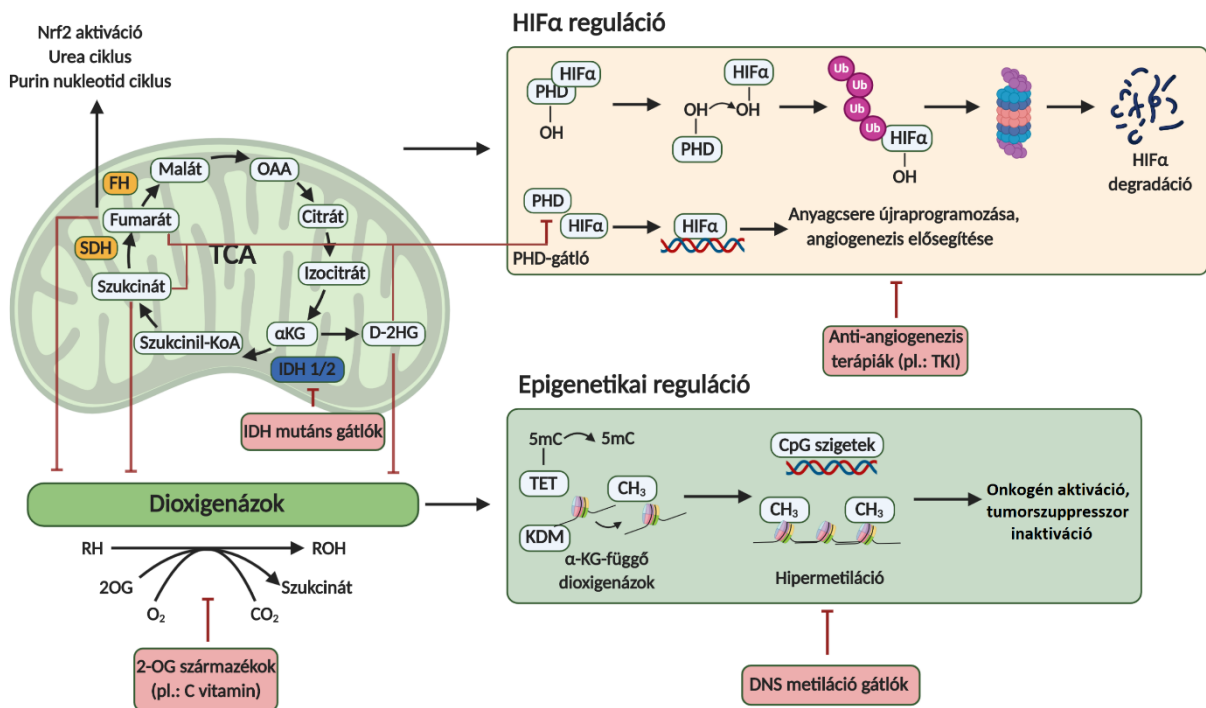
### I.3.3. Metabolit, onkometabolit koncentráció változások a daganatokban

A metabolikus változások következményeként a sejtek intracelluláris metabolit-koncentráció viszonyai is megváltoznak, ezek a jellegzetes változások pedig akár extracellulárisan és/vagy az extracelluláris vezikulákban is megjelenhetnek. Erre jó példa a laktát termelés következményeként kimutatható laktát szint emelkedése, az acidózis jelensége. (15. ábra)



15. ábra Laktát mint onkometabolit daganatnövekedést támogató hatásai

Bizonyos funkcióvesztő vagy nyerő enzimmutációk (pl. citrát-szintáz, akonitáz, fumarát-hidratáz – FH, szukcinát-dehidrogenáz – SDH, izocitrát-dehidrogenáz – IDH) a citrátciklust és az oxidatív folyamatokat jelentősen károsíthatják, ennek eredményként egyes citrátköri metabolitok kóros mennyiségben halmozódhatnak fel. Az előbbi mutációk következményeiként a fumarát-, a szukcinát mennyiségének emelkedése és a D-2-hidroxioglutarát (2HG) megjelenése olyan génszabályozási változásokhoz, zavarokhoz (metiláció, acetiláció), illetve HIF1 stabilizációhoz vezetnek, amelyek a laktát hatásaihoz hasonló növekedési előnyt biztosítanak a sejteknek (16. ábra). Ezeket az anyagcsere köztes termékeket (metabolitokat), amelyek mennyiségükben vagy szerkezetükben megváltozva segítik a tumornövekedést, onkometabolitoknak tekintjük. Ezek, illetve más metabolitok mennyiségi változásai is jellemző képet adhatnak a metabolikus működés változásairól (247). A tumorsejtekben termelődő, majd exportált, a tumor mikrokörnyezetében megjelenő nagymennyiségű tejsav (laktát) is onkometabolit. Emelkedése kimutatható bizonyos daganatos betegek szérumában vagy más testfolyadékában (liquor, pleurális folyadék stb.), sőt végstádiumú, cahexiás betegekben szintje extrém emelkedést mutathat és a szervezet metabolikus összeomlásának egyik jele lehet (248).



**16. ábra** Anyagcsere enzim mutációkkal összefüggő onkometabolitok és daganat-biológiai szerepük, illetve hatásaikat gátló kezelések

A már említett onkometabolitok ritkább daganatok és adott anyagcsere-enzim mutációk megjelenésével függenek össze.

Az izocitrát-dehidrogenáz enzimek (IDH1-3) aKG, CO<sub>2</sub> és NADH<sup>+</sup>+H<sup>+</sup> keletkezését katalizálják, mutáció esetében aKG helyett, 2HG keletkezik. Ilyenkor a mutáns enzim NADPH fogyasztó, amin keresztül a szabadgyök-szint emelkedéséhez járul hozzá, illetve 2HG más enzimekhez is kötődve, kompetitív gátló hatásaival fokozza pl. a HIF1 stabilitását, így

mennyiségét; vagy gátolja a hiszton- és DNS-metilázok funkcióit, DNS-hipermetilációt. Ezek a hatások összességében epigenetikai és további onkogenikus változásokat eredményeznek a tumorsejtekben. IDH funkciónyerő mutáció ~70-80% gyakoriságot mutat astrocytomákban, oligodendrogliomákban, szekunder glioblastomákban, de a felnőttkori akut myeloid leukémiák (AML) 15-20%-ára is jellemző, a chondrosarcomák ~50%-ában jelenhet meg; a pajzsmirigy-, colorectalis- és cholangiocarcinomában ritkább. Az IDH mutáció gliomákban a jobb, míg más daganatokban a rosszabb prognózissal mutat összefüggést a jelenlegi kezelések mellett. Az SDH funkcióvesztő mutáció miatt a szukcinát-fumarát átalakulás gátlódik, **szukcinát**, halmozódik fel, és az előbbi a 2HG-hoz hasonló hatásai mellett, pl. aszpartát szintézis emelkedés is bekövetkezhet. Az SDH mutáció gasztrointesztinális strómális tumor, vesecarcinoma, paraganglioma vagy pheochromocytoma kialakulását segíti a betegekben. Az FH mutációkat leiomyomatosisban és II-es típusú papilláris vesedaganatokban írták le, szerepük lehet azonban egyéb daganatok kialakulásában is. A funkciókiesés miatt felhalmozódó **fumarát** a szukcináthoz hasonlóan járul hozzá daganatbiológiai változásokhoz (249-251).

A fenti onkometabolitok kimutathatósága, szintjének emelkedése felhívhatja a figyelmet a daganatok megjelenésére vagy a terápiát követő recidívára, áttét kialakulására. A 2HG gliomás betegek liquorjában, vérében és AML-es betegek vérében monitorozhatóvá teszi az IDH mutáns sejtek megjelenését, számának emelkedését vagy a mutáns IDH funkcióját gátló kezelések hatásait is (252, 253). Nemcsak az említett onkometabolitok és a laktát, hanem adott tumorszövetek metabolit-koncentráció viszonyainak elemzése is fontos információt adhat a daganatszövet metabolikus állapotáról, jellegzetes metabolikus útvonalainak aktivitásáról. A legújabb vizsgálatok, így saját eredményeink alapján is a metabolitok mennyiségi változásainak segítségével is jellemezhetők a daganatok. A metabolikus jellemzések adott daganatszövet kiindulási vagy az alkalmazott terápia esetén várható anyagcsere-változásait mutathatják meg, amelyeket gátolva, metabolikus katasztrófát előidézve hozzájárulhatunk a terápiák hatékonyságának javításához a jövőben.

#### ***1.3.4. Tumorsejtek anyagcseréjét befolyásoló hatóanyagok, metabolikus off-target hatások***

A tumormetabolizmussal kapcsolatos közlemények, vizsgálatok és fejlesztések növekvő száma újabb és újabb lehetőségeket tár fel a daganatok jellemző bioenergetikai útvonalainak gátlásában (13. ábra).

Az egyik legnagyobb érdeklődés a **glikolízisgátlókra** irányult, a tumorsejtekben fokozottan termelődő, emelkedett aktivitású transzporterek (pl. GLUT gátlók: phloretin, WZB117; vagy MCT gátlók: Cinnamate, AZD3965) vagy glikolitikus enzimek (HK2: 2-deoxi-D-glükóz, lonidamine; GAPDH:3-brómpiruvát – 3BP, koninginsav; LDHA: oxamát vagy PDK: diklóracetát) rendkívül jó célpontok lehetnek (254). A GLUT gátló és kemoterápiás szer kombinációk (WZB117+ciszplatin, paclitaxel) szinergikus tumornövekedés gátló hatásokat mutattak. A legsikeresebb vizsgálatoknak a GAPDH gátló koninginsav és a piruvát analóg 3BP kezelések tűntek. 2016-ban azonban minden glikolízisgátló fázisvizsgálatot leállítottak a súlyos mellékhatások miatt (255). Így jelenleg a laktát- és piruvát-transzport, a monokarboxilát transzporterek (MCT-k) gátlása (Cinnamate és AZD3965), illetve más kezelések ismert

bystander hatása (pl. mTOR gátlók) használható ki glikolitikus fenotípusú tumorsejtekben (130).

A **mitokondrium bioenergetikai funkció gátlása** a légzési lánc oxidációs folyamatának, illetve a mitokondrium proteinszintézisének gátlásával is megvalósulhat. Bizonyos antibiotikumok (pl. tetraciklinek) és származékaik *in vitro* és *in vivo* modellekben hatásos tumornövekedés gátló kezelésnek bizonyulnak. A tigecycline önmagában és imatinib kombinációban is toxikus krónikus myeloid leukémia őssejtekben (256); emlődaganatokban pedig a doxycycline kezelés, illetve egyéb hasonló szerkezetű antibiotikumok csökkenthetik a daganatőssejtek számát, javítva ezzel a betegek prognózisát (257). A metformin/phenformin légzési lánc komplex I gátló hatásai preklinikai vizsgálatokban mutattak tumornövekedés gátló hatásokat, így több fázisvizsgálat is folyik jelenleg (258). Az arzén-oxidot (komplex III gátlás) az akut promyelocytás leukaemiák terápiájába fogadta be az FDA. E-vitamin analóg  $\alpha$ -tokoferil-szukcinát és a maláriaellenes atovaquone off-target (komplex II gátló) tumornövekedés gátló hatásai is megjelennek egyes közleményekben (259). A venetoclax indirekt elektrontranszportlánc gátló kezelés és glutaminolízisgátló kombinációkat is tesztelik, tesztelték egyes daganattípusok fázis kísérleteiben (260).

A **glutamináz gátlókkal** (BPTES, dibenzofenantriridin-968 és CB-839) a citrátciklus anaplerózist akadályozhatják meg. A CB-839 specifikus glutamináz gátló és tumornövekedés gátló hatásait preklinikai fázisvizsgálatokban igazolták többféle szolid tumorban (pl. glioblastomák, vesedaganatok, tripla negatív emlőrákok) (261). Előbbivel ellentétben a lipidszintézis gátlók (C75, cerulenin, orlistat) tumornövekedést befolyásoló hatásai az eddigi vizsgálatokban nem egyértelműek. Eddig az SREBP-1 transzkripció faktor, illetve a CD36 (zsírsavfelvétel) funkció gátlása után mutattak ki tumornövekedést gátló hatásokat a lipidanyagcsere gátlók között. Kedvező mellékhatásprofilú az etomoxir (CPT1A- $\beta$ -oxidáció gátló) és hatásai ígéretesek lehetnek, de az autofágia tumorsejtek túlélését befolyásoló hatásai is nagy figyelmet kapnak a jelenleg zajló kísérletekben (pl. chloroquine kombinációk). Az eredmények arra utalnak, hogy a komplex metabolikus szabályozási rendszerben a tumorok egyedi metabolikus jellegzetességeitől függően, a **lipid anyagcserét és az autofágia folyamatait gátló és fokozó kezelések** is szerepet kaphatnak a jövőben (262).

**Egyéb metabolikus hatású gátlószerek** kezeléseik közé sorolhatók a mutáns IDH enzim funkcióit gátló kezelések (pl. AG-221 – enasidenib – IDH2; AG-120 – IDH1; illetve AG-881 pan-IDH1/2 gátlók), az enasidenib az AML relapszus kezelésében kapott FDA engedélyt 2017-ben (263). További metabolikus gátlószerek közé sorolható még számos kináz gátló kezelés is, pl. a PI3K/Akt/mTOR gátló kezelések. Az mTOR komplexek katabolikus és anabolikus szabályozó hatásai miatt, illetve a legtöbb daganat esetében ismertté vált mTOR hiperaktivitás miatt is nagy figyelmet kapnak a különböző kezelési kombinációkban (264). Metformin, illetve autofágia- és mTOR inhibitorok kombinációjával is kezdődtek fáziskísérletek (265, 266). Mások és saját adataink szerint a rezisztencia problémák áttörésében a metabolikus alkalmazkodás központi tényezőjeként, az mTOR gátlása más metabolikus gátlószerekkel vagy egyéb célzott kezelésekkel kombinációban lehet sikeres.

Az ideális kezelésekhöz, a megfelelő betegcsoportok kiválasztásához azonban a daganatok metabolikus heterogenitásának megismerésére, a tumorsejtek és a tumorszövet metabolikus adaptációs képességének feltérképezésére van szükség. Az elmúlt évtizedben indult újra fejlődésnek a daganatok metabolikus változásainak vizsgálata, ami a genomikai és



transzkriptomikai adatok mellett végre metabolomikai, biokémiai és *in situ* metabolikus karakterizálás komplex eredményeivel egészíti ki tumorbiológiai ismereteinket, így esély nyílt új terápiák tervezésére, a daganatok metabolikus szabályozásának támadására a közeljövőben.

#### ***1.4. In vitro és in vivo kísérletek eredményeinek értelmezése in situ patológiai vizsgálatok segítségével***

Tumorbiológiai vizsgálatokban adott kérdések megközelítésekor külön szerencse, ha egy egyetemi központi patológia intézetben dolgozva nemcsak számos klinikai betegminta, a szükséges legújabb modern molekuláris biológiai diagnosztikai eszközök és a klinikusok segítségével a betegek követésének lehetősége, hanem *in vitro* és *in vivo* kísérletek végrehajtásához szükséges infrastruktúra is rendelkezésre áll. Előbbi lehetőségekkel vizsgálataink során nemcsak a különböző tumortípusokhoz tartozó betegmintákat tanulmányozhattunk, hanem *in vitro* és *in vivo* állatkísérleteket is végezhattünk a legtöbb esetben.

##### ***1.4.1. Rezisztencia és mTOR vizsgálatokba bevont lymphoid daganatok***

A PhD disszertációm témáját követően, folytatva a leukémiákat és lymphomákat érintő tumorbiológiai problémák tanulmányozását az indukált apoptózist, TGF $\beta$ -rezisztenciát és a Notch jelátviteli zavarokat, majd ezekkel összefüggésben az mTOR hiperaktivitás tanulmányozását is a hematológiai daganatokban kezdtem el. Számos az intézet sejtvonal bankjában elérhető lymphoma/leukémia sejtvonal *in vitro* és *in vivo* kísérletei mellett, az intézetünkbe áramlási citometriai vizsgálatra érkező leukémiás minták segítségével egyes esetekben izolált leukémia sejtek *in vitro* tesztelése is megtörténhetett. Míg az intézetbe diagnosztikai vizsgálatra érkező műtétileg eltávolított lymphoma biopsziás anyagok lehetővé tették a szöveti minták karakterizálását, és adott tényezők prognózist érintő összefüggéseinek vizsgálatát is.

##### ***1.4.1.1. Leukémiák (CLL és ALL)***

A lymphoid daganatok ismert sokfélesége ellenére egyes jellegzetességeik például a kiindulási sejtek típusa (pl. B-, T-sejtes) differenciációs állapotuk (prekurzor, vagy érett sejtípusok) vagy specifikus szervi megjelenéseik alapján egyes entitások jól karakterizálhatók. Előbbiek mellett munkámban azonban a leggyakoribb lymphoid leukémiák vizsgálatával is foglalkoztunk.

A CLL a leggyakoribb leukémiás megbetegedés a nyugati országokban; lassú lefolyása hátterében a sejtek megnövekedett túlélésének és apoptózis indukcióval szembeni csökkent érzékenységének lehet szerepe. Előbbiekben BCR, illetve az intracelluláris jelátviteli hálózat aktivitás változásai (pl. Btk) is fontosak. A betegség lefolyása és prognózisa igen változó, genetikai eltérések is befolyásolják (pl. P53 mutációs státusz kromoszóma számváltozások), alapvetően indolens betegség ugyan, de progressziója esetében a várható túlélése a betegeknek jelenleg kevesebb mint 1 év (267, 268).

Míg felnőttkorban a CLL, addig gyermekkorban az akut lymphoblasztos leukémiák fordulnak elő leggyakrabban a leukémiák között; az USA-ban kb. 2500 új esetet, míg Magyarországon 50-70 esetet diagnosztizálnak évente. Annak ellenére, hogy a jelenlegi kezelések mellett az

esetek nagy száma gyógyítható (közel 75-80% -a), még mindig az ALL áll első helyen a gyermekkori daganatos halálozásban. A felnőttekben pedig csak 35-40%-a gyógyítható az ALL-eknek, aminek hátterében a felnőttkori ALL molekuláris patogenezisének különbségei, illetve a terápia kevésbé tolerálható mellékhatásai állhatnak. A gyermekkori rossz prognózissal több kliniko-patológiai jellemző összefüggését ismerjük (pl. 2 évnél fiatalabb életkor vagy fiatal felnőttkor, MLL transzlokáció, magasabb blasztszám, kezeléskor reziduális tumorsejtek magasabb száma), így a kezelés közben gondos terápiás válaszkövetés és megfelelő protokollválasztás szükséges (269,270).

A leukémiák terápiás érzékenységét befolyásoló rezisztencia mechanizmusok és ezek áttörése azonban további erőfeszítéseket igényel. Ehhez a törekvéshez jól illeszkedtek a normál szabályozó TGF $\beta$ -val szembeni rezisztenciával, illetve az mTOR aktivitással és a NOTCH jelátviteli útvonal aktivitásával, azok gátlásával kapcsolatos vizsgálataink.

#### ***1.4.1.2. Lymphomák***

A lymphoid daganatsejtek szolid tumorként az érintett nyirokcsomókban vagy más szövetekben lymphomák formájában jelennek meg. Alapvetően két nagy csoportra oszthatók ugyan, de mind a non-Hodgkin, mind a Hodgkin lymphomák igen heterogének, sokfélék lehetnek.

A leggyakoribb felnőttkori lymphoma típus, a felnőttkori non-Hodgkin lymphomák 35%-a a diffúz nagy B-sejtes lymphomák (DLBCL) csoportja. Magyarországon 150-200 új esetet írnak le évente, ebben a kifejezett malignitású heterogén, több altípust magába foglaló lymphoma csoportban (pl.: T-sejt és hisztiocita gazdag DLBCL, primer idegrendszeri DLBCL, primer cutan DLBCL, primer mediasztinális DLBCL, intravaszkuláris DLBCL). A B-sejt eredetű, gyorsan növő, érett, nagy tumorsejtek kezelés nélkül fatális kimenetelű progresszióhoz vezetnek, de a jelenlegi terápiás kezelés mellett az esetek 60-80%-ában teljes remisszió, és akár 5-10 éves túlélés (50-70%) érhető el (271,272). A betegség prognózisa a génexpressziós vizsgálatokkal is meghatározható csoportokban eltérő (273,274). A csíráközpont (GC) és a perifériás aktivált B-sejtes (ABC) DLBCL esetek közül a GC-DLBCL-ek klinikai prognózisa kedvezőbb a jelenlegi kezelés mellett.

A Hodgkin lymphomák (HL) a DLBCL-eknél jobb prognózisú B-sejtes daganatok. Gyakran fiatalokat érintenek, 200-250 új esetet diagnosztizálnak hazánkban évente. Ezek 4-5%-a noduláris lymphocita predomináns HL (NLPHL), míg a klasszikus HL jóval gyakrabban fordul elő (nodular sclerosis, lymphocita gazdag, lymphocita depléciós és kevertsejtes altípus). A klasszikus HL tumorsejtjei a többmagvú Sternberg-Reed-sejtek és azok variánsai (tükröképsejt, lakunáris-sejt és Hodgkin-sejt), szövettani jellegzetességük, hogy a tumorsejtek száma alacsony, míg a tumorsejtek között lévő reaktív lymphoid és histiocyter sejtek figyelhetők meg. A klasszikus HL jó prognózisú betegség, a betegek 70-80%-a meggyógyul (ötéves túlélés 85-88%). A terápiás sikerekhez azonban mellékhatások, szövődmények is társulnak. A Hodgkin lymphomák esetében az is igaz, hogy talán pont az előbbieket miatt új daganatellenes hatóanyagok fejlesztése nem igazán történt az elmúlt időkben (275, 276).

A rossz prognózisú betegek korai, akár diagnóziskori felismerése és alternatív terápiás szerek alkalmazása, új stratégiák kidolgozása a HL-ek esetében is mindenképpen szükséges. Ezekkel

kapcsolatban elsősorban rezisztencia és mTOR komplex aktivitás karakterizálásokat, illetve modellkísérleteinkben különböző mTOR gátló kezelési vizsgálatokat végeztünk.

#### ***1.4.2. mTOR és metabolikus vizsgálatokba bevont szolid daganattípusok***

A terápiarezisztencia áttörése, illetve ennek összefüggése a daganatos betegek túlélésével nemcsak hematológiai daganatok esetében, de számos népegészségügyi szempontból fontos szolid tumortípus esetében fontos kérdés. Vizsgálatainkban már nem önmagában az mTOR aktivitás változásait térképeztük, hanem ezzel összefüggésben a daganattípusok metabolikus jellemzését is megkezdtük és amennyiben lehetőségünk volt rá a markereket *in vitro* sejtvonalak metabolikus jellemzése segítségével választottuk ki. Kísérleti modelljeink segítségével pedig az mTOR gátló kezelések mellett, metabolikus támadáspontú kezelések kombinációs terápiás hatásait, illetve érzékenyítő szerepét is meg tudtuk vizsgálni.

##### ***1.4.2.1. Különböző carcinomák (colon-, tüdő- és emlőcarcinomák)***

A daganatok kezelése rendkívül sokat fejlődött az elmúlt évtizedben, javultak a terápiás eredmények, de ennek ellenére a daganatos halálozások okai között még mindig vezet a tüdődaganatok, colon- és más gasztrointestinális, illetve emlőcarcinomák progressziója. A célzott terápiás kezelések csak bizonyos betegek esetében hoztak igazi áttöréseket. A betegek túlélési eredményei jobbak ugyan, de a recidíva, a progresszió-metasztázis, a gyógyszerrezisztencia megjelenése igen gyakori mindhárom daganattípusban. Több mint 18 millió új daganatos beteget diagnosztizálnak évente (2018-ban a GLOBOCAN szerint 18,1 millió új daganat diagnózis született és több mint 9 és fél millióan veszítették életüket daganatos halálalással összefüggésben), ezek között a leggyakoribb daganatok a több mint 2 millió tüdő- és emlő-, illetve közel 2 millió (1,8 millió) colorectalis daganat. Ezenfelül minden erőfeszítés ellenére a tüdődaganatos betegek halálozása még mindig megközelíti az 1,8 millió főt, de 880 ezer colorectalis- és 780 ezer emlődaganatos beteg is meghal a világon évente (277).

A tüdőcarcinomák négy legfontosabb altípusa az adenocarcinoma, a laphámsejtes carcinoma, a kissejtes carcinoma, valamint a nagysejtes carcinoma, de klasszikusan ezeket két nagyobb csoportba a kissejtes és a nem kissejtes tüdődaganatok csoportjára osztjuk (utóbbiba tartozik az adenocarcinoma, a laphám- és a nagysejtes carcinoma, valamint a nagysejtes neuroendocrin carcinoma). A diagnózis idején a betegek közel háromnegyedében nyirokcsomó áttétek, felében már távoli áttétek is megfigyelhetők. A halálozási adatok is mutatják, hogy a betegség prognózisa még mindig nagyon rossz, az 5 éves túlélés 16%. Az elmúlt évtized molekuláris diagnosztikai és célzott terápiás fejlesztései elsősorban az EGFR mutáns, KRAS vad típusú, illetve az ALK transzlokációt mutató esetekben hoztak új kezelési lehetőségeket – bár a rezisztencia problémák itt is megjelennek. Jelenleg az immunterápia lehetősége az, ami a kezelések eredményességében valami javulást jelenthet, és számos célzott terápiás lehetőség tesztelése is zajlik (278, 279).

A vastagbél adenocarcinomák a gastrointestinális traktus leggyakrabban előforduló malignus daganatai, amelyek kialakulásának hátterében heterogén molekuláris, genetikai és epigenetikai változások állhatnak (mismatch repair gének mutáció, LOH, mutátor fenotípus, TGFB, BRAF, TCF4 mutációk stb.). A legfontosabb tényezők prognózis szempontjából az invázió mélysége és a metasztázisok jelenléte vagy hiánya. A colorectalis carcinomák genetikai (molekuláris) és

klinikai sokféleségét azonban alátámasztja az, hogy a stádiumtól függetlenül még azok a betegek is jó életminőségben sokáig életben tarthatók, akiknek kisszámú, távoli áttétei sebészileg eltávolíthatók. A rossz prognózisú esetekben azonban a jelenlegi terápiákkal szembeni rezisztencia még mindig nagy kihívást jelent (280, 281).

Az emlődaganatok a leggyakoribb malignus daganatok nőkben, ezek többsége adenocarcinoma. Klinikai szempontból a legnagyobb jelentősége a daganatsejtek hormon receptor és epidermalis növekedési faktor receptor expressziójának van, mind prognosztikai, mind terápiás vonatkozásban. Ezek alapján különböztetik meg a legfontosabb emlőcarcinoma altípusokat: Luminális A típus (alacsony ER+, HER2-), Luminális B típus (magasabb ER+ és lehet HER2+ is), HER2+ típus (ER negatív, de HER2 overexpressziót mutató daganatsejtek), Tripla negatív (ER-, PR- és HER2-). Meg kell említenünk a familiáris emlődaganatok szempontjából jelentős mutációk előfordulását is, amelyek a sporadikus formák esetében is megjelenhetnek. A BRCA1/2 szomatikus mutáció ugyan ritka, de metilációs inaktivációja a daganatok 50%-át is érintheti, illetve a p53 szomatikus mutáció is gyakori a tripla negatív és a HER2+ daganatokban. A PI3K-Akt jelátviteli hiperaktívás az ER+ és HER2+ daganatokban figyelhető meg gyakrabban. Míg korábban a kezeletlen betegek 3-4 éven belül meghaltak, addig napjainkra az emlődaganatos betegek többségének megfelelő kezelés mellett hosszú túlélést lehet biztosítani, bár a tripla negatív csoportban az új terápiás sikerek még egyelőre elmaradnak. Az mTOR gátlás, rapalógok – temsirolimus – alkalmazása exaestan kombinációban recidív emlőcarcinomákban a terápiarezisztencia leküzdése érdekében felmerül, de a betegek ezeket a kezeléseket kevésbé tolerálják, így az áttörés még ezek esetében elmarad (282-285).

#### ***1.4.2.2. Egyéb ritka daganatok (gliomák, lymphangiomiomatosis és rhabdomyosarcomák)***

A lymphangiomiomatosis (LAM) a *sclerosis tuberosa 1* vagy *2 (TSC1/TSC2)* gének funkcióvesztő mutációival összefüggő tüdőben kialakuló cisztás átalakulás. A betegség sporadikusan és a sclerosis tuberosa mutációk autoszomális domináns öröklődésével kapcsolatban fordul elő (286). A TSC1/2 mutáció következtében mTOR-jelátvitel hiperaktiváció és a LAM sejtek proliferációja figyelhető meg. Ezeknek felismerése tette lehetővé a célzott mTORC1 inhibitor, rapalóg terápia alkalmazását, így a betegek egy részében a betegség progressziójának lassítását (287). Vizsgálataink előtt ebben a rendkívül ritka tüdődaganatban az mTOR aktivitás *in situ* C1, C2 komplex függéséről, illetve a LAM sejtek egyéb metabolikus jellemzőiről még adatok nem álltak rendelkezésre.

A központi idegrendszer daganatai ritkák, de rendkívül rossz prognózisúak; leggyakrabban előforduló felnőttkori tumoraik a gliomák. A vizsgálatainkban tanulmányozott astrocytomák, oligodendrogliomák is a gliális sejt eredetű tumorok közé tartoznak. Az elmúlt években a gliomák genetikai változásainak különbségeit egyre jobban megismerve a jelenlegi osztályozásuk alapját is ez adja. Prognosztikai és terápiás érzékenységbeni jelentősége miatt az IDH mutáció státusz a gliomák osztályozásának egyik fontos eleme, amiben más genetikai eltérések így az 1p/19q deléció, az ATRX veszteség vagy a P53 mutáció meglétének vagy hiányának is van szerepe. A gliomák invazív daganatainak kezelése óriási kihívást jelent, bár a lassan növő formáik esetében a betegek túlélése azért lehet hosszabb.

Munkánkban a gliomák mTOR aktivitása mellett metabolikus jellegzetességeit vizsgáltuk, ismert ugyanis, hogy bizonyos gliomák kialakulásában az IDH enzim mutációja korai esemény; és a mutáció miatt a D-2HG onkometabolit megjelenése epigenetikai és anyagcsereváltozásokat is előidézik ebben a daganattípusban (288-290).

A lágyrészdaganatok összességében ritkák, 15%-uk pedig gyermekkorban fordul elő. Ezek között a leggyakoribbak a rhabdomyosarcomák, amely csoportban rendkívül intenzív, kombinált kezelésekkel a betegek 70%-a gyógyítható meg. A terápia rövid- és hosszútávú mellékhatásai, illetve a recidív rossz prognózisú esetek azonban nem hanyagolhatók el (291). Az elmúlt években bebizonyosodott az, hogy sem az alkiláló ágensek dóziszemelése, sem a kemoterápia intenzitásának fokozása vagy az autológ őssejt transzplantáció nem javítja a magas rizikójú betegek túlélését (292). A célzott terápiás gyógyszerek, köztük az mTOR gátló rapalóg (temsirolimus) kezelés azonban néhány recidív esetben egyedi elbírálással kisebb nagyobb eredményeket hozhat. Az elmúlt években nemcsak a rhabdomyosarcomák, hanem más lágyrész tumorerő esetében is közlésre került az mTOR hiperaktivitásának növekedést támogató szerepe és az mTOR gátlók alkalmazásának lehetősége, de sokkal kevesebb adat áll rendelkezésre a két mTOR komplex aktivitás viszonyairól vagy akár ezek metabolikus hatásairól ezekben a daganatokban.

#### ***1.4.3. In vitro, in vivo modellek korlátai és legújabb lehetőségei a daganatbiológiai kutatásokban***

A sikertelen kezelés szempontjából a tumorsejtek szervezeten belüli egyik legmeghatározóbb tulajdonsága az az adaptációs képesség, amely biztosítja a változó környezeti feltételek, terápiás kezelés mellett bizonyos tumorsejtek túlélését, majd későbbi növekedésének, proliferációjának újraindulását, a recidívák keletkezését/metasztázisok növekedését. A terápiarezisztencia hátterében több, a tumor kialakulása és kezelése közben megjelenő szabályozási, genetikai változás mellett nemcsak sejtszintű, hanem az egész tumorszövetet érintő anyagcsere-változások is lehetnek. Előbbiek alapján a daganatok terápiás érzékenységének vizsgálatához, új potenciális daganat ellenes szerek hatásának kiválasztásához egyrészt jó terápiás célpontok és megfelelő *in vivo* is hatásos készítmények, illetve a betegek kezelésének tervezéséhez minél jobb biomarkerek kiválasztása szükséges. Előbbiekhez a betegekből származó különböző tumorerő és *in situ* rendkívül heterogén tumorszövetek tanulmányozása mellett olyan modellrendszerekre van szükségünk, amelyek az *in situ/in vivo* helyzeteket jobban reprezentálják vagy legalább ismerjük korlátaikat a gyógyszermolekula célpontok és gyógyszer szelektációs vizsgálatok közben.

Saját eredményeink és az elmúlt két évtized vonatkozó tudományos közleményei is alátámasztják, hogy a tumorszövet metabolikus változásai az *in vitro* és az *in vivo* vizsgálatokban jelentősen eltérhetnek. A metabolikus különbségek forrása a szöveti heterogenitás, a tumorszövet többféle sejt és mátrixelemének szimbiózisa, a háromdimenziós szöveti szerkezet, azon belül az oxigén és tápanyag diffúzió, az erezettség mértékének eltérései. Ugyanazok a kezelések (még elérhető ugyanazon intracelluláris kezelőszer koncentráció mellett is) különböző *in vitro* és *in vivo* kísérleti modellekben, eltérő hatásokat eredményezhetnek. A gyógyszerhatóanyagok fázisvizsgálatainak eredménye és a valós terápiás eredmények között így sokszor igen nagy különbség lehet. Szükséges tehát a preklinikai

modellek fejlesztése. Legújabb munkáinkban olyan tényezőket vizsgálunk, amelyek 2D sejt kultúrákban és *in vivo* jelentős különbségeket mutathatnak és ebben a sejtek metabolikus adaptációs mechanizmusainak is nagy szerepe lehet. Mindezek alapján a daganatok jelátviteli zavarainak, mTOR aktivitás változásainak és metabolikus folyamatainak tanulmányozása közben mindig többféle modellrendszerben elvégzett vizsgálatok eredményeit kell összevetnünk a betegek szövetmintáiban az adott állapotot jellemző, *in situ* meghatározható expressziós vagy metabolikus jellemzőkkel. Munkánk jelenlegi szakaszában sikerült eljutnunk nemcsak a 3D spheroid kultúrák és *in vivo* xenograftok vizsgálatához, de 3D bionyomtatott tumorszövet szerű képletek kialakítását megkezdve lehetőségünk van a 2D, 3D sejttenyésztés, a 3D bionyomtatott struktúrák, xenograft tumorok összehasonlító vizsgálatára is. Ez a szabályozási zavarok és a szöveti komplexitás együttes értelmezésével reményeink szerint jobb gyógyszer célpont, terápia szelekciós eljárásokat eredményezhet. A modelleknek összehasonlító vizsgálatával azokat az elsősorban metabolikus különbségeket határozhatjuk meg, amelyek az eddigi nem túl hatékony *in vitro* teszt rendszerekben elhanyagolásra kerültek.

## II. Célkitűzések

Posztdoktori munkám kezdetén, a kétezres évek elején, a daganatok apoptózis rezisztenciájáról, a sejtek túlélését támogató folyamatokról már egyre többet tudhattunk meg. Ezeknek kialakulásában a különböző szabályozó mechanizmusok károsodásai, daganatok esetében a negatív szabályozó tényezők hatásainak elmaradása és ezzel összefüggésben a terápia rezisztencia mechanizmusok feltérképezése jelentették sokunk számára a legnagyobb kihívásokat. Párhuzamosan a jelátviteli útvonalak újabb és újabb elemeit ismertük meg, de a jelátviteli útvonalak bonyolult szabályozásai hálózatai még nagyrészt ismeretlenek voltak.

A TGF $\beta$  elsődleges jelátviteli útvonalának felfedezése, a humán Smad molekulák családjának és funkcióinak leírása, illetve a Notch útvonal elemeinek és funkcióinak, mechanizmusainak felismerése, fejlődésbiológiai jelentőségének jellemzése is csak erre a 20 évvel ezelőtti időszakra tehető (293, 294). A rapamycint ugyan már a hetvenes években felfedezték, leírták az FKBP12 kötő képességét, ezen keresztül hatásait feltételezve, de legfontosabb targetjét a sejt szabályozási folyamataiban, az mTOR kinázt is csak 1991-ben, illetve 1994-ben azonosították (295-297). A jelátviteli hálózatok különböző, a daganatsejtek növekedését érintő zavarainak vizsgálata kezdetén csak bizonyos daganatokban, illetve egyes sejtbiológiai folyamatokban ismertük, valószínűsítettük ezeknek a mára már sokkal jobban jellemzett útvonalaknak a szerepét. A különböző rezisztencia mechanizmusokban, előbbi útvonalak szabályozásai zavarainak vizsgálata közben több daganattípusban is leírhattunk olyan változásokat, amelyek hozzájárulhatnak az adott daganattípus progressziójához. mTOR aktivitás vizsgálataink közben több tumortípus esetében elsőként jellemeztük az mTOR komplexek aktivitását, és azok daganatbiológiai szerepét. Utóbbiakkal összefüggésben az mTOR aktivitás változások jelentőségét már adott daganattípusok bioenergetikai változásaiban is jellemezni tudtuk. Mindezen vizsgálatainkban mentorom, Kopper professzor tanácsait szem előtt tartva mindig törekedtünk arra, hogy az onkopatológiai-tumorbiológiai kérdések gyakorlati jelentőségét is vizsgáljuk, jelátviteli és metabolikus *in vitro* vizsgálatainkat, patológiai vizsgálatainkat, szinte minden esetben adott humán tumortípusok jellemzésével, illetve lehetőség szerint a megfelelő célzott kezelések *in vitro* és *in vivo* kísérleteivel is kiegészítettük.

**Az előbbiekhöz kapcsolódva a disszertációban összefoglalt eredmények célkitűzései a következők voltak:**

1. Mevastatin, illetve immunszuppresszív kezelések indukálta apoptózis mechanizmusának vizsgálata lymphoma, leukémia sejtvonalakban
2. Az immunszuppresszió és a tumorgenezis összefüggéseinek vizsgálata
3. A Notch expresszió és aktivitás változás szerepének vizsgálata leukémia, lymphoma sejtek proliferációjában, túlélésében
4. TGF $\beta$  indukált apoptózis, TGF $\beta$  rezisztencia hátterének, érzékenyítés lehetőségének vizsgálata leukémia, lymphoma sejtekben

5. Az mTOR aktivitás változások proliferációs és tumornövekedést segítő daganatbiológiai szerepének vizsgálata
  - Különböző lymphoma típusok és a gyermekkori akut lymphoid leukémiák mTOR aktivitás változásának és mTOR inhibitor érzékenységének vizsgálata
  - mTOR aktivitás, mint potenciális target jellemzése szolid daganatokban
  - mTOR aktivitással összefüggő bioenergetikai szubsztrát hasznosítás és metabolikus változások vizsgálata *in vitro* és *in vivo*
6. Az mTOR aktivitás és a szöveti metabolikus adaptáció szerepének térképezése egyes szolid daganatok progressziójában
7. A bioenergetikai alkalmazkodás, metabolikus plaszticitás gátlásának vizsgálata mTOR és metabolikus gátlószer kombinációk *in vitro* és *in vivo* hatásaiban
8. *In vitro* és *in vivo* metabolikus különbségek vizsgálata, olyan *in vitro* rendszerek fejlesztése és összehasonlító vizsgálata, amelyek a 3D szövettenyésztésre és bionyomtatásra alapozva segítik az *in situ* helyzetek modellezését



### III. Módszerek

#### III.1. *In vitro* sejtvonalak, izolált primer sejtek tenyésztése és kezelése

*In vitro* vizsgálatainkban szuszpenziós és adherens sejtvonalakat használtunk. A legkülönbözőbb munkáinkban felhasznált sejtvonalakat és forrásukat, illetve alapvető tápfolyadékaikat, tenyésztéshez szükséges antibiotikumot egy táblázatban foglaltam össze (3. Táblázat). A sejteket általában 25, illetve 75 cm<sup>2</sup>-es flaskákban tenyésztettük (37°C, 5%-os CO<sub>2</sub>). Az adherens sejtek többségét 3-4 naponta, míg a lymphoma, leukémia sejteket 2-3 naponta passzálva és ellenőrizve, sejtszámolást követően tenyésztettük tovább vagy használtuk fel a kísérletekben. Az alkalmazásra kerülő induló sejt számokat előzetes munkáink alapján határoztuk meg. Az adott vizsgálatoknak és tenyésztő edénynek (25 vagy 75 cm<sup>2</sup>) vagy plate-eknek (6, 24, 48 és 96 lyukú) megfelelően (kísérlet/tenyésztés ideje, azt követő feldolgozási technika sejt szám igénye és a sejt kultúra növekedési tulajdonságai alapján meghatározott) 5-300 ezer sejt/ml sejt számmal indítottuk a kísérleteket.

#### 3. Táblázat A vizsgálatokban felhasznált sejtvonalak

Sejtvonal	Típus	Sejtvonal eredete, azonosítója	Tenyésztéshez használt médium
HT58	humán B-sejtes non-Hodgkin lymphoma	Prof. Kopper László	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + 100 U/ml penicillin+100 ug/ml streptomycin
HT58r	HT58 sejtvonal TGFβ rezisztens szubklón	HT58-ből hoztuk létre	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + 100 U/ml penicillin+100 ug/ml streptomycin
BL41	humán Burkitt lymphoma	Prof. Klein György; Karolinska Institute	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
BL41/95	humán Burkitt lymphoma	Prof. Klein György; Karolinska Institute	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
Ramos	humán Burkitt lymphoma	ATCC® CRL-1596	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
BJAB	humán EBV-negatív Burkitt lymphomák	DSMZ ACC 757	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
MED-B1 (BHD1)	humán primer mediastinalis nagy B-sejtes lymphoma	Dr. Peter Möller Patológiai Intézet, Universitat Ulm	IMDM:RPMI1640 (4:1) + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + 100 U/ml penicillin+100 ug/ml streptomycin
U266	humán myeloma (plasmocytoma)	ATCC® TIB-196™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
KMH2	humán Hodgkin lymphoma (kevert sejt altípus)	DSMZ ACC 8	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
L1236	humán Hodgkin lymphoma (kevert sejt altípus)	DSMZ ACC 530	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
Jurkat	humán akut T-sejtes lymphoid leukémia	ATCC® TIB-152™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
Daudi	humán Burkitt lymphoma	ATCC® CCL-213™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
HK2	humán vese (cortex, proximális tubulus)	ATCC® CRL-2190™	DMEM high glucose + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + 100 U/ml penicillin+100 ug/ml streptomycin
A498	humán vesecarcinoma	ATCC® HTB-44™	MEM + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + 100 U/ml penicillin+100 ug/ml streptomycin
GC3	humán colorectalis carcinoma	ATCC® CVCL_1B32	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
HCT116	humán colorectalis carcinoma	ATCC® CCL-247™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
HT29	humán colorectalis adenocarcinoma	ATCC® HTB-38™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
CaCo2	humán colorectalis adenocarcinoma	ATCC® HTB-37™	MEM + 20% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
SW480	humán colorectalis adenocarcinoma (Dukes B típus)	ATCC® CCL-228™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
SW620	humán colorectalis adenocarcinoma (Dukes C típus)	ATCC® CCL-227™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
RKO	humán coloncarcinoma	ATCC® CRL-2577™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
Colo205	humán colorectalis adenocarcinoma (Dukes D típus)	ATCC® CCL-222™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin

Sejtvonal	Típus	Sejtvonal eredete, azonosítója	Tenyésztéshez használt médium
DMS153	humán kissejtes tüdőcarcinoma	ATCC® CRL-2064™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
H1048	humán kissejtes tüdőcarcinoma	ATCC® CRL-5853™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
H146	humán kissejtes tüdőcarcinoma	ATCC® HTB-173™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
H196	humán kissejtes tüdőcarcinoma	ATCC® CRL-5823™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
HT-1080	humán fibrosarcoma	ATCC® CCL-121™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
U251 (MG) IDH1 vad	humán high grade glioma	Dr. William Leenders Radboud University Medical Center	DMEM high glucose + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + 100 U/ml penicillin+100 ug/ml streptomycin
U251 (MG) IDH1 mutáns (R132H)	humán high grade glioma	Dr. William Leenders Radboud University Medical Center	DMEM high glucose + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + 100 U/ml penicillin+100 ug/ml streptomycin
U251 (MG)	humán high grade glioma	ATCC® CVCL 0021	DMEM high glucose + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + 100 U/ml penicillin+100 ug/ml streptomycin
U87-(MG)	humán high grade glioma	ATCC® HTB-14™	DMEM high glucose + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + 100 U/ml penicillin+100 ug/ml streptomycin
U373-U vagy (MG)	humán high grade glioma	ECACC 08061901	DMEM high glucose + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + 100 U/ml penicillin+100 ug/ml streptomycin
ZR75.1 (Luminal B)	humán emlőcarcinoma	ATCC® CRL-1500™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
SKBR3 (HER2+)	humán emlőcarcinoma	ATCC® HTB-30™	DMEM low glucose + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + 100 U/ml penicillin+100 ug/ml streptomycin
MCF7 (Luminal A)	humán emlőcarcinoma	ATCC® HTB-22™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
T47D (Luminal A)	humán emlőcarcinoma	ATCC® HTB-133™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
HS578T	humán emlőcarcinoma (tripla negatív)	ATCC® HTB-126™	DMEM high glucose + 10% FBS + 4 mM L-glutamin + gentamycin
MDA-MB-231	humán emlőcarcinoma (tripla negatív)	ATCC® HTB-26™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
MDA-MB-453 (HER2+)	humán emlőcarcinoma	ATCC® HTB-131™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
MDA-MB-468	humán emlőcarcinoma (tripla negatív)	ATCC® HTB-132™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
BT474 (Luminal B)	humán emlőcarcinoma	ATCC® HTB-20™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin
BT549	humán emlőcarcinoma (tripla negatív)	ATCC® HTB-122™	RPMI1640 + 10% FBS + 2 mM L-glutamin + gentamycin

### 3. Táblázat folytatása

A munkában rendkívül sokféle kezelést alkalmaztunk, a legtöbb esetben 0-72 h idő intervallumokban, bár egyes esetekben hosszabb kezeléseket is végeztünk (utóbbiakban a kezelési koncentráció állandóságát és a sejtek tápanyag utánpótlását biztosítottuk). A bemutatott eredményekben a legkülönbözőbb anti-tumor vagy egyéb sejtciklus, jelátviteli folyamatokat, enzimeket, metabolikus enzimeket gátló *in vitro* kezelésekhez alkalmazott szereket és az alkalmazott koncentrációkat szintén egy táblázatban foglaltam össze (4. Táblázat). Az alkalmazott dózist az irodalmi adatok vagy korábbi vizsgálataink alapján választottuk ki, illetve több esetben vizsgáltunk dózis és időfüggést is.

#### 4. Táblázat In vitro kezelésekben alkalmazott szerek

Név	Alkalmazott dózis	Forrás	Célpont, mechanizmus
<b>Célzott antitest, ligand-kezelések</b>			
Cetuximab (Erbix)	10 µg/ml	Bristol-Myers Squibb	Epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) gátló
Rekombináns humán DLL4	1 µg/ml	R&D Systems	DLL4 Notch ligand (Notch útvonál)
Rekombináns humán Jagged1	1 µg/ml	R&D Systems	Jagged1 Notch ligand (Notch útvonál)
Rekombináns humán TGFβ1	1 ng/ml	R&D Systems	TGFβ1R ligand (TGFβ útvonál)
Rituximab (MabThera)	10 µg/ml	Roche	B-sejtek felszínén lévő CD20 receptor gátló
<b>Kemoterápiás, anti-tumorális kezelések</b>			
Bortezomib (Velcade)	10 nM	Millennium Pharmaceuticals, Inc.	Proteaszóma inhibitor
Ciklofoszfamid	500 nM	Baxter Oncology GmbH	DNS alkiláló szer
Ciszpaltin	0.1-10 µg/ml	EBEWE Pharma, Accord Healthcare Polska	DNS replikáció gátló
Citarabin (Alexan)	10 ng/ml	EBEWE Pharma	DNS szintézis gátló
Doxorubicin	50-100 nM	Ebewe Pharma, Teva Pharma Zrt., Merck-Sigma Aldrich	DNS interkaláló (DNS és RNS szintézis gátlása)
Etopozid (Vepesid)	50 nM	Pharmachemie B.V., Bristol-Myers Squibb	Topoizomeráz gátló
Gefitinib	1-20 µM	Cayman Chemical	Epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) gátló
Nocodazole	40-200 ng/ml	Merck-Sigma Aldrich	Mikrotubulus gátló (sejtosztódás gátlása)
Temozolomid	100-300 µM	Merck-Sigma Aldrich	DNS alkiláló szer
Vincristine	3-100 nM	Richter Gedeon	Mikrotubulusok (M-fázis blokk)
<b>mTOR inhibitorok</b>			
Dactolisib (NVP-BEZ-235)	1 µM	Cayman Chemical	PI3K/mTORC1 és C2 gátló
Ipatasertib	1 µM	Cayman Chemical	AKT gátló
Rapamycin (Sirolimus)	50 ng/ml	Merck-Sigma Aldrich	mTOR gátló
Torkinib (PP-242)	1 µM	Toctris Bioscience, R&D Systems	mTOR gátló
Vistusertib (AZD2014)	1 µM	Cayman Chemical	mTORC1/2 gátló
<b>Egyéb jelátviteli inhibitorok</b>			
BMS-303141	10 µM	Merck-Sigma Aldrich	ATP-citrát liáz gátló
Crizotinib	10 µM	Calbiochem	ALK és ROS1 gátló
DAPT (γ-Secretase Inhibitor IX)	1 µM	Calbiochem, Cayman Chemical	Notch útvonál gátló
Endothall thioanhydride (ETA)	1-10 µM	Merck-Sigma Aldrich	PPI és PP2A gátló
γ-Secretase Inhibitor XII	4 µM	Calbiochem	Notch útvonál gátló
PD98059	1-10 µM	New England Biolabs	MEK1/2 gátló
SAHMI	5 µM	Calbiochem	Notch útvonál gátló
Zaprinast	1-300 µM	Merck-Sigma Aldrich	PDE5 és PDE6 gátló
Okadaik sav	100-500 nM	Calbiochem	Foszfátáz gátló
Staurosporine	0.025-0.1 M/ml	Merck-Sigma Aldrich	Protein-kináz gátló (G1-fázis blokk)
<b>Metabolikus inhibitorok</b>			
3-brómpiruvát	100 µM	Merck-Sigma Aldrich	Glikolízis gátló
BPTES	10-20 µM	Merck-Sigma Aldrich	GLS1 gátló
D 2 hidroxiglutarát	0,5-4 mM	Merck-Sigma Aldrich	αKG antagonista
Etomoxir	50 µM	Merck-Sigma Aldrich	CPT1A gátló
Metotrexát	20 nM	Teva Pharma Zrt., Pharmachemie B.V.	Folsav antagonista
Chloroquine	50 µM	Merck-Sigma Aldrich	Malária ellenes 4-aminokinolin vegyület, autofágia gátlás
Doxycycline	10 µM	Merck-Sigma Aldrich	Antibiotikum mitokondriálisprotein szintézis gátlás
<b>Egyéb</b>			
Gamma-amino-vajsav (GABA)	5 mM	Merck-Sigma Aldrich	neurotranszmitter

### III.2. 3D spheroid tenyészetek, 3D biotinta, 3D bionymtatás

**3D sejt kultúrákat** spheroid – függőcsepp tenyészetek, ultra-low attachment plate-ek felhasználásával hoztuk létre. Előzetes vizsgálatainkban tesztelt optimális kiindulási sejtszám és tenyésztési idő meghatározása után emlőcarcinoma sejtvonalak esetében 10 ezer sejt/20 µl-es cseppekben a Petri-csésze/plate fedőre az alap médiumban 72 h tenyésztési idő után is létre tudunk hozni spheroid tenyészeteket (17. ábra). A fiziológiás mikrokörnyezet biztosítása, a cseppek kiszáradásának vagy növekedésének megakadályozása érdekében médiummal, illetve PBS-sel töltöttük fel a plateket. Elsősorban különböző kezelések hatásainak vizsgálatához ultra-

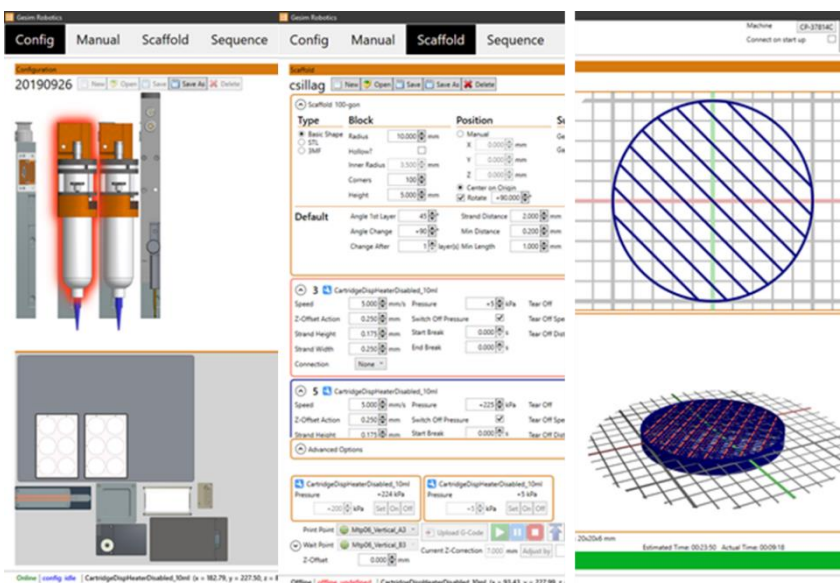
low attachment vagy poli-HEMA előkezeltekt plate-eket (poli-HEMA is gátolja a sejtek letapadását a plate-hez) is használtunk. Ebben az esetben is egysejt szuszpenzióban helyeztük el a plate-eken passzálás után az alap médiumban a sejteket (25 G-s tű használatával lehetőség segítettük a sejtek spontán aggregációjának kialakulását). Az alkalmazott kezelőszerek spheroidképzést befolyásoló hatásait vagy a spheroidot alkotó sejtek életképességét, növekedését Alamar blue teszttel, illetve mikroszkóppal ellenőriztük és fotódokumentációt is készítettünk.

### 3D függőcsepp (HD)



17. ábra Függőcsepp-tenyészetek kialakítása

**3D élőszöveteszerű struktúrák bionyomatását** a GeSiM cég Bioscaffolder 3.2-es bionyomatójával végezzük. Ehhez különböző összetételű hidrogéleket tesztelve spheroid tenyésztés mellett emlőcarcinoma sejtek esetében két speciális összetételű biotintát állítottunk össze, a szilárd mechanikai váz nyomtatásához (11% metilcellulóz + 6% alginát), illetve a sejtek nyomtatásához (3% alginát + 1% zselatin). A nyomtatási terveket a cég által fejlesztett CAD szoftver segítségével általában 2,4 mm sugarú 6-10 rétegű kör alakú struktúrákként kezdtük meg (csőváz vagy csak sejt elemeket is nyomtatva) (18. ábra). A raftokat nyomtatás után  $\text{CaCl}_2$  oldatos keresztkötés után 24-es és 96-os plate-eken a sejteknek megfelelő médiumban tenyésztjük tovább vagy azonnal xenotranszplantálhatjuk (emlőcarcinomák esetében SCID egerek emlőtájékára). Adott inkubációs idők, kezeléseket után paraffinos blokkok segítségével morfológiai és immunhisztokémia vizsgálatokat végezhetünk, illetve EDTA-s kezelésekkal biokémiai vizsgálatokhoz vagy újra 2D kultúrába vitelhez is visszanyerhetjük sejteket. Többféle sejt komponensű szöveteszerű struktúrák nyomtatását is megkezdtek tekintettel a 4 nyomtatófejre, fibroblaszt-tartalmú carcinoma sejt biotinta alkalmazásával teszteltük a több sejt nyomtatásokat.



18. ábra CAD szoftver program képernyőfotója több komponensű (váz és sejt biotinta - lila), illetve csőváz (piros) nyomtatáskor

### III.3. Primer leukémia sejtek, normál perifériás mononukleáris sejtek izolálása

CLL-es, ALL-es, valamint egészséges normál donorok perifériás (heparinnal vagy citráttal alvadástól) vérmintáiból Histopaque-1077 gradiens centrifugálással vagy szükség szerint mágneses MACS CD19 mikrogöngyökkel (Miltenyi Biotec) izoláltunk perifériás mononukleáris sejteket (PMNC), leukémiás, illetve normál B-sejteket. Adott vizsgálatokban a felhasznált minták leukémia sejtarányát, az izolálás tisztaságát áramlási citometriával ellenőriztük. Ezeket vagy azonnal felhasználtuk (áramlási citometria vagy *in vitro* tenyésztési vizsgálatok), vagy további felhasználásig  $-70^{\circ}\text{C}$ -on (pl. expresszió vizsgálatokhoz) fagyasztva tároltuk.

### III.4. *In vitro* vizsgálatokat követő proliferáció, apoptózis mérések, áramlási citometriai vizsgálatok

Az *in vitro* vizsgálatokban a kezelések proliferációt érintő hatásait a **sejtszám változások** ellenőrzése mellett, proliferációs/túlélési tesztekkel is meghatároztuk. Az **Alamar Blue tesztekben** ezekben az esetekben a 96-os plate-ken meghatározott inkubációs időt követően a kezelés utolsó 4 órájára  $10\ \mu\text{g/ml}$  végső koncentrációban Alamar blue oldatot (resazurin, 7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide, Life Technologies) alkalmaztunk. A metabolikusan aktív sejtekben viabilitásától függően az átalakuló resazurin (redukáló kapacitás) színváltozását  $570\text{-}590\ \text{nm}$ -en Fluoroskan leolvasó segítségével határozhattuk meg (abszorbancia mérés, Ascent szoftver, Fluoroskan Ascent FL, Labsystems). Ehhez hasonlóan az élő sejtek mennyiségével arányos összfehérje meghatározása az SRB teszttel lehetséges. Az **SRB tesztekben** a kísérletek végén  $10\%$  triklór-ecetsavas fixálást ( $1\ \text{h}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ) követően  $0,4\ \text{m/v}\%$  sulforhodamine B festékkel inkubáltuk a sejteket ( $15\ \text{min}$ ), majd a festék oldását követően az abszorbancia értékeket  $570\ \text{nm}$ -en Multiskan MS mikroplate leolvasóban határoztuk meg. A proliferáció százalékos arányát a kontroll mintákhoz viszonyítva adtuk meg.

Az apoptózis detektálásának egyik érzékeny módja a **kaspáz aktivitás** emelkedésének igazolása a sejtek lizátumai, illetve meghatározott szubsztrátok segítségével. Ezekben a vizsgálatokban a kísérletek végén  $5 \times 10^5$  sejtet kaspáz pufferben ( $50\ \text{mM}$  HEPES ( $\text{pH}=7,4$ ),  $100\ \text{mM}$  NaCl,  $0,1\%$  (w/v) CHAPS,  $10\%$  (w/v) szukróz és  $10\ \text{mM}$  DTT –  $100\ \text{ml}$ ) vettük fel, majd 96-os plate-en Triton X-100-zal ( $0,2\%$ ) permeabilizáltuk a sejteket a Z-DEVD-AMC ( $20\ \mu\text{M}$ ) kaspáz szubsztrát hozzáadását megelőzően. A felszabaduló 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) fluoreszcenciáját  $15$  percig detektáltuk Fluoroskan Ascent készülékben – excitáció  $380\ \text{nm}$ , emisszió  $445\ \text{nm}$ . Több alkalommal használtunk specifikus **kaspáz gátló kezeléseket** is, amelyek segítségével a detektált sejtpusztulás kaspáz-, illetve kaspáz-9, -8 függését határozhattuk meg (Z-VAD-fmk – általános kaspáz gátló, Z-IETD-fmk kaspáz-8, Z-LEHD-fmk kaspáz-9 gátlók  $50\text{-}100\ \text{mM}$ ). Az apoptózis mechanizmusokban a sejthalál receptorok szerepét hasonló módon specifikus inhibitorok kombinált alkalmazásával tesztelhetjük (rekombináns TRAIL-R2Fc  $100\ \text{ng/ml}$ , monoklonális anti-human TNF-alfa  $1\ \text{ng/ml}$  vagy NOK-1/antiFASL antitest  $1\ \text{ng/ml}$ ).

Az indukált **apoptózis** mértékét leggyakrabban **áramlási citometriai mérésekben** határoztuk meg. Ehhez a sejteket  $-20^{\circ}\text{C}$ -os,  $70\%$ -os etanolban fixáltuk, majd lúgos extrakció ( $200\ \text{mM}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{pH}$   $7,4$  és  $100\ \mu\text{g/ml}$  RNase) után  $10\ \mu\text{g/ml}$  etidium-bromid festést

alkalmazva a sejtek DNS tartalmát FACScan áramlási citométeren (BD Biosciences) mintánként 10-20 ezer sejtet mérve WinList (Verity Software House) és CellQuest™ (BD) szoftverrel értékeltük. Áramlási citometriai vizsgálatainkban természetesen bizonyos fehérjék, sejtfelszíni markerek vagy permeabilizálást követő intracelluláris fehérjék vizsgálatát is elvégeztük; pl. leukémia marker analízisek CD5, CD19 a B-CLL sejteken, ALL sejtek fenotipizálása, illetve intracelluláris p-S6, p-HisztónH3 expresszió meghatározások. A **mitokondrium transzmembrán potenciál változását** DiOC6(3)-mal (10 nM) és propidium jodiddal (10 µg/ml) festett sejtek esetében határoztuk meg szintén áramlási citometriai analízis segítségével.

### ***III.5. Foszfátáz aktivitás mérés***

A foszfátázaktivitást Non-Radioactive Serine/Threonine Phosphatase Assay Systemmel (V2460, Promega) végeztük a forgalmazó leírása szerint.  $10^7$  sejt lizátumából Sephadex G-25 oszlopokon távolítottuk el a szabad foszfátot, majd 2 µg fehérjének megfelelő kivonat aktivitását imidazol tartalmú enzimspecifikus reakciópufferben 1 mM foszfopeptid és Molibdate Dye/Additive hozzáadásával mértük le (OD 620 nm-en). Az enzimspecifikus reakciópuffer és foszfopeptid szubsztrát alkalmazásával az assay a PP2A foszfátáz aktivitását határozza meg.

### ***III.6. Molekuláris vizsgálatok***

#### ***III.6.1. Notch inhibitor rezisztens HL sejtvonalak onkogén mutációinak, illetve más sejtek IDH mutációjának vizsgálata***

A mutációs vizsgálatok esetében  $3 \times 10^6$  sejtől DNS Mini Kittel izolált DNS-t használtunk. Az FBXW7 5, 9, 10 és 11-s exonjait vizsgáltuk – ezekben van leggyakrabban mutáció, ezeket amplifikáltuk a megfelelő primerek segítségével (FBXW7 5: sense 5'-TGTGAGTTTTCTTTATAAGCCTGT antisense 5'-CAAATAACACCCAATGAAGAATG FBXW7 6: sense 5'-TCAGAGTGCAGAATTATATTTATCAAG antisense 5'-TTTCAGAATCACTCTGCTTTTCA FBXW7 9: sense 5'-TTTAAATCACTTTTCTTTCTACCC antisense 5'-AGGGCCCAAATTCACCAATA FBXW7 10: sense 5'-TTGAAAATGGTTGTTGCTGTG antisense 5'-TGGATCAGCAATTTGACAGTG FBXW7 11: sense 5'-TCCTCTTCCCCCTTTCTAC antisense 5'-GAGGTTGACTCTTTTGTGATGC.). Amplifikálás (Ready Mix, Thermo Scientific) után BigDye Sequencing Kittel (Applied Biosystems) szekvenáltunk, majd NucleoSEQ (Macherey-Nagel) oszlopot használtunk a kapilláris gélelektroforézist megelőzően (Genetic Analyzer 3500 – Applied Biosystems) A PIK3CA 9-es és 20-as exonját piroszekvenálással Katsuhiko Noshó és munkatársai protokollja alapján végeztük el (298). A HL sejtvonalak esetében 50 onkogén mutációs forrópont vizsgálatát új generációs szekvenálással az Oncompass Medicine – Molekuláris diagnosztika segítségével elemeztük (a hg 19 humán referencia genomhoz hasonlítva; Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2, Life Technologies). Az IDH1 és IDH2 gén vizsgálatához AmpliTaqGold Master Mix amplifikáció (IDH1 4. forward: AAAACTTTGCTTCTAATTTTCTCTTT, reverz: ACATACAAGTTGGAAATTTCTGG; IDH2 4. forward: TCTAGACTCTACTGCCTTCTCTC, reverz: GTCAGTGGATCCCCCTCTCCA) és tisztítás után szintén direkt szekvenálás (BigDye 3Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Genetic

Analyszer 3500 – Applied BioSystem) történt az intézet Molekuláris Onkohematológia Laboratóriumában.

### **III.6.2. PCR vizsgálatok (mRNS, miRNS expresszió analízis)**

Az RNS-t (Qiagen) PureLink Micro-to-Midi RNS-izoláló kittel, a miRNS-t mirVana™ miRNA izoláló kittel (Ambion, St. Austin, US) izoláltuk, majd felhasználásig -70°C-on tároltuk. Expresszió vizsgálatkor 0,25-1 µg RNS-ből MMLV reverz transzkriptázzal (Invitrogen) és random hexamer primerekkel (Invitrogen) cDNS-t készítettünk. RedTaq (Sigma) vagy FailSafe™ (Epicentre Technologies) polimerázzal a primereknek (NOTCH1 sense (s) 5' ACT TCC ACT GCG AGT GCC antisense (as) 5' AGG CAA CGG TAG AAG GGG; NOTCH2 s 5' CTG GAT GCA GGT GCA GAT GCC AAT GC as 5' GCA GAA GTC AAC ACG GTG CCT GGA GG; NOTCH3 s 5' TGT GGA CGA GTG CTC TAT CG as 5' TGA CTC GGT CCT TGC AGA C ; NOTCH4 s 5' TCA GCT CCC TGC CTG AAC as 5' GTC CTT ACA TAT CTG CTT GGG; JAGGED1 s 5' TCG CTG TAT CTG TCC ACC TG as 5' AGT CAC TGG CAC GGT TGT AG; JAGGED2 s 5' GAT TGG CGG CTA TTA CTG TG as 5' AGG CAG TCG TCA ATG TTC TC ; DELTA1 s 5' AGA CGG AGA CCA TGA ACA AC as 5' TCC TCG GAT ATG ACG TAC AC; AKTIN s 5'GTG GGG CGC CCC AGG CAC CAC CA as 5' CTC CTT ATT GTC ACG CAC GAT TTC; Deltex s 5'AGA AGT TCA CCG CAA GAG GA as 5'AGC CAG CAC GTT GTC TAG GT Smad4 s 5'GTG GAA TAG CTC CAG CTA TC as 5'CGG CAT GGT ATG AAG TAC TCC TIEG s 5'ACA GGA GAA AAG CCT TTC as 5'AGC TTT TAC ATC ACC ACT GGC TCC, *Smad2* s 5'ACA AGA GGC TGT TTT CCT AG antisense 5'GAG AGC CTG TGT CCA T; *Smad3* s 5'AAC AAG AAT GCA GCA GTG GA as 5'ATG GTG CAC ATT CGG GTC AA; *Smad4* s 5'GTG GAA TAG CTC CAG CTA TC as 5'CGG CAT GGT ATG AAG TAC TCC; *Smad6* s 5'ACC ACC ATG GAA TCT CCG CCA CCT CCC TAC as 5'CCG CCA CTA TCT GGG GTT G; *Smad7* s 5'TCC TTA CTC CAG ATA CCC GAT as 5' ACG CCT TCT CGT AGT CGA AAG; *TGFβ1* s 5'GCC CTG GGA CAC CAA CTA TTG C as 5'GCT GCA CTT GCA GGA GCG CAC; *TIEG* s 5'ACA GGA GAA AAG CCT TTC AGC as 5'TTT TAC ATC ACC ACT GGC TCC) megfelelő annellálási hőmérséklet mellett 26-30 amplifikációs ciklus után a termékeket 1,5 %-os, etídium-bromidos agaróz gélben választottuk szét és Kodak Image Station 4000 MM kamerával dokumentáltuk az eredményeket. Valós idejű PCR-hez TaqMan Assay-On-Demand Gene Expression (ABI) termékeket használtunk (HES-1: Hs00172878\_m1, HERP1: Hs01012057\_m1; NRARP: Hs01104102\_s1; TIEG: Hs00921811\_m; c-myc: Hs00153408\_m1, TIEG: Hs00921811\_m; c-myc: Hs00153408\_m1). A génexpresszió relatív értékét a belső kontrollként szolgáló β-aktin, GAPDH háztartási gének expressziós szintjéhez (TaqMan Control Reagents, ABI) normalizáltuk.

A miRNS-ek esetében cDNS TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit és Taqman MicroRNA Assay Kitekben található stem-loop RT primereket használtuk [(hsa-miR-16 (Assay ID: 000391), hsa-miR-21 (Assay ID: 000397), hsa-miR-24 (Assay ID: 000402), hsa-miR-29b (Assay ID: 000413), hsa-miR-128b (Assay ID: 000589), hsa-miR-142-3p (Assay ID: 000464), hsa-miR-155 (Assay ID: 000479), hsa-miR-223 (Assay ID: 000526), RNU6B (Assay ID: 001093). Ezt követően real-time PCR TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) és TaqMan MicroRNA Assay Kitek segítségével határoztuk meg a miR-16, 21, 24, 29b, 128b, 142-3p, 155, 223; belső kontrollként RNU6B szintjéhez (Applied Biosystems) normalizáltunk. A Ct (threshold cycle) értékek alapján kapott eredményeket 7500 software v.1.3.0-, és DataAssist v.2.0 program (Applied Biosystems) segítségével értékeltük. ALL sejtek

esetében egészséges donorok perifériás véréből izolált mononukleáris sejtek (PMNC), T-sejtek, valamint tonsilla palatinából izolált B-sejtek miRNS expresszióját is összehasonlítottuk, melyek esetében a vizsgált miRNS esetében nem találtunk szignifikáns különbséget. Így normál PMNC expresszióját 100%-nak, azaz 1-nek tekintettük az összehasonlításokban. Mivel jelentős különbségeket a vizsgált miRNS-ek esetében a vér és csontvelői mononukleáris sejtek esetében sem találtunk szignifikáns eltérést, ezért perifériás vér és csontvelői mintákat is fel tudtunk használni kísérleteinkben. Pozitív kontrollnak – irodalmi adatok alapján – a vizsgált miRNS-eket fokozottan expresszáló lymphoma (BHD1, diffúz, nagy, B-sejtes lymphoma) sejtvonalat alkalmaztunk.

### **III.6.3. *Smad4* siRNS csendesítés**

A *Smad4* gén expresszió csendesítéséhez szintetikus siRNS-t alkalmaztunk (sense: r(CAU-CCU-AGU-AAA-UGU-GUUA)dTdT; antisense: r(UAA-CAC-AUUUAC-UAG-GAUG)dAdG; Qiagen); kontrollként fluoreszcenncel jelölt negatív kontroll siRNS-t használtunk (Qiagen).  $3 \times 10^6$  sejtet 4 ml tápfolyadékban 24  $\mu$ l HiPerFect reagens (Qiagen) és 24 nM siRNS mellett transzfektáltuk. A transzfekció hatásfokát fluoreszcens negatív kontroll és *Smad4* siRNS-el ko-transzfektált mintákból áramlási citometriával határoztuk meg. A *Smad4* jelenlétét mRNS szinten RT-PCR-rel vagy, fehérjeszinten Western blottal; illetve a *Smad4* aktivitását követő TIEG mRNS expresszió változást RT-PCR vizsgálatával is ellenőriztük.

### **III.6.4. *RICTOR* amplifikáció vizsgálatok**

A paraffinba ágyazott SCLC minták, illetve az SCLC sejtvonalakból készült sejtblokkok valamint a humán rhabdomyosarcoma esetekben a *RICTOR* amplifikációt fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) segítségével mutattuk ki. A deparaffinálás Vysis IntelliFISH (Abbott Molecular) kezelés és proteáz emésztés után *RICTOR* (#*RICTOR*-20-OR; Empire Genomics, Williamsville, NY, USA) és speciális 5-ös kromoszóma (*Chr5*) kontroll (#*CHR05*-10-GR; Empire Genomics) próba hibridizációval történt. A reprezentatív területek kiválasztás után zajlott a reakciók értékelése, amiben úgynevezett hotspotokra figyelve két független vizsgáló értékelt legalább 2-2 területen 30 sejtmagot (narancsszínű *RICTOR* és zöld *Chr5* szignálok számolásával), ezek segítségével meghatározhatóvá vált a *RICTOR/Chr5* arányt. 4 alatti *RICTOR* kópiaszám, illetve 2 alatti *RICTOR/Chr5* arány esetén a mintákat *negatívnak*, 6 feletti *RICTOR* kópiaszám vagy 2 feletti *RICTOR/Chr5* arány esetén *pozitívnak* tekintették. A kettő között bizonytalan értékelést fogadtunk el.

Rhabdomyosarcomák esetében a bizonytalan esetek tisztázásához droplet digital PCR technikával beállítottuk az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben a Rictor amplifikáció vizsgálatot, ehhez ismert Rictor amplifikációval rendelkező, illetve ezzel nem rendelkező tüdő sejtvonalakat használtunk fel. Droplet digital PCR (ddPCR) vizsgálatához a DNS-t 10- $\mu$ m vastag paraffinos metszetekből QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Valencia) segítségével izoláltuk; 30 ng DNS-t használtunk *RICTOR* FAM probe (dHsaCNS608884235; Bio-Rad) and AP3B1 HEX (dHsaCP2500348, Bio-Rad) próbákkal. A dropletet Bio-Rad Automated Droplet Generator (Bio-Rad) készülék segítségével készülték, a mérés 96-os platen C1000 Touch thermal cycler-el (Bio-Rad) (95°C 10 min, majd 40 ciklus - 94°C 30 s, 60°C 1 min, és 98°C 10 min) zajlott. A leolvasást Bio-Rad QX200 droplet reader,



az analízist QuantaSoft szoftverrel (version 1.2.10; Bio-Rad) végeztük. Ha a RICTOR/AP3B1 arány 2 vagy annál magasabb értéket mutatott abban esetben értékeltük amplifikáltnak az esetet.

### ***III.7. Expresszió vizsgálatok fehérje szinten***

#### ***III.7.1. TGF $\beta$ , p-4EBP1 illetve p-S6 ELISA mérések***

Az ELISA kitek leírásának megfelelően 1 millió sejtet 100  $\mu$ l proteáz és foszfatáz gátlókat tartalmazó lízis pufferben lizáltuk, majd meghatároztuk a fehérjetartalmat. Szendvics ELISA kitet használtunk a p-4EBP1 – Thr37/46, p-S6 detektálására (PathScan-ELISA kit, Cell Signaling), illetve a TGF $\beta$  mennyiségi meghatározáshoz Human TGF $\beta$  ELISA kitet (Invitrogene BMS249-4) alkalmaztunk gyártók utasításainak megfelelően. Az abszorpciót és az optikai denzitást (OD) 450 nm-es hullámhosszon mértük.

#### ***III.7.2. Western blot és WES Simple analízis***

**Western blot** vizsgálatokban a sejteket a legtöbb esetben SDS mintapufferben lizáltuk majd a vizsgálandó fehérjének megfelelően 10-50  $\mu$ g mennyiségű fehérjét 8-15%-os SDS gélen elektroforézissel választottunk el és PVDF membránra (Bio-Rad) blottoltuk. Blokkolást követően a membránt primer ellenanyagokkal inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on. Másodlagos ellenanyagként Vectastain Elite ABC másodlagos előhívó kitet (Vector) használtunk, majd a membránokat kemilumineszcens előhívás után (ECL Western Blotting Substrate, 54 Pierce) KODAK Image Station 4000 MM kamerával (Eastman Kodak) vagy vizsgálatunk egy részében és jelenleg C-digit (LI-COR) fotódokumentációs rendszerrel fényképeztük, majd denzitometráltuk az eredményeket. Loading kontrollként, illetve a minták összehasonlításának biztosítása érdekében  $\beta$ -aktin expresszió vizsgálatot is végeztünk reblottolással.

Legújabb vizsgálatokban **WES Simple** fehérje mennyiségi összehasonlításokat WES System (ProteinSimple-Biotechnie 004–600) készülékben kapilláris elektroforézissel 12–230 kDa-os modulon (ProteinSimple SM-W004) anti-nyúl (ProteinSimple DM-001) és anti-egér előhívó kitekkel (ProteinSimple DM-002), szükség szerint HRP konjugált anti-egér IgG antitestekkel detektáltuk a primer antitest kötött fehérjéket. A saját beállításaink alapján kombinálható elsődleges antitesteknek megfelelően 0,2 vagy 1  $\mu$ g/ $\mu$ l fehérje koncentrációjú sejtlizátumok  $\sim$ 2  $\mu$ l-ének felhasználása mellett a protokoll leírásnak megfelelően akár 3-4 fehérje analízisét végeztük el egy-egy kapillárisban alapértelmezett beállítások mellett. Az elektroferogramokat ellenőriztük, majd szükség szerint az automatikus csúcsérzékelést manuálisan korrigáltuk, hogy Western blothoz hasonló dokumentációkat vagy denzitometrált, normilalizált, a fehérjék mennyiségét jellemző értékeket határoztunk meg. Ezek segítségével a kezelt és kezeletlen, vagy más összehasonlítandó minták fehérje expressziós változásait igen kis mennyiségű rendelkezésre álló minta esetében is el tudtuk végezni. A vizsgálatokban felhasznált ellenanyagokat egy az immunhisztokémiai vizsgálatok hígításait is tartalmazó közös táblázatban foglaltam össze (5. Táblázat).

### ***III.7.3. In situ fehérje expressziós vizsgálatok (IHC, immuncitokémia, fluoreszcens immuncitokémia és Duolink módszerekkel)***

#### ***III.7.3.1. Immuncitokémia, fluoreszcens immuncitokémia, Duolink***

Sejtvonalakból készített egysejt szuszpenziós mintáink, illetve izolált leukémia sejtek esetében gyakran készítettünk cytospin lemezeket, ill. Az adherens sejtvonalak esetében fedőlemeze vagy labtek lemezekre növesztett sejteket használtunk fel immuncitómiai vizsgálatainkban. Ezekre adott fehérjék expressziójának vizsgálatát, a fehérje intracelluláris lokalizációjának meghatározását peroxidáz előhívórendszer esetében diaminobenzidin (DAB) reakcióval (barna) hematoxilin háttérfestés mellett vagy fluoreszcens jelzett másodlagos ellenanyagok felhasználásával és DAPI háttérfestéssel vizsgáltuk. A lemezek fixálása általában metanolban zajlott, de természetesen az elsődleges ellenanyag, illetve a várható lokalizáció is befolyásolta ezt. Az elsődleges ellenanyagokat éjszaka, 4°C-on vagy 90 percig szobahőn használtuk, majd majd másnap peroxidáz vagy fluoreszcensen jelzett másodlagos előhívó rendszereket alkalmaztunk (pl. Novolink polimer rendszer vagy Vectastain előhívás). Az áramlási citometriai vizsgálatokhoz folyadék fázisban is végeztünk jelöléseket pl. anti-foszfo-S6 és anti-foszfo-Hisztón-H3 ellenanyagok esetében. Áramlási citometriával 5-20 ezer sejt átlagos fluoreszcencia intenzitását (MFI) is meghatároztuk az összehasonlítások vagy expresszió változások értékelése esetében. Ugyanezen mintákat szükség szerint konfokális mikroszkóppal is analizálhattuk DAPI magfestéssel kombinálva.

Duolink festésekben, egymással komplexben, megfelelő távolságon belül található fehérjék vagy egy fehérje pl. foszforilált formája mutatható ki kvantitatív értékeléssel kiegészítve. Ezekben a vizsgálatokban a natív cytospineket 4%-os paraformaldehidben 10 percig fixáltuk, majd permeabilizáltuk, és blokkolás után kétféle elsődleges ellenanyaggal 2 órán keresztül inkubáltuk (riboszómális S6 és p-S6 – Cell Signaling –, illetve Rictor és mTOR – Bethyl – eltérő forrású „nyúl, illetve egér” ellenanyagok) a lemezeket. A primer ellenanyagok kötődését követően, gyári oligonukleotidokkal jelzett másodlagos ellenanyagokkal inkubáltuk a lemezeket. Ezek az úgynevezett meghatározott oligokkal konjugált anti-egér, anti-nyúl ellenanyagok (PLA – proximity ligation assay ellenanyagok), amelyek abban az esetben, ha megfelelő, 200 nm távolságon belül helyezkednek el, ligálhatóak. Majd egy cirkuláris amplifikációs reakció segítségével megsokszorozhatók, és egy hibridizációs próba segítségével láthatóvá, szignálként számolhatóvá tehetők, elemezhetőek. A digitális képeken (pl. BlobFinder programban), így a komplexben levő fehérjék vagy a kis mennyiségben jelenlevő fehérje változatok expressziójának kvantitatív meghatározása egy sejtre vonatkoztatva is lehetséges.

#### ***III.7.3.2. Immunhisztokémia***

A paraffinos blokkokból készült biopsziás vagy TMA metszeteket deparaffináltuk, majd endogén peroxidáz blokkolás után az antigéneket megfelelő pufferben (leggyakrabban citrát pH 6 vagy ritkábban TRIS, EDTA pH 9) elektromos kuktában (21 perc) tártuk fel. A metszeteket lószérumos blokkolás után az elsődleges ellenanyagok meghatározott hígításaival (5. Táblázat) éjszaka 4°C-on nedves kamrában inkubáltuk. Majd Novolink (Novocastra), illetve Vectastain (Vector) másodlagos előhívó rendszereket használtunk, DAB kromogénnel, hematoxilin háttérfestés mellett. Immunhisztokémiai vizsgálataink során, teljes biopsziás mintákat, sejtblokkokat és több független TMA (tissue micro array) blokk sorozatot vizsgáltunk.

Utóbbiak készítéséhez az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet archivált formalinban fixált, paraffinba ágyazott biopsziás mintáiból gyűjtöttünk blokkokat és a reprezentatív területekből 2 mm átmérőjű szövethengereket szűrtünk ki és illesztettünk be a 70 mintás TMA blokkokba.

Az IHC vizsgálatokat legalább két független patológus segítségével értékeltük. A szöveti mTOR aktivitás vizsgálatokban leggyakrabban (pl. a lymphomák és coloncarcinomák esetében) a p-mTOR, p-S6, p-p70S6K, illetve p-4EBP1, és amennyiben lehetőség volt a p-Ser473-Akt festéseket +, ++, +++-el értékeltük. Pl. lymphomákban a p-Ser473-Akt (mTORC2 target) festések nem működtek megbízhatóan (valószínűleg amiatt, mert a molekuláris vizsgálatok miatt a szövetek natívan érkeznek), míg más szolid daganatok esetében ennek a festésnek az értékelése is lehetséges. Belső kontrollnak az értékelésnél a plazmasejteket tekintettük, ezek magas mTOR aktivitása, igen intenzív IHC jelölődést eredményezett a p-mTOR és p-S6 festések esetében, ezt tekintettük +++ intenzitású értéknek. Tumorok esetében általánosan, ha a daganatsejtek több mint 10%-a már mutatta a magasabb intenzitású festődést, akkor azt a magasabb értéket társítottuk az esethez. Jellemzően magas mTOR aktivitásúnak azokat az eseteket értékeltük, ahol az mTOR aktivitását jelző markerek közül ++ vagy +++ értékelést kapott legalább kettő. A lymphomákat érintő vizsgálatainkban egy lymphoma típust abban az esetben értékeltünk jellegzetesen magas mTOR aktivitásúnak, ha a vizsgált esetek több mint 50%-ában magas mTOR aktivitást határoztunk meg. A Rictor és Raptor festődése általában nem mutatott tumoron belül heterogenitást, így a festődés intenzitását lymphomák esetében az előbbihez hasonlóan értékeltük, és a két intenzitás különbségei alapján az mTORC1-mTORC2 eltolódást tudtuk értékelni. Abban az esetben állapítottuk meg valamelyik mTOR komplex dominanciáját, ha legalább + eltérést tapasztaltunk a két festés értékelésében. Számos esetben, amikor pl. a metabolikus fehérjék *in situ* festéseit értékeltük az előbbieket mellett H-score értékelést is végeztünk, a H-score értéket 0 és 300 között úgy számoltuk, hogy a festési intenzitást (0-3+) megszoroztuk az egyes sejtek intenzitásának százalékaival (0-100%).  $H\text{-score} = 1 \times (1+ \text{intenzitással festődő sejtek \%}) + 2 \times (2+ \text{intenzitással festődő sejtek \%}) + 3 \times (3+ \text{intenzitással festődő sejtek \%})$  (299). A végső H-score értéket az esethez tartozó TMA core-ok (több független értékelés) H-score értékeinek átlagával adtuk meg. Abban az esetben ahol ennek segítségével alacsony és magas expresszió értékelést adtunk, ott cut-off értékeket határoztunk meg a medián H-score értékek segítségével. A medián alatti értékű eseteket alacsony, míg a mediánnal megegyező vagy afeletti H-score értékkel rendelkező eseteket magas expressziójúnak tekintettük.

A SLCL Rictor amplifikációs vizsgálatunkban a p-Akt immunhisztokémiai reakciók értékelés, mint IHC előszűrési módszer alkalmasságát is teszteltük. A korábban leírt H-score értékelés helyett az egyszerűbb, csak a pozitív sejtek %-os arányának meghatározásán alapuló módszert vettük figyelembe. Az erősebb intenzitással festődő területekre koncentráltunk és ott legalább 500 daganatsejt vizsgáltunk. A RICTOR amplifikációval összevetve az immunhisztokémia szenzitivitását és specifitását is vizsgáltuk a Rictor és p-Ser473-Akt festéseket, ahol a kategóriákat *negatív* (nincs/alacsony expresszió), illetve *pozitív* (közepes/magas expresszió) csoportokba soroltuk.

**5. Táblázat A különböző módszerekben (immunhisztokémiai festések - IHC, immuncitokémia - ICC, Western blot - WB, Wes Simple WES) felhasznált ellenanyagok listája, azonosítói és adott módszer esetében alkalmazott hígítása**

	antitest	azonosító	gyártó	IHC	ICC	WB	WES	felhasználás oka
mTOR komplex elemei vagy aktivitását jelző foszfo-proteinek	mTOR	#2972	Cell Signaling Technology	1:100	1:100	1:100	1:50	mTOR kináz mennyisége
	p-mTOR (Ser2448)	#2976	Cell Signaling Technology	1:100		1:1000	1:50	mTOR aktív formája
	Raptor	#89603 / 623202	Novus / Biolegend	1:100		1:500	1:50	mTORC1 komplex mennyisége
	p-4EBP1	#2855	Cell Signaling Technology				1:50	mTORC1 aktivitás jele
	p-p70S6K	#9234	Cell Signaling Technology	1:100		1:500		mTORC1 aktivitás jele
	p-S6 (Ser 235/236)	#2211	Cell Signaling Technology	1:100	1:100	1:1000	1:50	mTORC1-p70S6K aktivitás
	S6	#2317	Cell Signaling Technology					ribosomális S6
	Rictor	#2140 / #A500-002	Cell Signaling Technology	1:1000	1:1000	1:1000	1:50	mTORC2 mennyisége
	p-(Ser473)-Akt	#4060 (D9E)	Cell Signaling Technology	1:100				mTORC2-aktivitás jele
	pan-Akt	#2920	Cell Signaling Technology			1:1000		Akt teljes mennyisége
proliferáció, apoptózis vizsgálataok	p-HistonH3	#9701	Cell Signaling Technology	1:50				mitotikus sejtek kimutatás
	cleaved-caspase 3	#9661	Cell Signaling Technology	1:50		1:500		apoptotikus sejtek kimutatása, aktív kaszpáz 3
	Bcl-2		Dako	1:50		1:1000		anti-apoptotikus fehérje
	Bcl-XL	MA5-15142	Invitrogene	1:50		1:1000		anti-apoptotikus fehérje
	Bax	127606	Novus			1:1000		pro-apoptotikus fehérje
Bid	MA5-32642	Invitrogene			1:1000		pro-apoptotikus fehérje	
metabolikus vizsgálatok	HK2	#2867	Cell Signaling Technology			1:1000	1:50	glikolízis
	p-AMPK	#2535	Cell Signaling Technology	1:100		1:1000	1:50	AMPK-aktív formája
	GLUT1	ab652	Abcam	1:400				glükózztranszporter
	GAPDH	ab8245 (6C5)	Abcam	1:600				glikolízis
	ATPB	ab14730 (3D5)	Abcam	1:100				oxidatív foszforiláció
	CPT1A	ab128568 (8F6AE9)	Abcam	1:500		1:1000	1:50	zsírsavak béta-oxidációja
	MCT1	A304-358A	Bethyl	1:100				laktát- és acetátfelvétel
	ACSS2	#3658 (D19C6)	Cell Signaling Technology	1:200				acetáthasznosítás
	GLS	ab156876 (EP7212)	Abcam	1:200			1:50	glutaminolízis
	LDHA	#3582	Cell Signaling Technology	1:400		1:1000		piruvát-laktát átalakítás
	LDHB	#85319	Abcam			1:2000		laktát-piruvát átalakítás
	PFKP	#8164	Cell Signaling Technology	1:100			1:50	glikolízis
	ASCT2	#A304-353A	Bethyl			1:2000		glutamintranszport
	LC3	#110-57179	Novus				1:50	autofágia marker
	GAT1	ab426	Abcam				1:50	GABA-transzporter
	SSADH	#129017	Abcam	1:500		1:1000		aminosav anyagcsere
	FASN	#3180	Cell Signaling Technology	1:100		1:1000	1:50	zsírsavszintézis
COXIV	#4880	Cell Signaling Technology				1:50	terminális oxidáció, elektrontranszport lánc 4	
G6PDH	ab133525	Abcam	1:100				glikolízis	
ALDH1A1	#54135	Cell Signaling Technology				1:50	őssejtmarker	
p-Acly	#4331	Cell Signaling Technology			1:1000	1:50	zsírsavszintézis	
PDH	#3205	Cell Signaling Technology			1:1000	1:50	piruvát-acetil-KoA átalakulás	
jelviteli folyamataok vizsgálata	c-Notch1-1	#2421	Cell Signaling Technology	1:100		1:1000		aktív Notch szignál jele, hasított Notch-1 fehérje
	NICD	NBP1-48289	Novus			1:1000		teljes Notch és hasított Notch fehérjék
	Smad2	sc-393312	Santa-Cruz			1:500		Receptor asszociált Smad
	Smad3	sc-101154	Santa-Cruz		1:100	1:1000		Receptor asszociált Smad
	p-Smad2	#3108	Cell Signaling Technology		1:100	1:1000		aktivált Smad2
	Smad4	sc-7966	Santa-Cruz			1:1000		Co-Smad
	Smad6	sc-25321	Santa-Cruz			1:500		inhibitor Smad
	Smad7	sc-365846	Santa-Cruz			1:500		inhibitor Smad
	p-JNK	#4668	Cell Signaling Technology			1:1000		aktív JNK
	p-ERK1/2	#4370	Cell Signaling Technology			1:2000		aktív Erk
p-p38 MAPK	#4511	Cell Signaling Technology			1:1000		aktív p38 MAPK	
b-aktin	a2228	Sigma-Aldrich-Merck			1:2000	1:50	WB/WES loading kontroll	

### **III.8. Metabolikus folyamatok karakterizálásához beállított és felhasznált analitikai és biokémiai mérések**

#### **III.8.1. Tumorsejtek szubsztrát oxidációjának vizsgálata radiaktívan jelölt acetát és glükóz segítségével**

A sejtvonalakat a vizsgálat ideje alatt speciális, tápanyagszubsztrát szegény (glükóz-, glutamin- és acetátmentes) DMEM D5030 médiumba tartottuk, majd 0,2  $\mu\text{Ci/ml}$  nátrium-[1- $^{14}\text{C}$ ]-acetátot vagy [1- $^{14}\text{C}$ ]-glükózt adtunk a tenyészetekhez. Ezt követően egy óra alatt meghatároztuk az áramlási kamrában az azonos légköri nyomás mellett  $\text{CO}_2$  mentes levegőbe a sejtek által kilélegzett  $\text{CO}_2$  radioaktivitását („kilégzési teszt”). A kamrában egy alacsony nyomású helyen egy alkalikus filter kártya (MTA Izotóp Intézet Zrt. biztosította) fogta fel a  $\text{CO}_2$ -t. Egy óra elteltével a médiumban oldott  $\text{CO}_2$ -ot citromsavval további inkubálva ( $60^\circ\text{C}$ ) szabadítottuk fel és szintén az alkalikus kártyán mértük. Végül a kötődött  $\text{CO}_2$  radioaktivitását, a beütések számát ikercsatornás Geiger-Müller számlálóban mértük.

#### **III.8.2. Intracelluláris metabolitok mennyiségi meghatározása LC-MS-sel**

Az intracelluláris metabolitokat – laktát (LAC), piruvát (PYR), citrát (CIT),  $\alpha$ -ketoglutarát (aKG), szukcinát (SUC), fumarát (FUM), malát (MAL), glutamát (GLU), aszpartát (ASP) – kis módosításokat követően Szoboszlai és mtsai. közleményében leírtak szerint végeztük (300). Az extrakciót szubkonfluens sejtekből, felülúszóból, vezikula preparátumokból és xenograft tumorszövetből (folyékony nitrogénben porítás)  $4^\circ\text{C}$ -on készítettük („quenching”). A metabolitokat a sejtekből, felülúszóból metanol-kloroform-víz (9:1:1) eleggyel extraháltuk, majd  $4^\circ\text{C}$ -on centrifugáltuk, és ezután a felülúszókat  $-80^\circ\text{C}$ -on tároltuk a folyadékkromatográfiai-tömegspektrometriai (LC-MS) mérésig. Kalibrációs görbékhez analitikai minőségű standard hígítási sorokat (0,5–50  $\mu\text{M}$  laktát, piruvát, citrát, aKG, szukcinát, fumarát, malát, glutamát, aszpartát) használtunk, majd adott  $\text{ng}/10^6$  sejtkoncentrációt használtuk fel a metabolit arányszámításainkhoz. Méréseket Perkin-Elmer Flexar FX10 ultrateljesítményű folyadékkromatográf és Sciex 5500 QTRAP tömegspektrométerrel végeztük el. Szoboszlai Norbert és Mészáros Katalin segítségével állítottuk be a méréseket. A kromatográfias elválasztás Phenomenex Luna Omega C18 oszlop segítségével zajlott. A mozgófázis vízből és 0,1% (v/v) hangyasavat tartalmazó metanolból állt. Az MS-t negatív elektropray ionizációs módban használtuk, a mérések beállításai: állandó hőmérséklet:  $300^\circ\text{C}$  ionizációs feszültség:  $-4000\text{ V}$ , belépési potenciál:  $-10\text{ V}$ , zárógáz: 35 psi, gáz1: 35 psi, gáz2: 35 psi, CAD-gáz: közepes. A kvantitatív elemzések elvégzéséhez többszörös reakciófigyelő (MRM) módszert alkalmaztunk.

#### **III.8.3. Energiaszubsztrát hasznosítás vizsgálatok LC-MS-sel $^{13}\text{C}$ stabil izotóp jelölést követően**

A különböző tumorsejtek bioenergetikai szubsztrát-hasznosítását a  $^{13}\text{C}$  atomok beépülés mértékének és a jelölt szénatomok molekulákon (intermediereken) belüli számának meghatározásával követtük *in vitro* vizsgálatainkban. Stabil izotóp jelölés technikát alkalmaztunk, a jelölésekhez 10 mM  $\text{U}^{13}\text{C}$ -glükóz, illetve 4 mM  $\text{U}^{13}\text{C}$ -glutamin vagy 10 mM  $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetát (Cambridge Isotope) szubsztrátokat adtunk DMEM D5030 tápfolyadékban tartott

(tápanyaghiányos) sejtekhez egy órán keresztül. Egyes vizsgálatokban ezt a jelölést hosszabb távon tartottuk fent, ezekben a 24 órás vizsgálatokban is mindig DMEM D5030 médiumot alkalmaztunk, de adott jelölt szubsztrát mellett savót, antibiotikumot és kiegészítésként a jelölt glükóz esetében jelöletlen L-glutamint (4 mM), illetve glutamin jelölésnél D-glükózt (10 mM) is használtunk. Az előbbieken ismertetett előkészítési eljárással extraháltuk, majd az LC-MS módszerrel mértük a metabolitok koncentrációját és a különböző tömegszámú metabolitok arányát is.

Metabolikus jellemzéseink során egyes esetekben az intracelluláris ATP, ADP és AMP mennyiségét és arányát is D5030 médiumban tartott sejtekben határoztuk meg, illetve 10 mM glükóz vagy 10 mM acetát mellett is megmértük az adenilát nukleotidok mennyiségét. A sejtek metanol ecetsavas (9:1) extrakcióját követően a szeparálás Aquasil C18 oszlopon majd a mérés LKB PE NELSON 3000 interface készülékben történt.

#### ***III.8.4. Oxigénfogyasztás és extracelluláris acidifikáció mérése Seahorse technikával***

Glioma sejtvonalak (U251 MG, U87 MG, U373 MG) esetében, *in vitro* kezelésekben a sejtek oxigénfogyasztását, extracelluláris savasodását és adott típusú szubsztrátok oxidációját határozhattuk meg Seahorse XF96 Analyzer készülékkel (Agilent Technologies). Valós idejű oxigénfogyasztási (oxygen consumption rate – OCR) és extracelluláris acidifikációs ráta (extracellular acidification rate – ECAR) meghatározása a Semmelweis Egyetem Biokémia Intézetében történt Tretter professzor úr munkacsoportja segítségével történt. A sejteket a vizsgálatok előtt 96-os Seahorse plate-re tettük, majd a mérés megkezdésekor a médiumot DMEM D5030 minimum médiumra cseréltük. Az alap OCR és ECAR értékeket 1-1,5 óra inkubációs idő elteltével, majd egyes energiaszubsztrátok oxidációját ezt követően határoztuk meg (glükóz 10 mM, glutamin 25 mM, citrát 5 mM, GABA 5 mM, laktát 5 mM, malát 10 mM, acetát 10 mM és glutamát 5 mM). A vizsgálatban metabolikus inhibitorokat/modulátorokat is adtunk a sejtekhez a készülékben az adott mitokondriális és glikolitikus kapacitások részletesebb elemzése érdekében (oligomycin 2  $\mu$ M – légzési lánc komplex V gátló; 2,4-dinitrofenol - DNP 100  $\mu$ M – mitokondriális szétkapcsoló szer és antimycin A – légzési lánc komplex III gátló + rotenon 1-1  $\mu$ M – légzési lánc komplex I gátló).

#### ***III.9. In vivo xenograft modellek***

Munkánkban több *in vivo* tumormodell vizsgálata is történt 20-23 g-os SCID egerek felhasználásával.

Hodgkin lymphoma, Burkitt lymphoma és DLBCL xenograftokat subcután oltottuk az egerek hátára, míg a ZR75.1 és MDA-MB231 emlőcarcinoma sejteket ( $2,5 \times 10^6$ ) szubkután az emlő régióba injektáltuk. A Burkitt lymphomák (HT58, BL41, BL41/95 -  $10^7$  sejt/ 100-200  $\mu$ l térfogatban), és az emlődaganatok oltást követően 3-5 hét alatt tapintható méretű tumorokká nőttek, ezután kezdtük a kezeléseket. A HL és DLBCL (KMH2 és BHD1) sejteket matrigélben 1:1 térfogatarányban keverve oltottuk subcután ( $3 \times 10^7$  sejt/250  $\mu$ l térfogatban). Ezek a tumorok lassú növekedésűek, így hasonlóan a fibrosarcoma sejtvonalhoz (HT-1080 fibrosarcoma első oltás  $2 \times 10^6$  tumorsejt) tovább oltva (eltávolított tumorok azonnali feldarabolásával, majd a tumordarabok továbbvitele) használtuk kísérleteinkben. A tumorok további egerekbe való átoltása után a tapintható tumorok megjelenését követően kezdtük meg a kezeléseket. Kezeléseink 3-8 hétig tartottak, miközben 4-7 naponta mértük a tumorméreteket, majd a kísérlet végén a tumorok tömegét.

mTORC1 inhibitorok, Rapamune (3 mg/kg, per os.) (Wyeth Europa Ltd.); Torisel (10 mg/kg, i.p.) (Pfizer); mTORC1/2 inhibitor, PP242 (10 mg/kg, PEG300-ban oldva per os.) (Cayman Chemical Comp.); NVP-BEZ235 mTORC1/2 és PI3K inhibitor (30 mg/kg, 1:9 N-metil-2-pirrolidon: PEG300-ban oldva, per os.) (Tocris); gamma-szekretáz inhibitor, GSI-XII (4 mg/kg, DMSO-ban oldva, i.p.) (Calbiochem) doxorubicin (2 mg/kg), doxycyline (5 mg/kg). A kontroll csoportba tartozó egereket fiziológiás só oldattal, DMSO-val (Merck-Sigma-Aldrich), illetve NMP és PEG300 (Merck-Sigma-Aldrich) 1:9 arányú elegyével kezeltük az aktuális szereknek megfelelően. Az egerek súlyát és a tumor méretét (tolómérővel) minden kezelés előtt mértük. A tumortérfogatokat  $\pi/6 \times ((2 \times \text{tumor szélesség} + \text{tumorhossz})/3)^3$  képlettel számoltuk ki. A terminálást követően a tumortömegét mértük majd a tumor egyes darabjait egyéb vizsgálatokhoz formalinban fixáltuk és paraffinba ágyasztuk. A metabolit vizsgálatokhoz tumordarabokat azonnal folyékony nitrogénbe tettük és a vizsgálatig -80°C-on tároltuk. Az *in vivo* vizsgálatokhoz intézetünk állatháza a PEI/001/2457-6/2015, PEI/001/1733-2/2015, PE/EA/801-7/2020 számú állategészségügyi engedélyekkel rendelkezik.

### **III.10. A vizsgálatokban érintett betegcsoportok és jellemzőik, etikai engedélyek**

Munkáinkban arra törekedtünk, hogy az *in vitro* vagy *in vivo* kísérleteinkben megfigyelt daganatbiológiai jelenségeknek diagnosztikai, terápiás jelentőségére is rá tudjunk mutatni. Ennek lehetőségét teremtette meg számunkra az egyetem patológiai intézeteiben archivált tumorszövetek sokfélesége és a Magyar Tudományos Tanács Országos Tudományos Kutatási Etikai Bizottságának jóváhagyása, állásfoglalása (7/2006. Sz.), amelyhez adott vizsgálatok esetében szükség szerint további ETT-TUKEB vagy egyetemi kutatási etikai bizottsági engedélyekkel is rendelkezünk, rendelkezünk (TUKEB 118/1999; TUKEB 510/2013, 86/2015, TUKEB 99/2018., 14383-2/2017/EKUB). LAM és SCLC esetében a Mayo Klinika segítségével zajlottak vizsgálataink, a Mayo Klinika hivatalos engedélyeinek megfelelően (IRB#: 18-001887, IRB#: 15-000406). Vizsgálatainkban különböző daganatos betegségek humán mintáit használtuk fel, egyes esetekben szükség és lehetőség szerint a betegek követéses klinikai vagy túlélési adatait használtuk fel.

A vesetranszplantációs beavatkozások daganatos szövődményeinek elemzéséhez a budapesti veseátültetés kezdetétől 1973-2008 között a Semmelweis Egyetem I.sz. Sebészeti Klinikáján, illetve később Transzplantációs és Sebészeti Klinikáján végzett közel 3000 veseátültetés kórtörténeteit tekintettük át Dr. Végső Gyula transzplantációs sebész kollégával. Retrospektív feldolgozásunkban az átlagos követési idő 94,1 hónap volt, a 193 beteg esetében felismert rosszindulatú daganatok megoszlását elemeztük és foglaltuk össze (férfi/nő arány 2,2:1, átlagéletkora 53,1±10,1 év, a donor és recipiens HLA eltérés átlaga 2,83±0,6). Összehasonlító elemzésünkben a lakosság körében előforduló rosszindulatú daganatok incidenciáját a Magyar Nemzeti Rákregiszter adatai alapján szintén áttekintettük. A 4 különböző immunszuppresszív gyógyszerkombináció alkalmazásának jelentőségét is vizsgáltuk. Ezt a munkát egészítettük ki egy hamarosan közlésre kerülő a poszttranszplantációs és a *de novo* kialakuló vesedaganatok mTOR aktivitását összehasonlító vizsgálatunkkal. Utóbbiban 46 *de novo* és 44 poszttranszplantációs vesedaganat, illetve 10 végállapotú

vesebiopsziás-minta, archivált paraffinos minták mTOR aktivitását jellemző IHC reakciók eredményeit elemeztük.

Vizsgálataink jelentős részében Kopper professzor munkacsoportjának hagyományait folytatva leukémiák és lymphomák szabályozatlan növekedésének és apoptózis rezisztenciájának hátterében a Notch szignál, illetve mTOR aktivitásváltozásokat tanulmányoztuk.

B-sejteket illetve B-CLL sejteket 24 CLL-es beteg, valamint egészséges normál donorok alvadásgátolt perifériás véréből izoláltuk. A diagnózis az aktuális WHO klasszifikáció kritériumainak megfelelően történt, a Rai-féle stádiumbeosztást alkalmaztuk, feldolgoztuk továbbá az egyéb klinikai adatokat is (kor, nem, hemoglobin, lymphocytaszám, thrombocytaszám, alkalmazott terápia és progresszió) elemzéseinkben.

A Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekgyógyászati Klinika Hematológiai osztályával együttműködésben 2008 és 2012 között kezelt 79 ALL-es betegek csontvelői és perifériás vér mintáiból előbbiekhöz hasonlóan gyűjtöttünk ALL, illetve a terápiás követést követően repopulálódó sejteket csontvelői/perifériás mononukleáris sejteket (n=372) az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben. Összesen 25 gyermeknél a kezelés valamennyi fázisából; (0. napi, kezeletlen minta, kemoterápia 15. napi, 33. napi, és protokoll M előtti időpontok) (n=100) tudtunk elemezhető mennyiségű mintát gyűjteni, illetve még 28 beteg beteg esetében a diagnóziskori mintákat tudtuk felhasználni mTOR aktivitás és miRNS expresszió vizsgálatainkban (az összes eset között 9 T sejtés ALL volt).

A lymphomás szövetek IHC vizsgálataiban teljes vagy TMA blokkok készítése után készített metszeteket festettünk. Az egyik TMA vizsgálatban 2004- 2008 közötti az aktuális lymphoma klasszifikáció szerinti besorolásoknak megfelelő 104 lymphoma mintát dolgoztunk fel (23 Hodgkin – HL, 10 Diffúz nagy B-sejtés – DLBCL, 11 köpenysejtés – MCL, 9 anaplasiás nagy-sejtés lymphoma – ALCL, 4 Burkitt lymphoma – BL, 12 marginális zóna lymphoma – MZL, 13 krónikus lymphoid leukémia/kissejtés lymphocytás lymphoma - CLL, 10 folikuláris – FL és 12 perifériás T-sejtés lymphoma). Majd Hodgkin lymphomás vizsgálatunkhoz az ebben a vizsgálatban szereplő 23 HL biopszia mellé további 60 HL-es beteg mintáját választottuk ki a korábbi 2000-2007 közötti évekből, így összesen 83 HL immunhisztokémiai vizsgálatát végezhetjük el (reprezentálva a HL altípusokat: 7 noduláris lymphocytá predomináns HL és 76 klasszikus HL eset; amelyek 47 noduláris sclerosis, 18 kevertsejtés, 8 lymphocytá gazdag és 3 lymphocytá depléció esetet jelentettek). A DLBCL-ek mTOR aktivitásának vizsgálatához 80 diffúz nagy B-sejtés lymphomás eset biopsziás mintáiból készült TMA metszeteket használtunk fel, de a követéses klinikai adatok csak 68 esetben voltak elérhetőek. Ezek megoszlása 50 nem (non-GC) és 18 csíracentrum eredetű (GC) DLBCL volt.

Szolid daganatok több típusát is érintették különböző vizsgálataink.

103 (50 nő és 53 férfi) colon carcinomás a műtét után 5-FU és oxaliplatin komplex kezelésben részesült beteg szövettani biopsziás mintáját sikerült összegyűjtenünk 1996 és 2004 közötti időszakból, így ezekben az esetekben a követéses, túlélési adatok elemzésére is sor kerülhetett –minimálisan 5 év betegkövetéssel, illetve a túlélési adatok elemzésékor 10 évvel. Az átlag életkor 62 év volt – medián 63 év, 34 és 78 év között –, 77 hónap medián túlélés mellett; 72 esetben colon és 31 rektum tumor; 12 Grade I, 64 Grade II és 27 Grade III esetet



érintett a vizsgálat. Dukes és a TNM klasszifikáció szerinti osztályozás alapján - 30 esetben Dukes B2, 8 esetben Dukes C1, 56 esetben Dukes C2 és 9 betegnél Dukes D stádiumú esetünk, illetve 36 II stádiumú, 60 III stádiumú és 7 IV stádiumú beteget különböztethettünk meg.

Többféle tüdődaganat esetében is végeztünk vizsgálatokat. 67 primer tüdő adenocarcinómát és 67 tüdő adenocarcinoma agyi áttétjét érintő mTOR aktivitás vizsgálatunkban; a minták között 15 esetben ugyanazon beteg primer tumor-agyi metasztázis szöveteit is össze tudtuk hasonlítani. A primer adenocarcinoma műtéteket 2003 január és 2011 december között végezték, a szövettani klasszifikáció ellenőrzése, reklasszifikációja a 2015-ös WHO beosztás alapján történt. Egyes klinikopatológiai adatokat is tudunk elemezni (életkor, nem, stádium, dohányzási anamnézis, az agyi áttétek mérete és száma). Kissejtes tüdődaganatok esetében a Rictor amplifikáció és ezzel összefüggésben az mTOR aktivitás IHC vizsgálatokat 92 beteg 100 archivált mintáiban (80 sejtblokk, 4 transzbronchiális biopszia, 16 műtéti reszekátum) a floridai Mayo Klinikával (Jacksonville, USA) kollaborációban elemeztük. A vizsgálatokat a Mayo Klinika kutatásetikai bizottsága engedélyezte (IRB#: 18-001887). A diagnózisok felállítás a 2015. évi WHO klasszifikáció alapján zajlott. A betegek a mintavétel nem kaptak kemoterápiás kezelést. Az előbbi együttműködés keretein belül kerülhetett sor a rendkívül ritka lymphoangioliomatosis (LAM) betegek tüdőszöveteinek mTOR és metabolikus jellegzetességeinek vizsgálatára is. 11 S-LAM beteg műtéti formalin-fixált paraffinba ágyazott tüdőszöveteit vizsgálhattuk meg, 4 esetben diagnosztikus mintavételi és 7 esetben az explantált tüdő minta állt rendelkezésünkre. A műtéteket 2004. január 1-je és 2016. december 31-e között végezték a Mayo Klinikán. Ebben az esetben is rendelkezünk a Mayo Klinika kutatásetikai bizottságának engedélyével (IRB#: 15-000406). Két beteg esetében ugyan hormonterápiát alkalmaztak, de egy beteg sem kapott mTOR gátló kezelést a műtétek előtt. A LAM szövetekben a legalább 100 LAM-sejtet tartalmazó LAM-nodusokat értékeltük és ismert prekursor sejtek hiányában kontrollként a normál bronchiális simaizomsejtekkel (BSM) hasonlítottuk össze a jellegzetes in situ expresszió különbségeket.

Gliomákat érintő metabolikus vizsgálatainkkal összefüggésben glioma biopsziás mintákból TMA-t készítettünk, amelyben összesen 47 esetet használhattunk fel (IDH1 R132H mutáció 32 esetben volt a vizsgált 14 astrocytoma, 14 oligodendroglioma, 19 glioblastoma között; nemek megoszlása 23/24 nő/férfi; grádus szerinti megoszlás: II n=9, III n=19, IV n=19), normál kontrollként az agy három különböző régiójából származó területet értékeltünk összehasonlító elemzéseinkben.

Magyar gyermekonkológiai központokban 2007. és 2017. között rhabdomyosarcoma miatt kezelésben részesült betegek anyagait 19 patológiai intézet segítségével gyűjtöttük össze mTOR aktivitás és metabolikus profil vizsgálatainkhoz (ez 48 beteg 65 szövettani mintáját eredményezte). Így, végül 53 embrionális, 7 alveoláris és 5 botrioid, vagy orsósejtes altípusba tartozó eset vizsgálatára kerülhetett sor TMA vizsgálatainkban, azokban az esetekben ahol nem volt lehetőség a kis mennyiségű rendelkezésre álló szövetminta miatt TMA készítésre ott hagyományos immunfestéseket végeztünk a szöveteken. Egyes betegek esetében mintapárok is rendelkezésre álltak, aminek segítségével az adjuváns kezelések esetében, illetve a kezelést követően a recidívákban bekövetkező mTOR és metabolikus változások jellemzésére is sor kerülhetett (8, illetve 9 párosított eset).

Emlődaganatok metabolikus jellemzéskor a különböző szubtypusokból (Luminal A, Luminal B, HER2+ és tripla negatív (TNBC)) 20-20 esetet vizsgáltunk teljes biopsziás

metszetekben a normál emlőszövetekkel összehasonlítva (a tumortípusok meghatározása a 2013-as St.-Gallen-i Konszenzus ajánlása alapján zajlott) az egyetem II. Patológia Intézete, Kulka Janina professzor asszony és Tőkés Anna-Mária tudományos főmunkatárs segítségével. A primer daganatokat 1999. augusztus és 2019. december között távolították el, a betegek előzetes kezelésben nem részesültek. A távoli metasztatizismentes túlélést (DMFS) és a teljes túlélést (OS) is vizsgáltuk összehasonlító elemzésünkben.

Amennyiben TMA blokkokat készítettünk, akkor legalább két, de több esetben három, vagy akár négy szövethengert is szúrtunk azonos blokkból a patológusok által megjelölt jellegzetes tumor területeket érintve. Előbbiek mellett szöveti „normál” kontroll szöveteket (colon, nyirokcsomó, máj, vese), illetve orientációs és immunhisztokémiai pozitív-negatív kontroll szöveteket is tartalmaztak a TMA blokkok. A TMA-IHC festések értékeléséhez 3DHitech Panoramic Viewer Programot és/vagy hagyományos fénymikroszkópot használtuk, az elemzésekben minden esetben legalább két független patológus vett részt az értékelésben. Amennyiben a vizsgálók adott értékeléseiben nagy eltérés jelent meg, akkor közösen további patológusok segítségével is újraértékeljük az adott festéseket. Az értékelésben használt score-meghatározásokat az immunhisztokémiai leírásoknál mutattam be.

### ***III.11. Alkalmazott statisztikai módszerek***

A statisztikai analízist IBM SPSS Statistics szoftver (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) felhasználásával végeztünk. A klinikopatológiai adatok és immunhisztokémiai értékelések összehasonlítását Mann-Whitney *U*-teszttel és Fisher-egzakt próbával, mintapárok esetén Wilcoxon-féle előjeles rangpróbával hajtottuk végre. A korreláció számításainkban Spearman-féle rangkorrelációt, a túlélési analíziseinkben Kaplan-Meier módszert használtunk, a túlélési görbéket log-rank teszttel hasonlítottuk össze. Multivariancia analízist különböző faktorok progressziós értékének vizsgálata közben végeztünk Cox regressziós modellel. Egyes vizsgálatok eredményeiben a csoportok közötti különbségeket, összefüggéseket  $\chi^2$  próba és Pearson-féle teszt segítségével is megvizsgáltuk szükség szerint. Az *in vitro* kísérletek esetén kétmintás t-próbát használtunk a szignifikancia megállapítására. A szignifikancia-szintet általában  $p \leq 0,05$  értéknél, néhány vizsgálatban így pl. LAM mintáknál – az esetszámra tekintettel –  $p \leq 0,01$  értéknél határoztuk meg.

## IV. Eredmények

Kopper professzor munkacsoportjában elsősorban az indukált apoptózis mechanizmusaival és az apoptózis rezisztencia daganatbiológiai kérdéseivel foglalkoztunk. Új vizsgálatokat állítottunk be munkatársainkkal, köztük apoptózis detektálására alkalmas, illetve mitokondrium depolarizáció kimutatását segítő méréseket, kaszpáz aktivitás esszéket. Ebben az időszakban a munkacsoporthoz csatlakozó klinikus PhD hallgatókkal egyes nem onkológiai hatású készítmények (pl. a mevastatin, a mycophenolát mofetil, mycophenolsav) lymphomák növekedését befolyásoló hatásait is vizsgáltuk *in vitro*.

Ezek a tapasztalatok segítséget jelentettek első PhD hallgatóim munkáinak tervezésében, a Notch jelátviteli folyamatok szabályozási zavarával és ennek kapcsán egyes leukémia, illetve lymphoma sejtek proliferációját, túlélését segítő folyamatok térképezésében. Az indukálható apoptózisok vizsgálatával összefüggésben merült fel a TGF $\beta$  – mint általánosan negatív szabályozó növekedési faktor – apoptózist indukáló hatásainak vizsgálata modellrendszerünkben. A rapamycin TGF $\beta$  indukált apoptózis érzékenyítő hatásának, illetve jelátviteli hatásainak vizsgálata különösen nagy hatással volt saját kutatási területem alakulására és jelenlegi munkáimra. Ennek kapcsán az mTOR hiperaktivitás terápiarezisztenciát befolyásoló, majd tumor metabolizmust érintő szerepének vizsgálatához kapcsolódtunk.

### ***IV.1 Apoptózis indukció, proliferáció gátlás lymphomákban, izolált humán leukémia sejtekben és más daganatokban***

A statinok, és bizonyos immunuszuppresszív szerek lymphomák növekedését érintő hatásaira figyeltünk fel. A mevastatin és a mycophenolsav/mycophenolát mofetil, illetve a rapamycin lymphoma sejtek proliferációját gátló hatásait érintő *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok tervezésében és kivitelezésében, klinikai problémáinak értelmezésében, illetve a hozzákapcsolódó közlemények elkészítésében jelentős szerepet vállaltam.

Posztdoktori vizsgálataimban fő témaként a szervezetben normál szabályozóként működő faktorok daganatnövekedést befolyásoló hatásainak zavarásával, a háttérben álló rezisztenciamechanizmusok jelátviteli folyamataival kezdtem foglalkozni. Modellrendszerként elsősorban humán lymphoma, majd más szolid daganat sejtvonalakat használtunk.

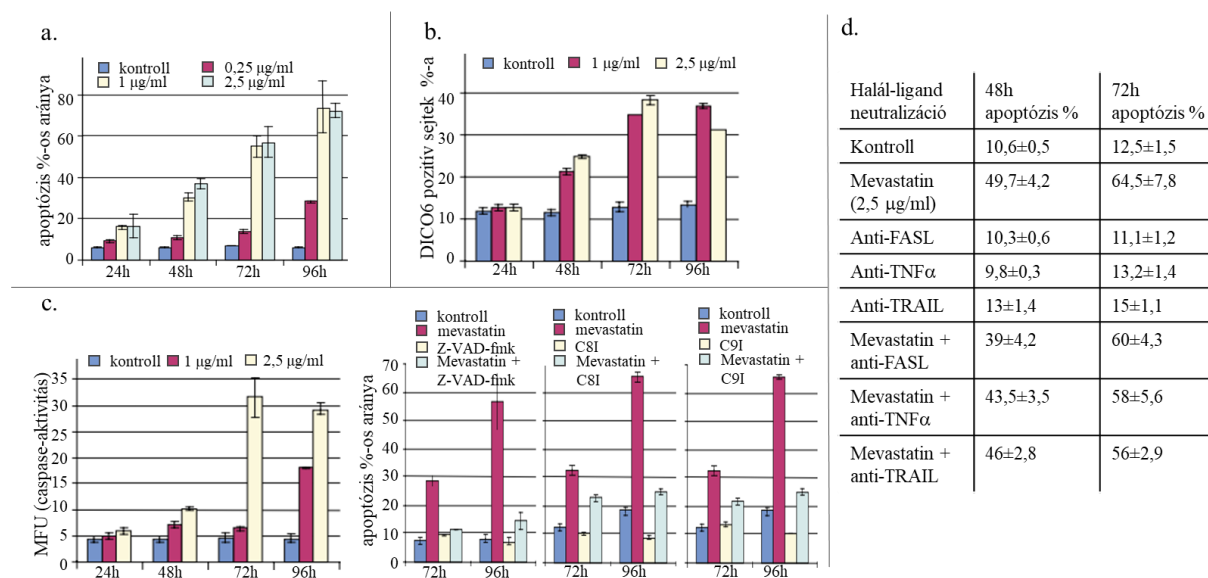
A lymphoid sejtek fejlődésében és mára már egyes szolid daganatok esetében is egyre jobban ismert a Notch receptor útvonal bizonyos expresszió- és funkcióváltozásainak szerepe. Első PhD hallgatómmal ennek vizsgálatát kezdtük meg. Ezzel párhuzamosan elsőként jellemeztük a TGF $\beta$  apoptózis-indukáló hatásait lymphoma sejtekben, illetve a TGF $\beta$ -rezisztencia jelátviteli hátterét, a kétezres évekre feltárt Smad útvonal és az alternatív jelátviteli útvonalak szerepét térképeztük fel.

#### ***IV.1.1. Nem onkológiai hatású készítmények apoptózis indukáló hatásai lymphomákban (mevastatin, mycophenolsav)***

A nem onkológiai kezelések olyan „*off-label*” hatásait vizsgáltuk már a kétezres évek elején, amelyek hematológiai malignitásokban befolyásolhatják a daganatok növekedését, a daganatsejtek túlélését.

#### IV. 1.1.1. A mevastatin myeloma sejtek növekedését gátló hatásainak igazolása *in vitro*

A statinokról (koleszterincsökkentők – HMG-CoA reduktáz gátlók) a kétezres évek elején egyes közlemények a jóval szélesebb körben ismert mellékhatások (myopathia, izomlázszerű tünetek, szérum kreatinin- és transzamináz-szint emelkedés, tesztoszteron és növekedési hormon-szint csökkenés, májkárosodás stb.) mellett, bizonyos daganatok esetében azok daganatnövekedésgátló hatásaira hívták fel a figyelmet (301-304). A B-sejtes lymphomák, myelomák esetében általunk is vizsgált apoptózis zavarok kapcsán, Jánosi Judittal a mevastatin myeloma sejtek proliferációját és apoptózisát befolyásoló hatásait vizsgáltuk *in vitro*. Myelomás sejtekben elsőként igazoltuk a mevastatin kezelés dózis- és időfüggő apoptózist indukáló hatásait. Az indukált apoptózis folyamatát halál-receptoroktól függetlennek találtuk, míg a Bcl-2 expresszió csökkenését és mitokondrium depolarizációt, illetve a kaszpázok aktiválódásának szerepét igazoltuk (19. ábra). Munkánk jelentőségét azóta megerősítette több klinikai vizsgálat is, legutóbb 2016-ban a Journal of Clinical Oncology-ban számoltak be arról, hogy közel ötezer myelomás beteg kezelési és túlélési adatai alapján, a statinok alkalmazása 21%-kal csökkenti a teljes és 24%-kal a myeloma specifikus halálozást. Mindezek mellett az is igazolódott, hogy a statinok használata 31%-kal csökkentette a csont elváltozások szövödményeinek rizikóját is (305).



#### 19. ábra Mevastatin apoptózis indukáló hatása humán U266 myeloma sejtekben

a. Az apoptotikus (subG1) sejtek %-os arányának dózis- és időfüggő emelkedése *in vitro* (áramlási citometria); b. Mitokondrium depolarizáció időbeli változása, DIOC6 festett sejtek %-os arányának emelkedése (áramlási citometria); c. Kaszpázok szerepének igazolása, kaszpáz aktivitás mérése DEVD-AMC segítségével (fluoreszcencia detektálása MFU-mikrofluoreszcens unit), illetve általános kaszpáz inhibitor (Z-VAD-fmk) és kaszpáz8 és kaszpáz9 inhibitorok (Z-IEDT-fmk – C8I, Z-LEDH-fmk – C9I) hatásának vizsgálata 2,5 mg/ml mevastatin kombinációs kezeléseknél (áramlási citometria); d. A halál-receptorok szerepének vizsgálata: a neutralizáció szignifikánsan nem befolyásolta a mevastatin indukált apoptózist egyik esetben sem.

#### ***IV. 1.1.2. Immunszuppresszív kezelések pro- és anti-tumorális hatásainak vizsgálata***

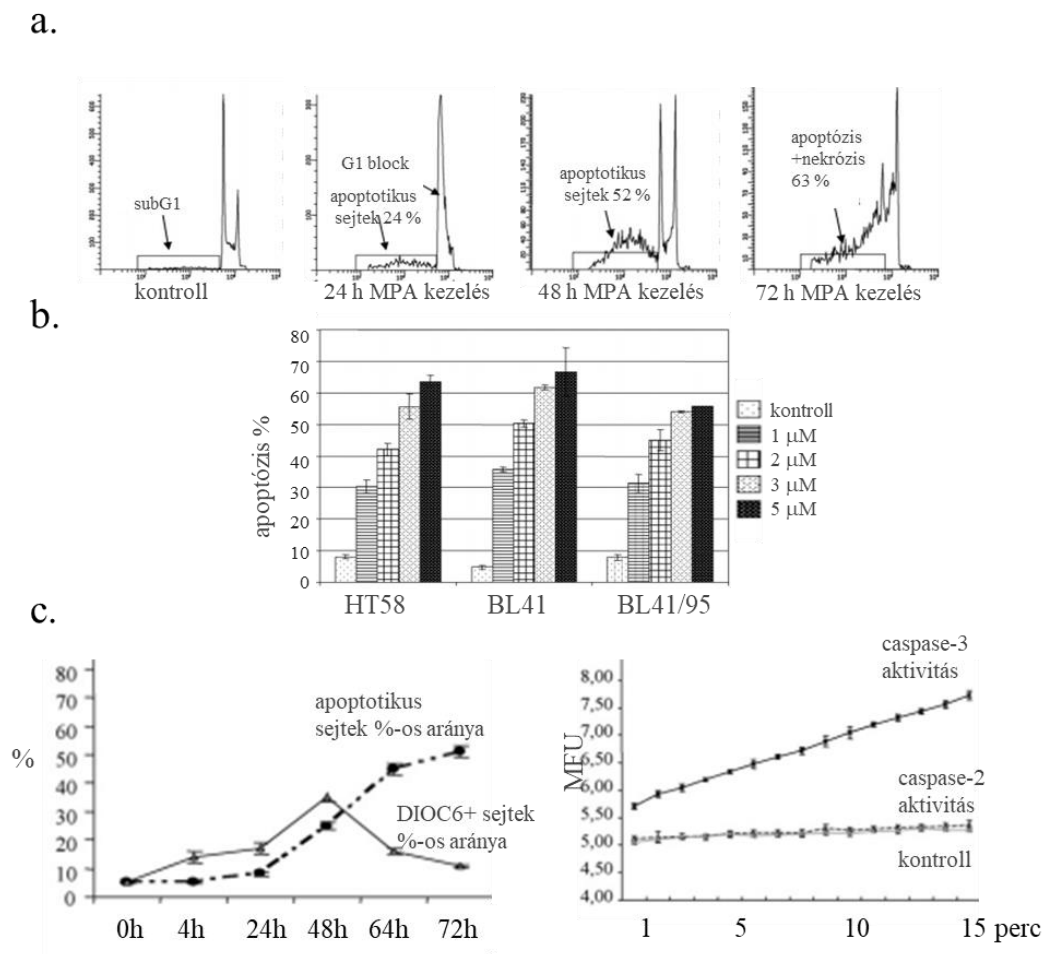
Vizsgálataink másik részében a transzplantációs klinikával együttműködve, Végső Gyulával, az immunszuppresszióval összefüggésben megjelenő daganatok incidenciájával, illetve bizonyos immunszuppresszív kezelések potenciális lymphoma sejtek növekedését gátló hatásaival foglalkozhattunk.

A szervátültetések és a poszttranszplantációs kezelések, gondozás fejlődésének köszönhetően a transzplantált betegek hosszútávú életkilátásai egyre jobbak. Ennek következménye viszont az, hogy a hosszabb túlélés, az élethosszig tartó immunszuppresszió mellett a gyakrabban megjelenő rosszindulatú daganatok felismerésének és kezelésének jelentősége is megnövekedett. Fontos a daganat felismerését követően, a daganat kezelésének és emellett a beültetett szerv védelmét biztosító megfelelő immunszuppresszió megválasztása is.

Munkánkban az 1973. november és 2008-ig lezajlott 2852 veseátültetés (Simmelweis Egyetem I. sz. Sebészeti Klinikáján, illetve 1994-től a Transzplantációs és Sebészeti Klinikáján) poszttranszplantációs daganatait vizsgáltuk, 193 betegben igazoltak rosszindulatú daganatot (2,19 –szer több férfi, mint nő esetében, átlag életkor  $53,1 \pm 10,1$  év). Ezek alapján a tumorok előfordulásának gyakorisága a hazai vesetranszplantáltak között 7,7% volt ebben az időszakban. A kialakult daganatokat a kezeléseik szerint csoportosítottuk: I. 16 eset (8,3%) Azathioprine + szteroid, a II. csoport 111 eset (57,5%) Cyclosporine + szteroid, a III. csoport 55 eset (28,5%) Cyclosporine + mycophenolát mofetil + szteroid, míg a IV. csoport 11 eset (5,7%) Tacrolimus + mycophenolate mofetil + szteroid kezelésben részesült. A daganatok között leggyakrabban bőrrák ( $n=51$ ; 26,4%), vesedaganat ( $n=26$ ; 13,5%), tüdőrák ( $n=15$ ; 7,7%), Kaposi sarcoma ( $n=12$ ; 6,2%), emlőcarcinoma ( $n=12$ ; 6,2%), non-Hodgkin lymphoma (NHL) ( $n=10$ ; 5,2%), májdaganat ( $n=7$ ; 3,6%) fordult elő. A poszttranszplantációs daganatok előfordulása a nem transzplantált személyekben előforduló daganat gyakorisághoz képest magasabb incidenciát, és daganat típusok szerint is eltérést mutattak. A daganatok többsége, a transzplantációt követően az első 5-6 évben jelent meg. A Transzplantációs Klinika esetei között a tumorok 11,4%-a ( $n=22$ ) a vesetranszplantációt követő 6 hónapon, 20,2%-a ( $n=39$ ) pedig 1 éven belül jelent meg, míg a daganatok másik harmada (35,2%-a;  $n=68$ ) 2 éven belül alakult ki. Meglepő, hogy ezek között lymphoma nem volt, csak a később, közel 10 év után megjelent esetekben. Az elemzett 193 daganatos esetben, 92-en haltak meg a vizsgált időszakban, 30% daganatos progresszió, 30%-a fertőzőes szövődmények, míg 40% pedig egyéb okok miatt (pl. cardialis, cerebrovascularis szövődmény, tüdőembólia, májcirrózis stb.). A közel 100 2007-ben is élő beteg esetében az átlagos túlélés  $65 \pm 46$  hónap volt.

Munkánkban egyrészt a hazai poszttranszplantációs daganatok előfordulását mutattuk be, másrészt törekedtünk olyan kísérleti bizonyítékokat szerezni, amelyek a Calcineurin kezelés, egyértelmű és általában az immunszuppresszió daganatprogressziót elősegítő hatásaival szemben más immunszuppresszív kezelések potenciális daganatnövekedést gátló hatását igazolják. Ezekben a kísérletes munkákban a mycophenolsavat, illetve később az mTOR gátló rapamycint is teszteltük.

Az MPA, az immunszuppresszív gyógyszer a mycophenolate mofetil (MMF) (306) mint anti-metabolit, a lymphoid sejtek „*de novo*” guanin nukleotidszintézis gátlását okozza (inozin 5'-monofoszfát dehidrogenáz – IMPDH – szelektív, gátlója – 307). Csökkenti a guanin nukleotidok (GMP, GDP, GTP, dGTP) mennyiségét, ami a DNS-szintézis és a sejtproliferáció gátlását eredményezi. A kezelés hatása a szervezetben szelektív, mivel a lymphocytáknak más sejtektől eltérően „*de novo*” purin nukleotid szintézisre van szükségük (*salvage* mechanizmus hiánya) (308-312). A mycophenolsav (MPA) humán lymphoma sejtvonalak növekedését befolyásoló hatásait *in vitro* és *in vivo* is tanulmányoztuk.



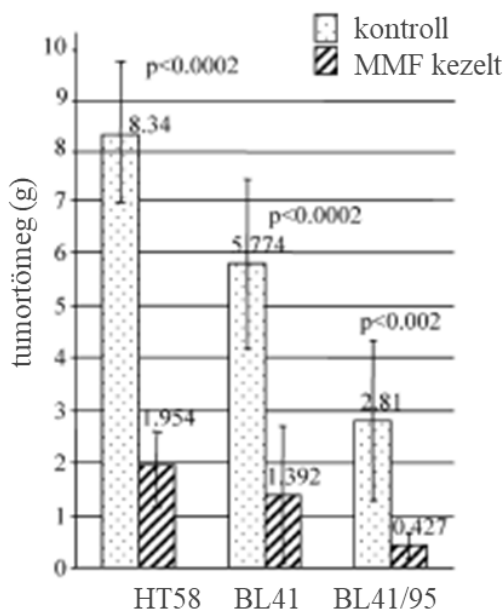
## 20. ábra Mycophenolsav (MPA) *in vitro* proliferáció gátló és apoptózis indukáló hatása humán lymphoma sejtvonalakban

a. Áramlási citometriával időben követhető a kezelés 24. órájában tapasztalt G1 sejtciklus blokk, párhuzamosan pedig az apoptotikus sejtek %-os arányának emelkedése, ami 48 órával a kezelést követően már kifejezett. 72 óra múlva pedig már nem csak apoptózis, hanem nekrozis is megfigyelhető a tenyészetekben; b. Az MPA kezelés dóziszfüggő apoptózist indukáló hatása *in vitro* 72 óras kezelést követően (áramlási citometriai eredmények); c. Az MPA kezelés mitokondrium depolarizációs hatásának időfüggése, illetve 40 órával a kezelést követően kimutatható kaszpáz-3 aktivitás kimutatása.

Eredményeink szerint a MPA dózis- és időfüggően, gátolta a proliferációt a vizsgált lymphoma sejtvonalakban (HT58, BL41, BL41/95), illetve párhuzamosan szignifikánsan fokozta az apoptózist (20. ábra). A kezelés 24. órájában a proliferációgátló hatás már kimutatható volt. Igazoltuk hogy a sejtek jelentős %-a a sejtciklus G1/S fázis határán halmozódik fel, míg a sejtek

másik része a S/G2 fázis határán rekedt meg és a 48. órát követően, mitokondrium depolarizáció és caspase-3 aktivitás emelkedése mellett a kezelés 72. órájában már apoptózis, DNS fragmentáció is megfigyelhető volt a kezelt tenyészetekben.

Az MPA jelentős *in vivo* tumornövekedés gátló hatásait mindhárom vizsgált sejtvonal esetében, illetve később más DLBCL sejtvonal esetében is sikerült igazolnunk SCID xenograft kísérleteinkben (21. ábra).



Xenograft IHC eredmények	BrDU + sejtek %-a	Ki67 + sejtek %-a	Aktív caspase3 + sejtek %-a	p
HT58 kontroll	37,6±5,9	80±5,9	3,8±0,3	<0,0001
MMF kezelt	23,9±1,9	51,7±4,4	16,1±0,5	
BL41 kontroll	35,7±3,4	72,1±4,7	3,5±0,2	<0,0001
MMF kezelt	22,2±2,9	47±3,4	18,3±0,3	
BL41/95 kontroll	43,5±3,4	73,6±4,6	3,6±0,2	<0,0001
MMF kezelt	26,5±2,9	51,4±3,1	18,1±0,4	

#### 21. ábra A mycophenolát mofetil kezelés *in vivo* lymphoma xenograftok növekedését gátló hatásának jellemzése

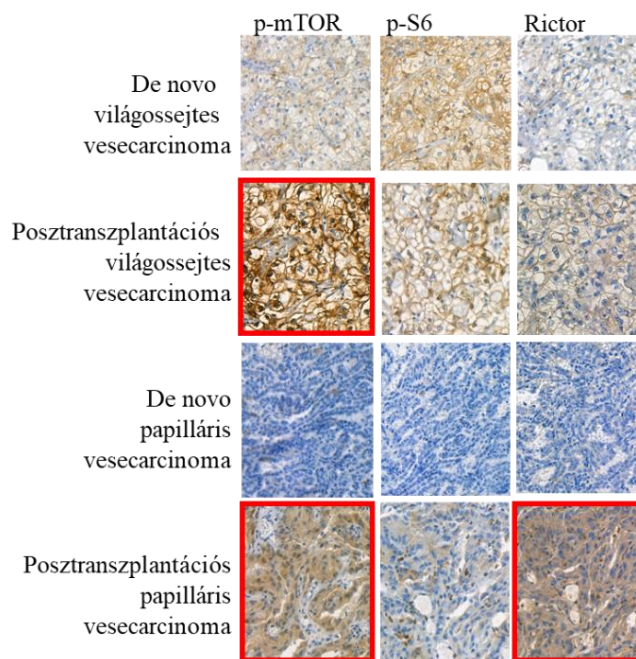
HT58, BL41 és BL41/95 lymphoma xenograftok tumortömegének eltérése kezeletlen kontroll, illetve MMF kezelt xenograftok esetében; a három lymphoma xenograft kísérlet tumormetszeteiben a BrDU beépülés (osztódások számával arányos), Ki67 proliferációs és aktív kaszpáz-3 festett sejtek %-os aránya, amely jól mutatja a tumornövekedés gátlás háttérében a proliferáció gátlás és az apoptózis indukció hatásait.

#### IV. 1.1.3. Poszttranszplantációs vesedaganatok mTOR aktivitásának jellemzése, tacrolimus kezelés hatása

Transzplantációt követően a beültetett szerv immunológiai védelmében élethosszig tartó immunszuppresszív terápiára van szükségük a recipienseknek. Ahogy azt a korábban bemutatott magyarországi adatok is jól mutatják ennek daganat kialakulást fokozó rizikójával összefüggésben poszttranszplantációs daganatok jöhetnek létre. Ilyen esetekben úgy kell megoldani a daganat eltávolítását, esetleges kezelését, hogy közben megfelelő immunszuppresszív kezelés mellett a beültetett szerv védelmét is biztosítani kell. Keveset tudunk a poszttranszplantációs daganatok kialakulásában szerepet játszó nem immunológiai tényezőkről. Ezzel összefüggésben jelenleg a poszttranszplantációs vesedaganatok megjelenésének háttérében az mTOR aktivitás változásokat vizsgáljuk összehasonlítva a *de novo* megjelenő vesedaganatok váltoásaival. Végső Gyula és a Transzplantációs Klinika segítségével, sikerült az elmúlt években egyetemünkön diagnosztizált poszttranszplantációs vesedaganat mintákat az intézetünk archívumában visszakeresni. Összesen több mint száz vesebiopsziás anyagot, köztük 44 poszttranszplantációs és 46 *de novo* (nem transzplantált

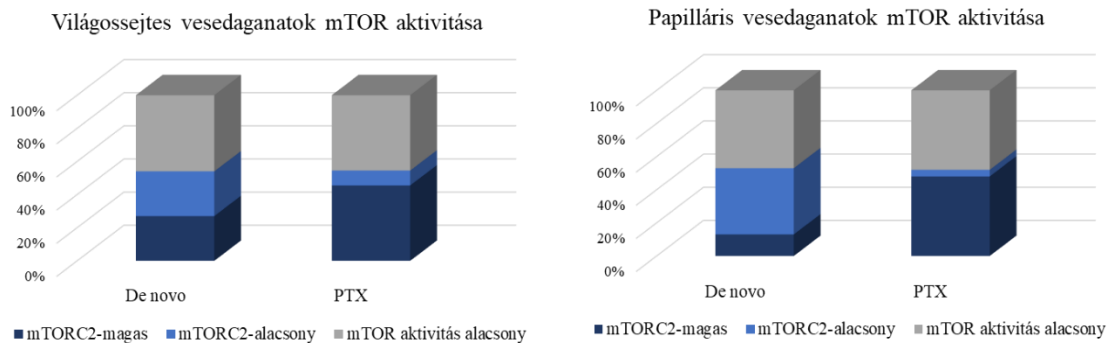
betegekben kialakult) vesedaganatot vizsgáltunk meg. Ezek között papilláris, világossejtes és világossejtes papilláris típusú carcinomák is voltak, a jelenleg érvényes 2016. évi WHO beosztás alapján elvégzett reklasszifikáció szerint. A *de novo* vesedaganatok között főleg a világossejtes, míg transzplantáció mellett (tacrolimus vagy cyclosporin alapú immunszuppresszió) a bent maradó vesében kialakult vesetumorok között a papilláris típusból volt több. A betegek többsége nem részesült mTOR inhibitor kezelésben, mindössze két kórtörténetben jelent meg malignus folyamat miatt mTORC1 gátló kezelés. Összehasonlító vizsgálatainkban kontrollként végállapotú vesék (n=10, 4 esetben nem, míg 6-nál CNI immunszuppressziót korábban alkalmaztak) és transzplantációra alkalmatlan, de kóros eltérést nem mutató donor vesék mintáit vizsgáltuk meg. Az mTOR komplexek aktivitásának karakterizálásával a következő eredményeket kaptuk: 1. a normál vesék proximális tubulus hámsejtjében a p-mTOR és a p-S6 expresszió alacsony, a Rictor expresszió magas, 2. az immunszuppresszív (CNI) terápiával nem kezelt végállapotú vesékben a p-mTOR, p-S6 és a Rictor alacsonyabb expressziót mutat, mint a CNI kezelt végállapotú vesékben, 3. világossejtes vesedaganatokban a p-mTOR mennyisége nem szignifikánsan, de értékelhetően magasabb a poszttranszplantációs daganatokban, mint a *de novo* daganatokban (p=0,06), míg 4. papilláris vesedaganatok p-mTOR és Rictor fehérje expressziója szignifikánsan magasabb a poszttranszplantációs daganatokban (p=0,04 és p=0,01). Mindezek alapján, a fokozott mTORC2 aktivitás a világossejtes (27% vs. 46%) és a papilláris alcsoportban (13% vs. 48%) jellemzőbb a poszttranszplantációs, mint a *de novo* vesedaganatokban (46 % vs. 27%, illetve 48% vs. 13%). (22-23. ábra)

Esetek száma (%)	PTX RCC (n=44)	De novo RCC (n=46)
életkor	52 ± 12.79	60 ± 13.42
nem		
férfi	35 (80)	28 (61)
nő	9 (20)	18 (39)
Hisztológia		
ccRCC	11 (25)	27 (59)
pRCC	26 (59)	17 (37)
1-es típus	22 (85)	11 (73)
2-es típus	4 (15)	4 (27)
ccpRCC	7 (16)	2 (4)
Grade		
1	20 (46)	12 (26)
2	23 (52)	22 (48)
3	1 (2)	11 (24)
4	0 (0)	1 (2)
Immunszuppresszív kezelés		
Tacrolimus	22 (50)	–
Cyclosporin A	19 (43)	–
más *	3 (7)	–
* azathioprine kezelés egy esetben illetve mTORC1 gátló (sirolimus or combined tacrolimus + everolimus - korábbi malignus betegség miatt)		
ccpRCC: világos sejtű papilláris vese carcinoma; ccRCC: világos sejtű vese carcinoma; pRCC: papilláris vese sejtű carcinoma; PTX: poszttranszplantációs		



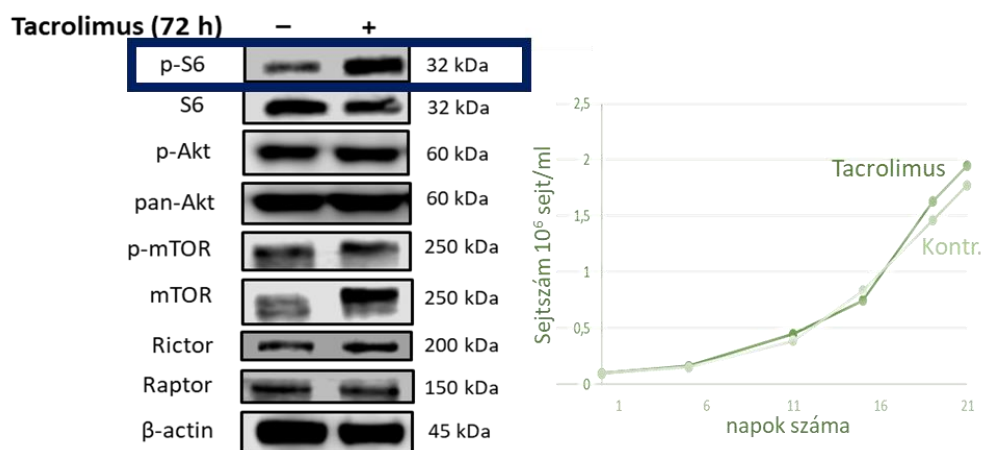
**22. ábra Vizsgált *de novo* és transzplantációt követően kialakult vesecarcinomák klinikai jellemzői és mTOR aktivitás emelkedése.** A vizsgálatba bevont vesedaganatok klinikai jellemzői, illetve reprezentatív immunhisztokémiai festések, amelyek a poszttranszplantációs vesedaganatok magasabb mTOR, illetve mTORC2 aktivitására (poszttranszplantált papilláris vesecarcinoma Rictor expresszió emelkedése) hívják fel a figyelmet



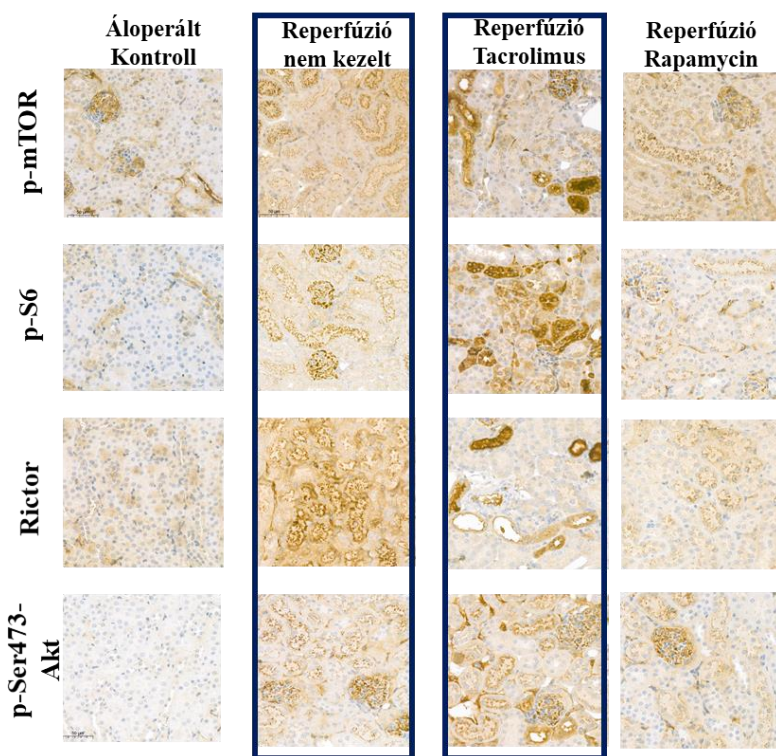


**23. ábra** *De novo* és transzplantációt követően kialakult vesecarcinómák mTOR hiperaktivitás eltérései. Immunhisztokémia elemzések után a poszttranszplantált és a *de novo* vesedaganatok mTOR aktivitás megoszlásában eltérést figyeltünk meg, a poszttranszplantált esetek nagyobb %-át jellemezte emelkedett mTOR aktivitás

Az előbbieket kiegészítéseként *in vitro* munkánkban normál vese proximális tubulus hámsejtekben (HK2) kimutattuk 72 h-ás és hosszú idejű (21 nap) tacrolimus (10 ng/ml) kezelés mTORC1 aktivitást fokozó hatásait (p-S6 fehérje mennyiségének szignifikáns emelkedése). Míg egy vizsgált vesecarcinoma sejtvonalban (A498) tacrolimus kezelés mellett minden passzálást követően rendszeresen 10-15% proliferáció fokozódást figyeltünk meg. Majd 21 napos tacrolimus kezelés után SRB proliferációs teszttel is igazoltuk a kezelés proliferáció, illetve mTORC1 és C2 komplex aktivitást fokozó hatását (p-S6, p-Akt, p-mTOR és Rictor Western blot - 24. ábra). Ezeket az eredményeinket *in vivo* xenograft modellekben is validáltuk. A xenograft modellekben a tacrolimus kezelés az A498 sejtvonal esetén fokozta az mTORC2 aktivitást és a tumorméret növekedését. Azt is kimutattuk, hogy tacrolimus kezelés mellett az mTOR aktivitás megemelkedett ischaemia-reperfúzió (IR) esetében az áloperált állatok veséjében megfigyelhető képest. Az IR csoportban a rapamycin-kezelt és kontroll egerek veséje között nem volt lényeges különbség, ugyanakkor a tacrolimus csoportban néhány tubulusban kifejezetten magas mTORC1- és hasonló mTORC2 aktivitás volt látható (25. ábra).



**24. ábra** A498 vese carcinoma sejtvonalban a tacrolimus kezelés emeli az mTORC aktivitást és fokozza a proliferációt. 3 hetes tacrolimus kezelés mTORC1 (p-S6, p- mTOR), illetve mTORC2 aktivitás emelkedést (p-(Ser473)-Akt, pmTOR és Rictor) (Western blot) és proliferációt fokozó hatása (sejtszámváltozások passzálások során) *in vitro*.



**25. ábra** A tacrolimus kezelés szignifikánsan emeli az mTOR aktivitást *in vivo* ischaemiás vesemodellben. A kontrollhoz képest, az ischaemiás állapot és az ezzel kombinált tacrolimus kezelés jelentősen emelte az mTOR aktivitás markerek expresszióját (IHC vizsgálat) *in situ* (álműtött placebo kontroll, ischaemiás placebo kontroll, tacrolimus illetve rapamycin kezelés hatása ischaemiás modellben)

Eredményeink, a transzplantációs immunszuppressziós kezelés alatt kialakuló világossejtes és papillaris carcinomákban kimutatott mTOR aktivitás változások, a CNi kezelés mellett vesék tubulus hámsejtjeiben és *in vitro* kísérleteinkben megfigyelt mTOR aktivitás emelkedés, felhívja a figyelmet a tacrolimus kezelés mTOR, mTORC2 aktivitásfokozó hatására és ennek daganatprogressziós szerepére. Mindez pedig megerősíti azt a gyakorlatot, hogy transzplantációt követően a kezdeti felépülési időszak után célszerű minél előbb áttérni mTOR gátló alapú immunszuppressziós terápiára.

#### **IV.1.2 Notch receptor útvonal szabályozási zavarai, Notch szignál gátlók hatásainak, szenzitizálásának vizsgálata leukémiákban, lymphomákban**

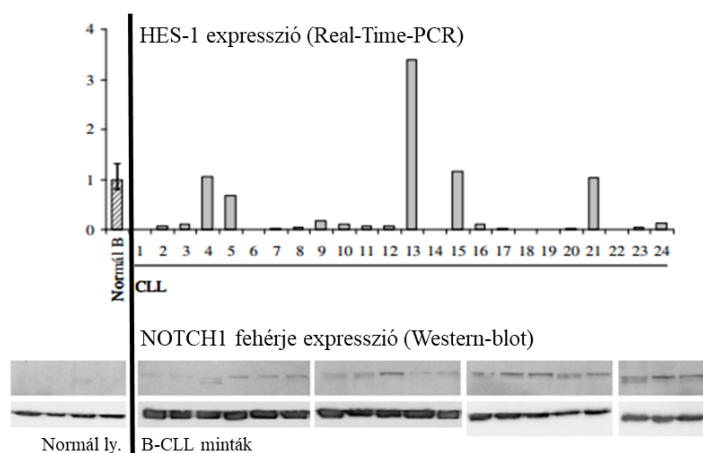
A Notch jelátviteli útvonalak szabályozó szerepe legjobban a különböző immunsejtek differenciációjából ismert. A B-sejtek érésében a NOTCH1 szignál aktivitás hiánya meghatározó, ugyanakkor a NOTCH2 receptor aktivitás megjelenésének a marginális zóna B-sejtek, illetve a folliculáris B-sejtek differenciációjában van fontos szerepe. A marginális zónában a B-sejt irányú differenciációhoz DLL1 (delta like 1 ligand) és a NOTCH2 receptor kapcsolat kialakulásának és a következtében expresszáldó CSL (CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1) transzkripciós faktoroknak hatása szükséges. Az útvonal nem megfelelő szabályozása szerv-, szövetfejlődési, hematopoetikus fejlődési zavarokat eredményezhet. Daganatok, így hematológiai malignitások esetében is leírtak Notch szignál elem mutációkat, expresszió és/vagy funkcióváltozásokat mint a tumor növekedését elősegítő hatásokat. Míg szolid daganatokban (pl. emlődaganatokban) más jelátviteli útvonalakkal összekapcsolódva is elképzelhető a NOTCH szignál aktivitás tumornövekedést támogató szerepe (313-316).

Amikor Notch jelátviteli vizsgálatainkat megkezdtuk még kevés, de annál ellentmondásosabb adatok álltak rendelkezésre B-sejtes NHL-ákban. A Notch jelút elemeinek összehasonlító expresszió vizsgálatait kezdtük el. Jellemeztük a normál humán B- és a keringő krónikus lymphocytás leukémia sejteket. Vizsgáltuk a mások által felvetett Notch szignál aktivitás és a leukémia sejtek terápiaerezisztenciájának összefüggését (317-320). Ismerve a

TGF $\beta$  és Notch szignál komplex differenciációs és sejttípusfüggő hatásait, a Notch hiperaktiváció hatását is vizsgáltuk a TGF $\beta$  rezisztenciában.

**IV.1.2.1. Keringő humán B-CLL sejtek Notch receptor és ligand expressziójának jellemzése; Notch ligand, illetve Notch szignál inhibitor kezelések hatásának vizsgálata humán lymphoma, leukémia sejtekben, azok TGF $\beta$  vagy kemoterápiás szer indukált hatásaiban**

Izolált humán normál B-sejtekben és B-CLL sejtekben vizsgálatában Notch1 fehérjét csak a B-CLL sejtekben tudtunk kimutatni. Jelentős HES-1 – klasszikus Notch-szignál célgén – mRNS-expressziót azonban nem tapasztaltunk, a HES-1 mRNS-ek mennyisége a B-CLL minták között ugyan egyedi ingadozást mutatott, az esetek többségében azonban nem igazoltunk csak a normál B-sejtekhez hasonló vagy inkább alacsonyabb mRNS expressziót a 24 vizsgált esetben (egyetlen eset kivételével). Más Notch szignál elemek közül normál B-sejtekben alacsony Deltex-expressziót tapasztaltunk, a B-CLL sejtek egyedi expressziós eltéréseket mutattak ebben is. A CLL minták között bizonyos mintákban alacsony DLL1 mRNS expressziót mutattunk ki, míg ez a normál B-sejteket nem jellemezte. Notch3, Notch4, Jagged1 és Jagged2 mRNS-t sem a normál B-sejtekben, sem a CLL sejtekben nem tudtunk kimutatni. Ezek az eredmények nem igazoltak a B-CLL sejtekben jelentős Notch aktivitást, és a betegek klinikai adataival összefüggéseket. Érdekes azonban, hogy a normál B-sejtekéhez hasonló HES-1 expressziót mutató öt CLL-mintából négyben <10G/l lymphocytaszám jellemezte a betegeket (26. ábra).



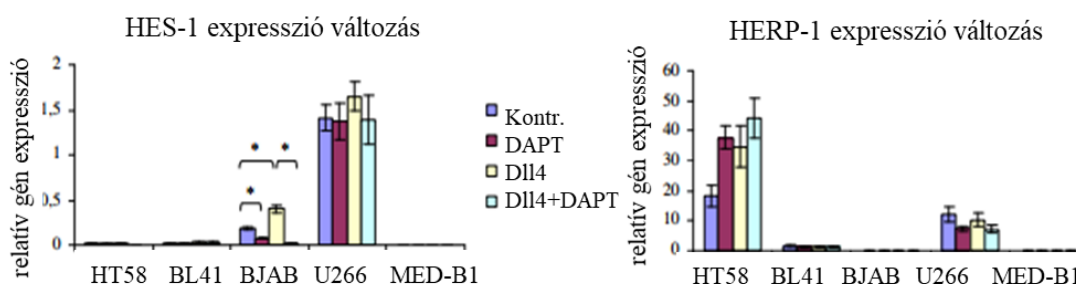
**26. ábra HES-1 (NOTCH1 szignál aktivitás) és NOTCH1 expresszió vizsgálat eredményei humán B-CLL mintákban**  
Normál B-sejtek és B-CLL sejtek HES-1 expressziója (real-time PCR) és NOTCH1 fehérje mennyisége (Western blot); illetve a vizsgált esetek expressziós és klinikai adatainak összefoglaló táblázata.

CLL-es betegek expressziós és klinikai adatai

CLL-es beteg sorszáma	HES-1 expresszió	NOTCH1	CD38	Rai stádium	Ly. (G/l)	Progr.	kezelés
4.	105 %	+	87 %	IV.	9	-	Cyclophosp., szteroid, COP
5.	67,6 %	+	0 %	I.	9,8	-	-
13.	339,8 %	+	12,5 %	0	2,8	-	-
15.	115,3 %	+	0 %	III.	8,45	+	-
21.	103,2 %	+	81 %	IV.	31	n.a.	szteroid
8., 15.	<20 %	+	10-30 %	III-IV.	<10	+	Leukeran, szteroid, ill. -
többi 14 eset	<20 %	+	<100 %	I-IV.	15<	egyedi	egyedi

*In vitro* humán lymphoma sejtvonalakban az immobilizált Dll4 ligand és DAPT gamma-szekretáz inhibitor kezeléseket követően a HES-1 expresszió változását tanulmányoztuk, mértékéből következtettünk a szignál aktivitására. A vizsgált NHL sejtvonalak közül, a pozitív kontroll Jurkat mellett csak a BJAB humán Burkitt lymphoma sejtekben mutattunk ki jelentős változást a HES-1 expresszióban, míg a HT58 sejtekben a Dll4 ligand, és a DAPT kezelés kismértékben emelte a HERP-1 transzkripció faktor mRNS-szintet. Ezek a kezelések azonban szignifikáns növekedés és/vagy apoptózis változásokat nem okoztak *in vitro* tenyészteteinkben.

A TGF $\beta$ -kezelés és Notch szignál egymás hatásait befolyásoló szerepét HT58, BL41, Ramos, BJAB, MED-B1 és U266 sejtvonalakon, izolált humán CLL-ek *short-term* tenyészteteiben is vizsgáltuk. Kísérleteinkben Notch-ligand (Dll4) vagy Notch-inhibitor kezeléssel kombináltuk a TGF $\beta$  kezelést. A Notch-függő transzkripció, illetve a TGF $\beta$  HES-1 expressziót befolyásoló hatásait tanulmányozva szignifikáns változást nem tapasztaltunk. Ennek megfelelően a Dll4 kezelés kombinációjában a TGF $\beta$  indukált apoptózis mértékét sem befolyásolta. A TGF $\beta$ -rezisztens BJAB, U266, MED-B1 sejtvonalakban és a vizsgált humán B-CLL-ekben sem a Notch-ligand, sem a Notch-inhibitor kezelés nem befolyásolta a TGF $\beta$  érzékenységet. A Notch szignál terápiarezisztenciát befolyásoló szerepét tanulmányozva, a Notch inhibitor DAPT kezelése az etopozid, doxorubicin, rituximab, bortezomib, vincristin és staurosporin apoptotikus hatásait sem befolyásolták szignifikánsan. Ezek alapján a Notch endogén aktivitásának a hagyományos terápiával szembeni rezisztenciában a vizsgált NHL sejtvonalakban és a humán CLL sejtekben nincs jelentős szerepe (27. ábra).



72h-ás *in vitro* kezelések apoptotikus hatásai

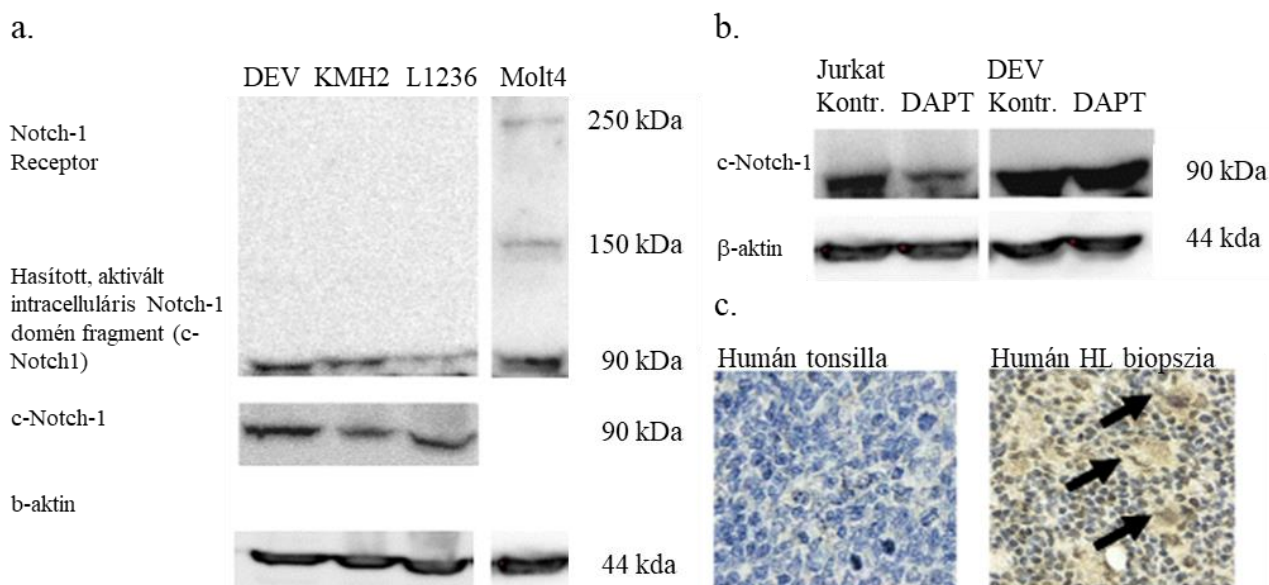
apoptózis	kontroll	Dll4	DAPT	TGF $\beta$	TGF $\beta$ +Dll4	TGF $\beta$ +DAPT
HT58	6 $\pm$ 3	7 $\pm$ 2,7	6 $\pm$ 2	30,33 $\pm$ 5,1*	27,7 $\pm$ 13,4	15,8 $\pm$ 4**
BL41	6,6 $\pm$ 3,8	6 $\pm$ 3	5,6 $\pm$ 2,9	26,3 $\pm$ 2,1*	25,5 $\pm$ 1	18 $\pm$ 1,3**
BJAB	9,8 $\pm$ 6,3	10 $\pm$ 3	9 $\pm$ 4,4	7,5 $\pm$ 3,6	7,6 $\pm$ 4,2	7,2 $\pm$ 5,5
U266	5 $\pm$ 3,9	5,3 $\pm$ 2,8	4,5 $\pm$ 3,2	6,3 $\pm$ 5,3	5,6 $\pm$ 4,2	4,8 $\pm$ 3,1
MED-B1	1,5 $\pm$ 0,5	2 $\pm$ 2,7	2 $\pm$ 0,5	2 $\pm$ 0,2	2 $\pm$ 0,3	2 $\pm$ 0,2
B-CLL-ek (4 eset)	25,2 $\pm$ 10,3	29 $\pm$ 9,7	26,8 $\pm$ 4,1	26,1 $\pm$ 9,3	29,8 $\pm$ 11,7	31,1 $\pm$ 10,2

**27. ábra Notch ligand és Notch inhibitor kezelése, illetve kombinációik hatása a Notch-függő transzkripció faktorok expresszióváltozásában, valamint a TGF $\beta$  apoptotikus hatásaiban** (Real time PCR és áramlási citometria eredmények; 72h-ás kezelések, \* - szignifikáns expresszió változás, \*, \*\* - szignifikáns apoptózis változás a kontrollhoz, illetve TGF $\beta$  kezeléshez képest  $p < 0,05$ ).

#### IV.1.2.2. Konstitutív NOTCH1 aktivitás humán Hodgkin lymphoma sejtekben, NOTCH inhibitor és rapamycin kezelés pro-apoptotikus hatásainak vizsgálata

Az előbbiekkal ellentétben HL sejtvonalak esetében vizsgálataink jelentős konstitutív Notch szignál aktivitást, és annak potenciális *pro-survival* hatásait igazolták. Három különböző HL lymphoma – KMH2, DEV, L1236 – sejtvonalban igazoltuk a NOTCH1 és 2 receptor, JAGGED1,2 és DLL1 (delta-like ligand) ligand mRNS-ek expresszióját (RT-PCR eredmények). A két másik Notch receptor esetében a KMH2 sejtekben egyiket sem, míg a másik két sejtvonalban csak *NOTCH3* expressziót tudtunk kimutatni.

A NOTCH1 receptor intracelluláris doménjét detektáló (nem hasított-inaktív) és hasított NOTCH1 receptor fragmentet (hasított-aktív) felismerő ellenanyagot használva mindhárom sejtvonalban konstitutívan aktív Notch1 szignált azonosítottunk. Az intakt receptor formára jellemző, teljes, nagy molekulásúlyú fehérjét azonban nem tudtunk kimutatni Western blottal HL sejtekben (de pl. Jurkat T-ALL sejtekben ép receptor formát is detektáltunk). A hasított NOTCH1 fragmentek jelenlétét HL-ás betegek szöveti mintáiban, Hodgkin és Strenberg-Reed sejtekben immunhisztokémiai vizsgálatainkban perinukleárisan és nukleárisan figyeltük meg. A gamma szekretáz – Notch szignál inhibitor (GSI) kezelés a hasított fragment mennyiségét jelentősen csökkentette Jurkat lymphoma sejtekben, de a vizsgált HL sejtvonalakban a hasított NOTCH1 mennyisége GSI kezelés mellett sem változott, és az intakt receptor sem jelent meg kimutatható mennyiségben (Western blot eredmény) (28.ábra).



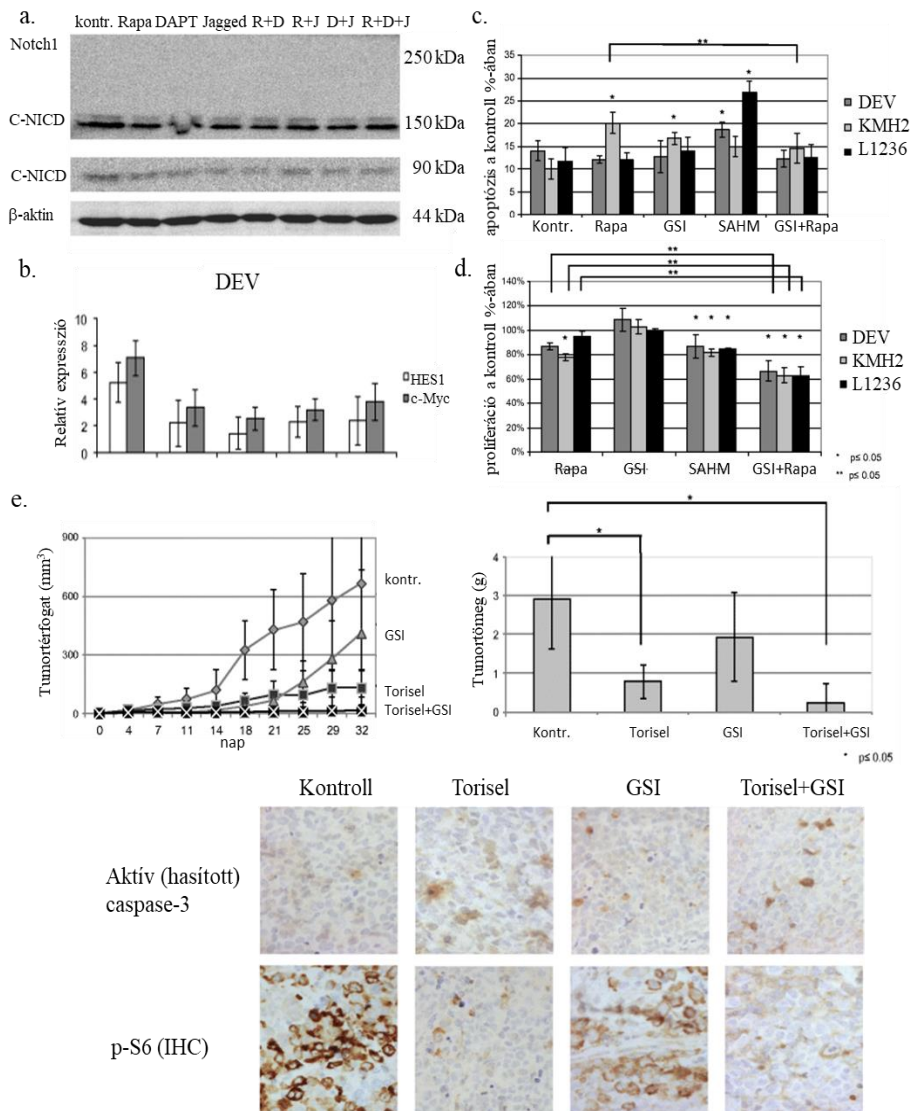
#### 28. ábra Konstitutív aktivált NOTCH1 szignál humán Hodgkin lymphomákban

Az aktivált NOTCH1 szignál jeleként a hasított NOTCH1 receptor intracelluláris domén (NICD) kimutatása Western blottal mindhárom HL sejtvonalban, illetve az intakt és hasított formák Molt4 ALL sejtekben (a.); Hasított NICD mennyiségi változása (Jurkat), illetve ennek hiánya a DEV Hodgkin lymphoma sejtekben gamma-szekretáz inhibitor (DAPT) kezelést követően (b.); Hasított NICD kimutatása humán HL biopsziás mintákban immunhisztokémiai vizsgálattal (c.)

A konstitutív Notch aktivitás háttérben számos jelátviteli szabályozó elem, onkogén, illetve tumorszupresszor gén mutációja állhat, jól ismertek bizonyos NOTCH1 aktiváló mutációk is. A vizsgált sejtvonalak esetében NGS szekvenálással onkogén és tumorszupresszor gének

mutációit analizáltuk. Ezzel az alábbi vizsgált, a jelátviteli hálózat aktivitását befolyásoló génekben nem tudtunk mutációkat azonosítani: *ABL1*, *EGFR*, *GNAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *AKT1*, *ERBB2*, *GNAQ*, *MET*, *RBI*, *ALK*, *ERBB4*, *HNF1A*, *MLH1*, *RET*, *APC*, *EZH2*, *HRAS*, *MPL*, *SMAD4*, *ATM*, *FBXW7*, *IDH1*, *NOTCH1*, *SMARCB1*, *BRAF*, *FGFR1*, *JAK2*, *NPM1*, *SMO*, *CDH1*, *FGFR2*, *JAK3*, *NRAS*, *SRC*, *CDKN2A*, *FGFR3*, *IDH2*, *PDGFRA*, *STK11*, *CSF1R*, *FLT3*, *KDR*, *PIK3CA*, *TP53*, *CTNNB1*, *GNA11*, *KIT*, *PTEN*, *VHL*). A *PIK3Ca* esetében piroszekvenálással, az *FBXW7* (ubiquitin ligáz) esetében pedig Sanger szekvenálással is ellenőriztük ezeket az eredményeket. Míg a vizsgálatban párhuzamosan használt Jurkat T-ALL sejtvonalban az *FBXW7* gén heterozigóta mutációját igazoltuk, addig vad típusú *PIK3CA* és *FBXW7* génszekvenciák jellemezték a HL sejtvonalakat.

*In vitro* vizsgálatainkban Notch-ligand (Jagged1), gamma szekretáz inhibitor (GSI – DAPT), illetve rapamycin kezelések hatásait is tanulmányoztuk HL sejtekben. A kezelések még kombinációban sem befolyásolták jelentősen a NOTCH1 receptor mRNS szintjét és a Notch1 szignál aktivitását sem (Western blot). A rapamycin (mTORC1 inhibitor), DAPT (GSI) és Jagged1 kezelések sem monoterápiában, sem kombinációban nem változtatták meg a kimutatható hasított NOTCH1 fragmentek és intakt NOTCH1 receptorok mennyiségét. A rapamycin mTORC1 aktivitást gátló hatásait igazoltuk, ez hosszútávon a KMH2 sejtekben bizonyult tartósnak. A GSI kezelés csak kis mértékben, szignifikánsan nem, csökkentette az mTOR kináz aktivitást. Párhuzamosan a rapamycin és különböző hatásmechanizmusú Notch szignál gátló kezelések – gamma-szekretáz inhibitor (DAPT, GSIXII) és aktivált NOTCH1 gátló (SAHM1) – apoptotikus és proliferáció gátló hatásait vizsgáltuk. A leginkább rapamycin érzékeny, KMH2 sejtvonalban nem csak proliferációgátló hatást, hanem az apoptotikus sejtek arányának szignifikáns emelkedését tapasztaltuk. Míg a GSI kezelés önmagában nem, addig az aktivált NOTCH1 inhibitor, SAHM1 kezelés az összes HL sejtvonalban szignifikánsan gátolta proliferációt; a DEV, illetve a L1236 sejtekben apoptózist is indukált. Jelentős proliferációgátló hatást figyeltünk meg GSI + rapamycin kombinált kezelésben is, ez a kezelés szignifikánsan jobban gátolta a proliferációt, mint a rapamycin a DEV és L1236 kevésbé szenzitív HL sejtekben is. A konstitutív Notch1 és mTOR aktivitás jelentőségét *in vivo* is megerősítettük L1236 xenograft kísérleteinkben. A GSI (DAPT + GSIXII) kezelés a tumornövekedésben enyhe, nem szignifikáns növekedésgátlást okozott. A rapamycin származék (Torisel) kezelés önmagában és gamma-szekretáz inhibitor kezeléssel kombinációban is gátolta a tumornövekedést és bár a kombinált kezelés a tumorméretét és súlyát is jobban csökkentette, mint a Torisel monoterápia, de a különbség nem volt szignifikáns (29. ábra).

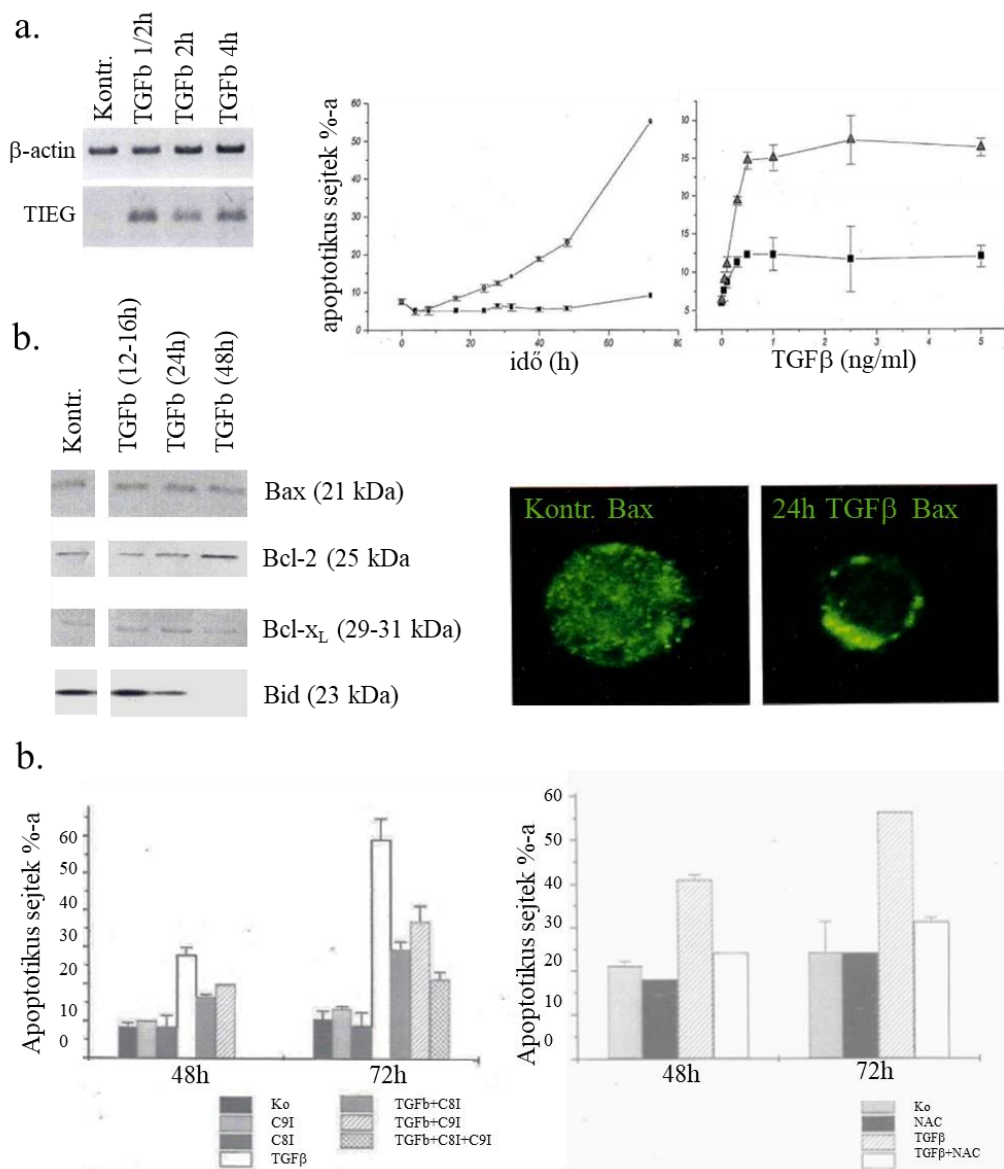


## 29. ábra Konstitutív aktivált (hasított) NOTCH1 receptor intracelluláris domén (NICD) expresszió, illetve a rapamycin Notch inhibitor szenitizáló hatása Hodgkin lymphoma

*sejtvonalakban in vitro és in vivo.* A hasított NOTCH1 receptor expresszió változásának elmaradása mTOR inhibitor (rapamycin), gammaszekretáz inhibitor (DAPT), Jagged1 és ezek kombinált kezelésében *in vitro* (a.); Előbbi kezelések transzkripciós hatásainak igazolása (b.); A rapamycin és Notch inhibitor kezelés hatásai, apoptózis indukáló és szignifikáns proliferáció gátló hatások *in vitro* (c., d.); A rapamycin kezelés Notch inhibitor kezelés tumornövekedés gátló, pro-apoptotikus (aktív kaszpáz-3) és mTORC1 komplex gátló (p-S6) hatása *in vivo* L1236 HL xenograft modellben (IHC festés) (e.)

### IV.1.3. TGF $\beta$ indukált apoptózis lymphoma sejtvonalakban

A kétezres évek elején elsőként vizsgáltuk humán lymphoma sejtvonalakban a TGF $\beta$  indukált apoptózis mechanizmusait. Az intézetben stabilizált HT58 Burkitt lymphoma sejtvonalban írtuk le, hogy az indukált apoptózis halál receptor- és a mitokondriális Bcl<sub>2</sub>, Bax, Bcl<sub>XL</sub> fehérjék mennyiségi változásaitól független módon kaszpáz aktiváció mellett jön létre. A mitokondrium depolarizáció jelentőségét és ebben a Bid hasítás, a Bax transzlokáció szerepét, a reaktív oxigén mennyiségének emelkedését, a kaszpáz-8, illetve -9 aktivitás fokozódásának jelentőségét igazoltuk. Munkáinkban a TGF $\beta$  receptor útvonal aktivitásának változását a TGF $\beta$  indukált korai gén (TIEG) expressziójának megjelenésével igazoltuk. (30. ábra)



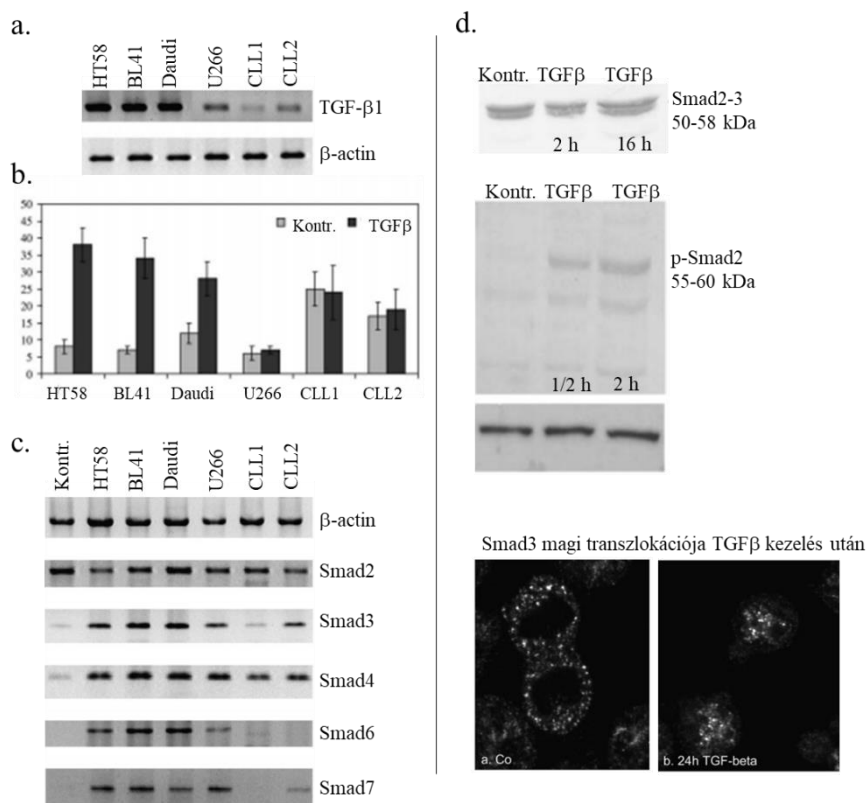
### 30. ábra TGFβ indukált apoptózis, illetve annak mechanizmusa HT58 human lymphoma sejtekben

TGFβ-indukált korai géneexpresszió megjelenésének igazolása HT58 sejtekben (TGFβ - 1 ng/ml TGFβ); Az indukált apoptózis dózis és időfüggése (a.); Pro- és anti-apoptotikus Bcl-család fehérjék mennyiségének vizsgálata (Western blot), a Bax fehérje mitokondriális transzlokációjának kimutatása a TGFβ-indukált apoptózisban (fluoreszcens immunfestés) (b.); A kaszpázok és reaktív oxigén gyökök szerepe a TGFβ-indukált apoptózisban (c.)

A folyamat jelentőségét a TGFβ-rezisztencia daganatbiológiai szerepe miatt kezdtük tanulmányozni, lymphoma sejtvonalak, illetve izolált CLL sejtek TGFβ érzékenység különbségeit jellemeztük. NHL (BL41, HT58, Daudi), myeloma (U266), illetve izolált humán CLL sejtekben endogén TGFβ termelés mellett is megfigyeltük az exogén TGFβ apoptózis indukáló hatásainak különbségét - 3 lymphoma sejtvonal érzékenyek, a myeloma sejtvonal és CLL sejtek rezisztensnek bizonyultak a TGFβ apoptózis indukáló hatásával szemben (31. ábra). Az érzékenység-különbség hátterében a TGFβ receptorok expresszióváltozása is állhat (pl. a leukémia sejtekben azóta már igazolódott a TGFβRII expresszió csökkenése). Előbbiek mellett szolid tumorokban jól ismert mechanizmus a Smad4 elsődleges jelátviteli elem expresszióvesztése, vagy esetleg más az elsődleges jelátviteli elemek (Smadok) mennyiségét, aktivitását befolyásoló változások megjelenése a daganatprogresszió során (321,322).

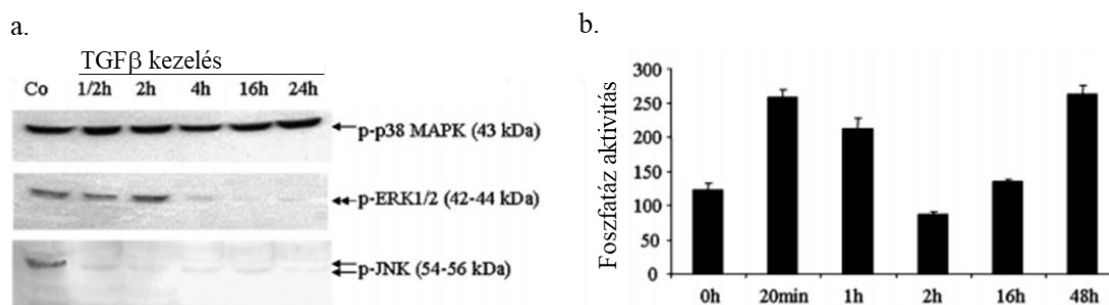


Vizsgálatainkban elsőként mutattuk ki, hogy a lymphomák TGF $\beta$  érzékenység különbségének hátterében a jelátviteli Smadok génexpressziós különbségei nem játszanak szerepet. Eredményeink azonban arra is felhívták a figyelmet, hogy az inhibitor Smadok (Smad6, Smad7) expressziójának megjelenése malignus lymphoid sejtekben szerepet játszhat az érzékenység különbségeiben. Felhívtuk a figyelmet arra, hogy valamennyi vizsgált lymphoma/leukémia sejt – amely endogén TGF $\beta$  termeléssel rendelkezik, de ennek hatásait nem mutatja *in vitro* –, legalább az egyik inhibitor Smad-ot expresszálja ellentétben a normál perifériás mononukleáris sejtekkel (31. ábra).



**31. ábra** A TGF $\beta$  elsődleges Smad útvonál aktiválódás exogén TGF $\beta$  kezelés után lymphoma sejtvonalakban. A TGF $\beta$  mRNS expresszió malignus B lymphocytákban (a.); Exogén TGF $\beta$  indukált apoptózis a vizsgált sejtvonalakban, illetve primer humán *short-term* CLL tenyészetekben (72 h 1 ng/ml TGF $\beta$ ; áramlási citometria) (b.); Kontroll perifériás mononukleáris sejtek, és leukémia lymphoma sejtek Smad mRNS expressziója (RT-PCR eredmények) (c.); TGF $\beta$  Smad jelátviteli útvonál aktiváló hatása (p-Smad2 Western blot) és Smad3 immuncitokémiai festés, TGF $\beta$  indukált Smad komplex magi transzlokációja (d.)

Az alternatív útvonalak esetében a mitogén aktivált kinázok jelentős aktivitását igazoltuk Western blot segítségével lymphomákban. TGF $\beta$  kezelés után a JNK foszfo-protein mennyisége gyorsan, szinte azonnal csökkent, illetve 2 órával a kezelést követően gyakorlatilag kimutathatatlaná vált a p-Erk fehérje, párhuzamosan a p-p38 MAPK mennyisége azonban nem változott. MEK1 kináz gátló kezeléssel igazoltuk, hogy a MEK1 inhibitor kezelés pro-apoptotikus hatású a vizsgált sejtvonalban, ami alátámasztotta mitogén aktivált kinázok aktivitásának szerepét a lymphoma sejtek *in vitro* túlélésében. A MEK1 inhibitor toxikus volt a sejtek egy részében, míg kombinációban a TGF $\beta$  és a MEK1 inhibitor annyira hatásos volt, hogy gyakorlatilag nem maradtak élő sejtek. Az előbbiekkal párhuzamosan a PP2A aktivitásának kétfázisú emelkedését figyeltük meg kísérleteinkben, ami a TGF $\beta$  PP2A aktivitás fokozó, apoptózis iniciátor, majd effektor szerepére is utal. A TGF $\beta$ -indukált foszfatáz aktivitás, korai változásának szerepét az indukált apoptózis folyamatában sikerült igazolnunk kétféle foszfatáz gátló (okadaic sav és endothall) előkezeléssel is (32. ábra és 6. Táblázat).



32. ábra Erk1/2 és JNK inaktiváció (a.), illetve foszfataz aktivitás emelkedés a TGFβ indukált apoptózis válaszban a foszfo-protein Western blot analízis; b. Foszfataz aktivitás kimutatása

6. Táblázat Kináz gátló MEK1 inhibitor kezelés és foszfataz gátlók hatása a TGFβ indukált apoptózisban (mindhárom gátlószert a kezelés előtt alkalmazva használtuk)

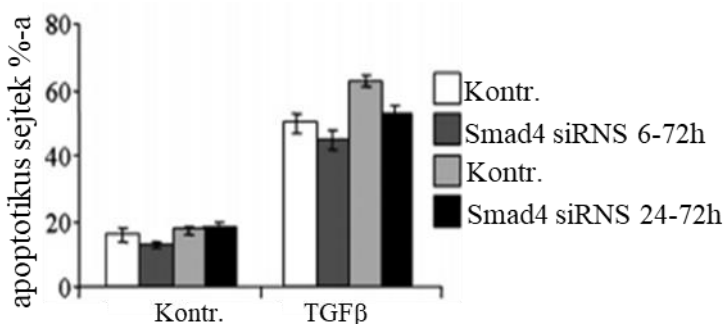
	Apoptózis		
	24 h (%)	48 h (%)	72 h (%)
Control	9±1	10±2	13±3
1 μM MEK1I	11±1	12±2	17±2
5 μM MEK1I	22±2	22±1	24±2
TGFβ 1 ng/ml	17±2	32±2	57±4
1 μM MEK1I+TGFβ	17±3	35±3	n.e.
5 μM MEK1I+TGFβ	50±5	60±6	n.e.

	Apoptózis			Apoptózis	
	48 h (%)	72 h (%)		48 h (%)	72 h (%)
Control	11±3	12±3	Control	9±0	15±3
100 nm OKA	11±2	3±3	1 μm ETA	8±0	17±3
500 nm OKA	12±2	15±4	10 μm ETA	17±1	20±4
TGFβ 1 ng/ml	40±2	58±4	TGFβ 1 ng/ml	38±2	68±7
100 nm OKA+TGFβ	18±6	23±3	1 μm ETA+TGFβ	13±1	20±4
500 nm OKA+TGFβ	16±3	21±2	10 μm ETA+TGFβ	23±2	25±5

Vizsgálatainkban igazoltuk, hogy lymphomákban exogén TGFβ hatására, a receptorok aktivációja, a Smad2 foszforilációja, a Smad komplex (Smad2/3-Smad4) magi transzlokációja is megtörténik. A TGFβ szenzitív lymphoma sejtekben Smad4 hiányában (Smad4 csendesítés, siRNS transzfekció) az elsődleges Smad útvonal aktivációja és a TGFβ korai génaktiváció elmaradt, de eredményeink szerint ez az indukált apoptózis mértékét jelentősen nem befolyásolta (33. ábra).

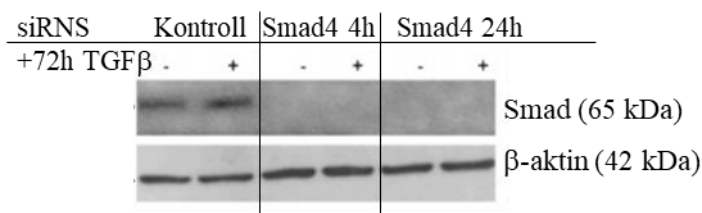
Mindezek az eredmények egyértelműen alátámasztották, hogy a TGFβ szenzitív lymphoma sejtekben az elsődleges TGFβ jelpálya – Smad útvonal – TGFβ mediált aktivációjának a szerepe az indukált apoptózisban kevésbé jelentős, mint az az alternatív útvonalaké.

Smad4 siRNS csendesítés nem befolyásolta a TGF $\beta$  apoptózis indukáló hatását

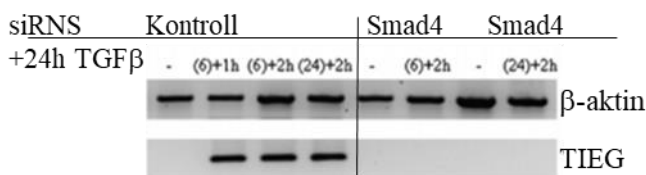


**33. ábra TGF $\beta$  apoptotikus hatása Smad független.** Smad4 siRNS kiütéssel igazoltuk, hogy a hatás a Smad útvonal aktivációjától függetlenül valósul meg. A Smad4 fehérje expresszió eltűnését Western blot-tal, a Smad4 szignál aktivitás elmaradását a TGF $\beta$  korai gén expresszió elmaradásával igazoltuk párhuzamosan.

Smad4 Western blot



Semiquantitatív RT-PCR

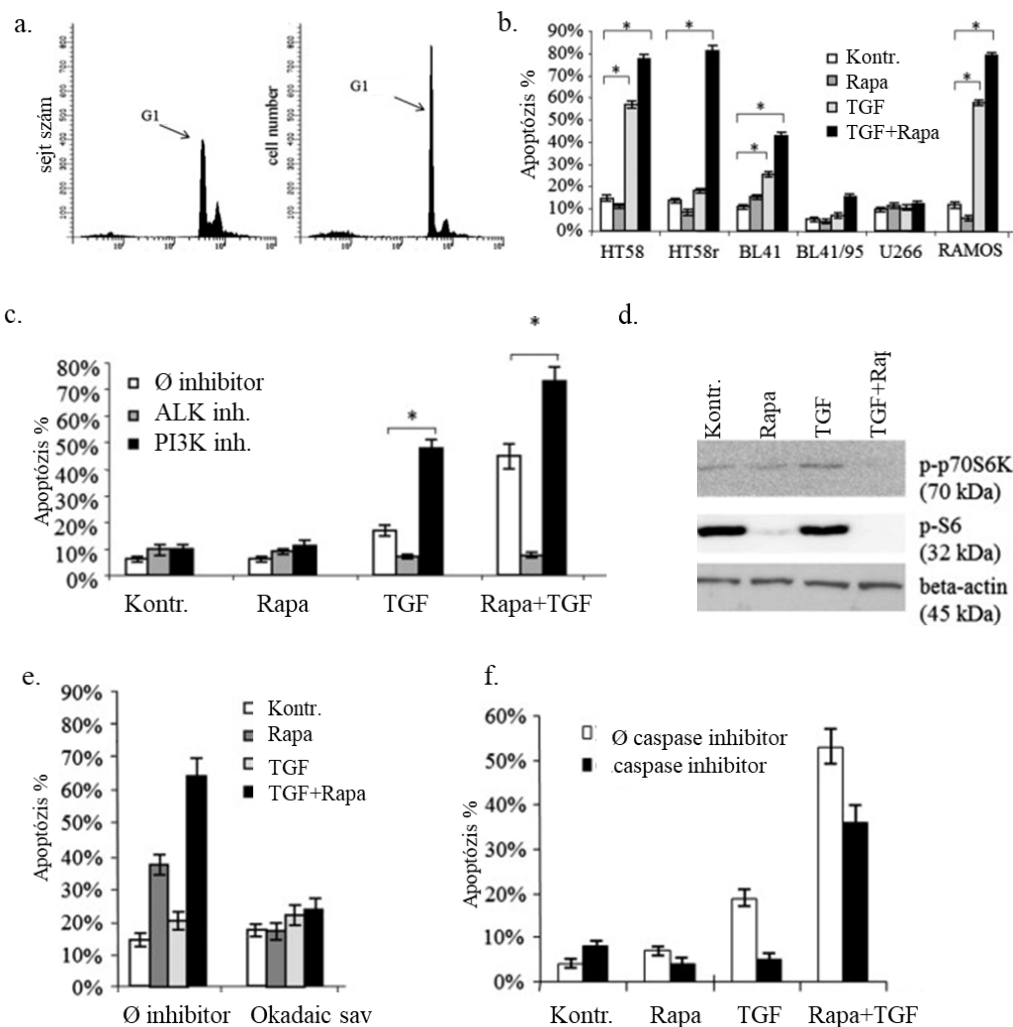


#### IV.1.4. Rapamycin TGF $\beta$ szenzitizáló hatása lymphomákban

Mivel a TGF $\beta$  rezisztens lymphoma sejtvonalakban a TGF $\beta$  receptorok és az elsődleges jelátviteli elemek expressziójának hiánya vagy mutációja nem igazolódott, a rezisztencia mechanizmusokat, illetve a rezisztencia áttörésének lehetőségeit kerestük. *In vitro* megfigyeléseink segítettek a modellek kiválasztását; hosszabb tenyésztés és hosszabbtávon nagyobb sejt koncentráció jelenlétében egyes sejtvonalakban, így a HT58 lymphoma sejtekben exogén TGF $\beta$  rezisztencia jelenik meg. Számos korábbi közlemény sugallta, hogy a rapamycin a TGF $\beta$ -rezisztencia felfüggesztésében az FKBP12 fehérje kötésen keresztül részt vehet. A TGF $\beta$  szignálban az FKBP12 a TGF $\beta$  receptor foszforilációt, aktivációt gátolhatja. A receptormediált egyéb alternatív jelátviteli út vizsgálatában rapamycin, mint FKBP12 kötő molekula, TGF $\beta$  receptor szenzitizáló hatását, vagy más az alternatív útvonalat is érintő hatásait is feltételeztük. Vizsgálatainkban egy TGF $\beta$  rezisztens szubklón sejtvonalban (HT58r) a TGF $\beta$  és rapamycin kombinációs kezelés apoptotikus hatásait vizsgáltuk tovább. NHL sejtvonalak esetében a rapamycin szignifikánsan fokozta a TGF $\beta$ -indukált apoptózist, sőt a TGF $\beta$ -rezisztens HT58r esetében felfüggesztette a kialakult TGF $\beta$  rezisztenciát. A TGF $\beta$  indukált és rapamycin érzékenyített folyamatban igazoltuk TGF $\beta$ R, ezen belül is TGF $\beta$ R1/ALK1 aktivitás emelkedés jelentőségét. ALK1 inhibitor jelenlétében nem tapasztaltunk apoptózist sem TGF $\beta$ , sem TGF $\beta$ +rapamycin kezelést követően. Vizsgálva az mTOR szignál aktivitásával összefüggő p-p70S6K, illetve targetje a riboszómális S6 fehérje mennyiségét a HT58r sejtekben azt tapasztaltuk, hogy TGF $\beta$  kezeléskor a TGF $\beta$  rezisztens sejtekben jelentősen nem változik, nem csökken az mTORC1 komplex aktivitása. A rapamycin esetében viszont jelentős mértékű,

TGF $\beta$ +rapamycin kezelés esetében pedig még jelentősebb mTORC1 aktivitás csökkenés jellemezte a sejteket (34. ábra).

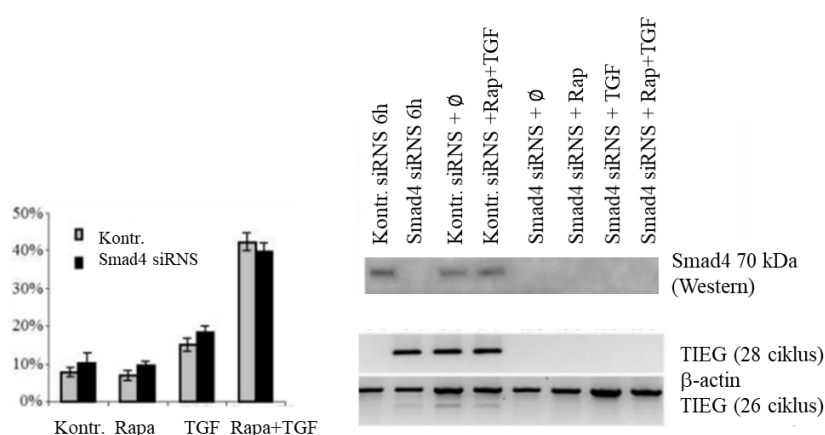
Ezzel összefüggésben azt tapasztaltuk, hogy a PI3K gátló kezelés hatásai az mTORC1 gátló rapamycin hatásaihoz hasonlóan önmagában nem, de TGF $\beta$ -val kombinációban szignifikánsan fokozták a sejtpusztulást. A hármas kombináció (TGF $\beta$ +rapamycin+PI3K inhibitor kezelés) pedig még jelentősebb apoptózis emelkedést okozott. Eredményeinkkel összefüggésben egy tőlünk független munkacsoport is igazolta a TGF $\beta$ -indukált apoptózis Smad4 független mechanizmusait és abban a vizsgálatban is a celluláris foszfatázok, a PP2A szerepére hívták fel a figyelmet. Munkánkban a rövid idejű okadaic sav előkezelés hatásait teszteltük. Kimutattuk a korábban igazolt iniciátor szerepét a PP2A aktivációnak a TGF $\beta$  és a vizsgált TGF $\beta$ +rapamycin-indukált apoptózis mechanizmusában is.



**34. ábra Rapamycin *in vitro* TGF $\beta$  szenitizáló hatása HT58r sejtekben.** A rapamycin sejtciklus gátló hatása (a.); TGF $\beta$  rezisztencia áttörése vagy az apoptózis indukáló hatás mértékének szignifikáns emelkedése különböző lymphoma sejtvonalak többségében *in vitro* (b.); Rapamycin+TGF $\beta$  kezelés hatása kináz inhibitorok jelenlétében (c.); mTORC1 aktivitás változás rapamycin+TGF $\beta$  kezelésben (d.); Foszfatazok szerepének igazolása a TGF $\beta$ , illetve TGF $\beta$ +rapamycin kezelésben (e.); Kaszpázok szerepének vizsgálata TGF $\beta$ +rapamycin kezelésben (f.)

Azt, hogy ez az érzékenyítés nem az FKBP12-TGF $\beta$ R-Smad útvonal hatásait érinti, hanem az előbbi PP2A-mediált folyamatok inkább a jelátviteli hálózatban az mTOR útvonal aktivitás csökkenésével állnak kapcsolatban Smad4 siRNS transzfekciót követően igazoltuk.

Eredményeink szerint a TGF $\beta$  elsődleges jelátviteli útvonalának gátlása (Smad4 siRNS kezeléssel) felfüggesztette a TGF $\beta$  szignál korai válaszgénjének aktivációját (a Smad szignál gátolt maradt), de ez az indukált apoptózis mértékét nem csökkentette a sejtekben, míg az okadaic sav kezelés gyakorlatilag teljesen felfüggesztette azt. További érdekes megfigyelésünk volt, hogy míg a TGF $\beta$  indukált apoptózis folyamatában a kaszpázok szerepét meg tudtuk erősíteni, addig a TGF $\beta$ +rapamycin kezelés esetében a kaszpáz inhibitor kezelés csak részben tudta csökkenteni az indukált apoptózis mértékét (35. ábra). Utóbbi más típusú sejthalál mechanizmusok aktiválódására is felhívta a figyelmet a kombinált kezelés esetében. Ezzel kapcsolatban az autofágia-mediált folyamatok, autofágia-mediált sejthalál folyamatok merültek fel.



**35. ábra** A TGF $\beta$  és TGF $\beta$ +rapamycin hatása Smad útvonaltól független HT58r lymphoma sejtekben. Smad4 kiütés (Smad4 siRNS kezelés) nem befolyásolta az indukált apoptózist (áramlási citometriai) (bal), párhuzamosan a Smad kiütés hatékonyságát Smad4 Western blot és a korai válaszgén expressziós eredményeink (szemi-quantitatív RT-PCR) igazolták (jobb).

A rapamycin hatását a TGF $\beta$  vagy akár más normál szabályozókkal szembeni érzékenyítésben, a daganatnövekedést gátló hatásban *in vivo* is igazoltuk. HT58 lymphoma xenograftok növekedését kéthetes Rapamune kezelés szignifikánsan csökkentette és párhuzamosan nemcsak az osztódások számának csökkenését, de az aktív-kaspáz 3 festéssel jelölődő apoptotikus sejtek számának emelkedését is igazoltuk a xenograft tumorokban.

Utóbbi munkáink eredményei a jelátviteli hálózaton belül az mTOR aktivitás változás ma már jól ismert, egyre fontosabb szerepére hívták fel a figyelmünket a TGF $\beta$ -rezisztencia, illetve a daganatos sejtek egyéb rezisztencia mechanizmusában.

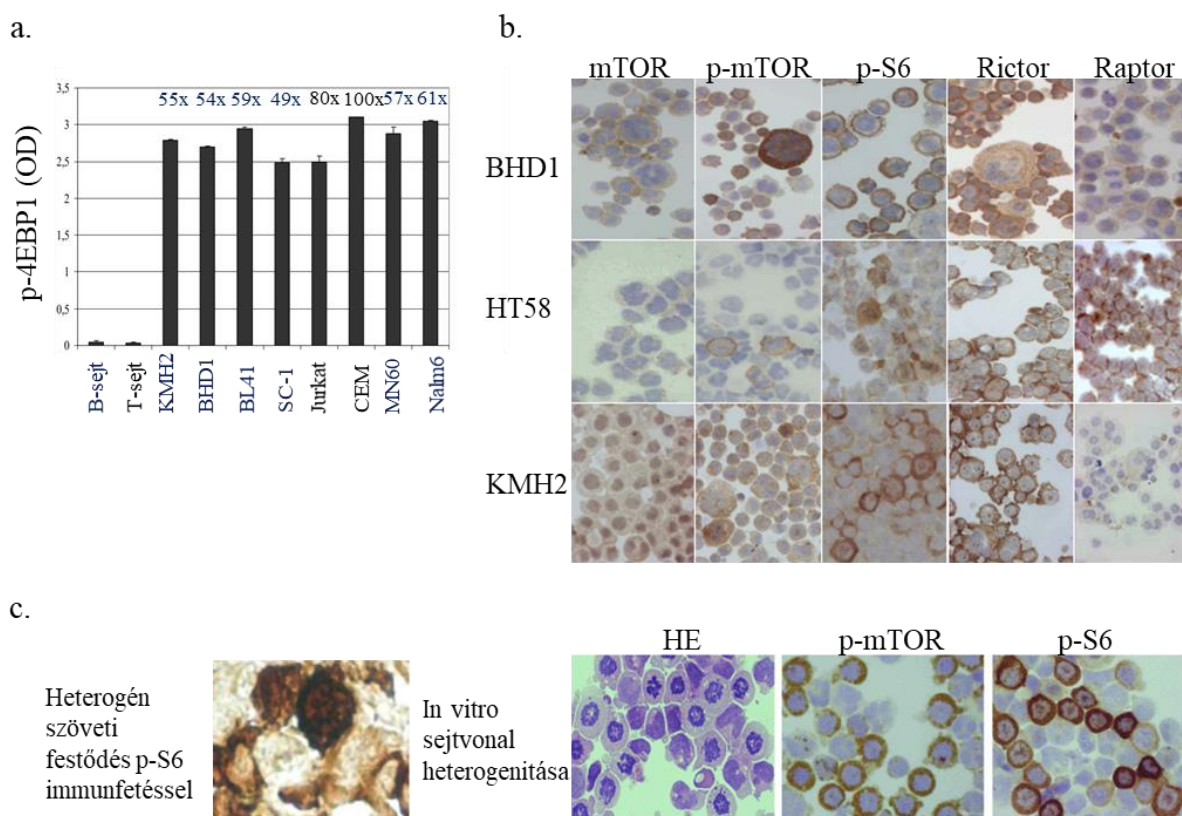
## IV.2. mTOR aktivitás változások és azok jelentősége lymphomákban és leukémiákban

Lymphoma és leukémia sejtvonalakban az mTOR aktivitás jellemzését az mTOR kináz aktív formájának (p-mTOR) és foszforilált célmolekuláinak (p-4EBP1, p-p70S6K, p-S6) többféle vizsgálatával (ELISA, immuncitokémia és Western blot) végezhetjük. Az elmúlt években ezeket a technikákat és értékeléseket fejlesztettük. Az előbb említett fehérjék jelenleg is a leggyakrabban meghatározásra kerülő fehérjék mTOR, mTORC1 komplex aktivitás vizsgálatokban. mTORC1 aktivitás meghatározásához ELISA vizsgálatokban a legmegbízhatóbbnak, legszenzitívebbnek a p-4EBP1, míg immunhisztokémiai vizsgálatokban a foszforilált riboszomális S6 kimutatása bizonyult. p-mTOR és p-Ser473-Akt fehérje *in situ* IHC vizsgálata biopsziás anyagokban nem igazán megbízható, az anyagok fixálásától és minőségétől nagymértékben függ a reakció értékelhetősége, aminek a lymphomák vizsgálatában külön jelentősége van, hiszen a molekuláris vizsgálatok miatt a minták nem formalinban, hanem frissen érkeznek a patológiára. Saját vizsgálatainkkal olyan marker

paneleket dolgoztunk ki, amelyek adott tumortípusok esetében optimálisak nemcsak az mTORC1, hanem a C2 komplex aktivitásának vizsgálatokor is.

#### IV.2.1. Lymphoma sejtvonalak mTOR hiperaktivitása, a mitózisban jellegzetes mTORC1 aktivitás függő fokozott riboszómális S6 fehérje foszforiláció

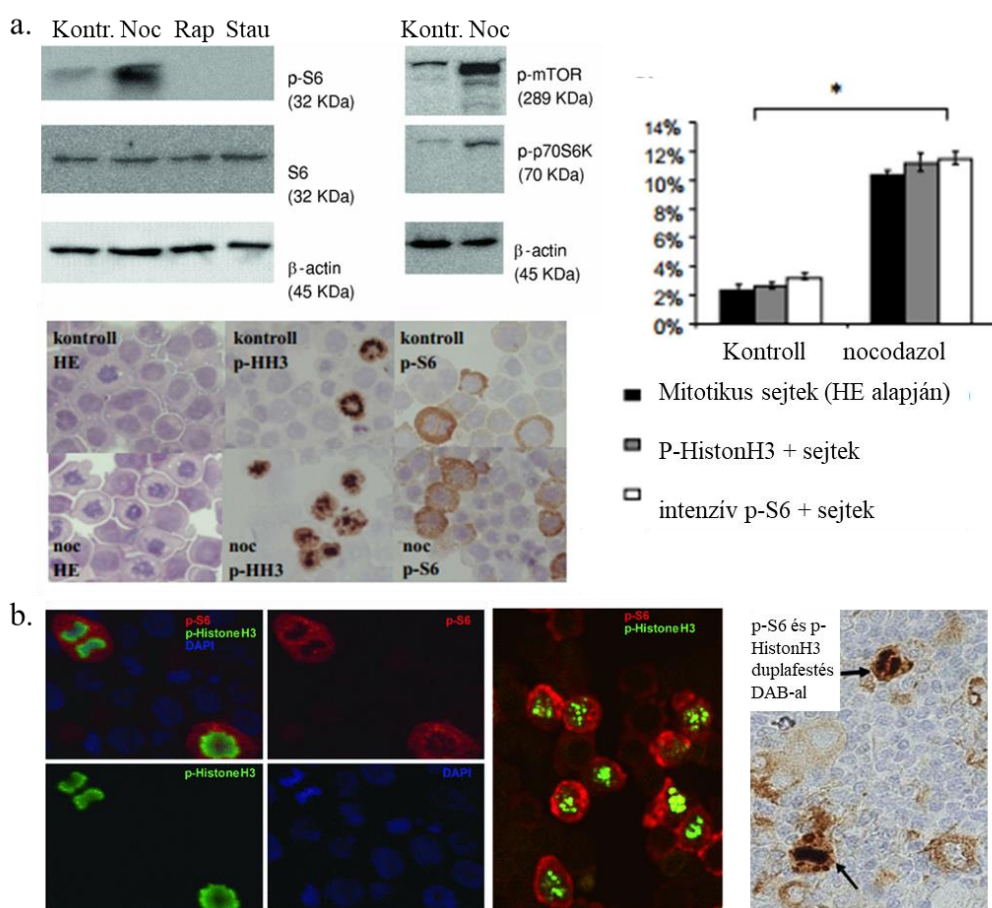
Izolált normál humán B,- és T-sejtekben meghatározhatóhoz képest a lymphoma és leukémia sejtvonalakban szignifikánsan nagyobb mennyiségű p-4EBP1 fehérjét mutattunk ki ELISA-val. Ez a lymphoma, leukémia sejtek magas mTORC1 aktivitására utal. Kvantitatív eredményeinket morfológiai, immuncitokémiai vizsgálatokkal is megerősítettük. A kétféle mTOR komplex mennyiségét a komplexek specifikus vázfehérjéinek kimutatásával kezdtük (mTORC1-komplex Raptor; mTORC2-komplex Rictor). A sejtvonalak mTORC1 és C2 komplex megoszlásában egyedi különbségeket figyeltünk meg. Például két Hodgkin lymphoma sejtvonalban (BHD1, KMH2) jóval alacsonyabb mennyiségű Raptor fehérjét mutattunk ki. Ezek a p-S6 festésekben igen jellegzetes heterogén mintázatot, eloszlást mutattak; míg a proliferáció mértékével összefüggő emelkedést, illetve a sejtciklus különböző fázisaiban eltérő mértékű mTORC1 aktivitásra utaló festődést figyeltünk meg. Ez a heterogenitás a vizsgált lymphoma szövetekben is megjelent (36. ábra).



#### 36. ábra Lymphoma, leukémia sejtek mTORC1 aktivitását jellemző markerek vizsgálata

p-4EBP1 ELISA méréseink eredményei a B- és T-sejtekhez képest is jelentősen emelkedett mTORC1 aktivitásra utaltak a lymphoma és leukémia sejtekben (az ábrán a B-sejtes sejtvonalakat kék színnel különböztettem meg a T-sejt eredetű sejtvonalaktól) (a.); Cytospin lemezek immuncitokémiai festése (DAB – barna színreakció) a diffúz nagy B-sejtes (MedB1), a Burkitt lymphoma HT58 és a Hodgkin lymphoma sejtekben is jelentős mTOR aktivitást igazolt, valamennyi sejtvonalban kimutattuk az mTORC2 komplex jelenétére utaló Rictor vázfehérje magas expresszióját is, a KMH2 Hodgkin lymphoma sejtvonal esetében a párhuzamosan alacsony mennyiségű Raptor (mTORC1 vázfehérje) expressziója az adott sejt jelentősebb mTORC2 expressziójára hívta fel a figyelmet (b.); Humán lymphoma biopsziás mintákban, illetve a HT58 lymphoma sejtekben megfigyelt jellegzetes heterogén p-S6 festődést mutatja be. (nagyítás 200, illetve 400x (c.)

Előbbiek háttérében a sejtciklus fázisaiban eltérő mértékű mTORC1 aktivitást feltételeztünk. Ennek vizsgálatához áramlási citometriai méréseket és többszörös immunfestéseket is végeztünk. Szöveti vizsgálataink alapján elsősorban az osztódással, mitotikus alakok megjelenésével párhuzamosan figyelhettük meg a legintenzívebb p-S6 festődéseket. A sejtek növekedését szinkronizáló kezelésekkel (staurosporin, rapamycin – G1 sejtciklus blokk) és nocodazol kezelés után (mikrotubulus polimerizáció gátlás – mitózis blokk) is megvizsgáltuk a p-S6 fehérje mennyiségét. A sejtek felhalmozódtak a G1 illetve a mitotikus sejtciklus fázisokban. Az osztódási fázisban lévő sejteket p-Histon H3 immunfestéssel jelöltük, míg párhuzamosan p-S6 ellenanyaggal festettük a sejteket, majd fluoreszcens mikroszkóppal és áramlási citométrával is analizáltuk az eredményeket. A nocodazol kezelés hatására megnövekedő osztódó alakok számával összefüggésben szignifikánsan megnőtt a magasabb (+++) mTOR aktivitást mutató sejtek mennyisége. Az osztódó sejtekre jellemző kromoszóma elrendeződésű sejtek intenzív (+++) p-S6 festést mutattak. Az előbbivel ellentétben a staurosporin és a rapamycin kezelések 24. órájára az osztódási alakokkal párhuzamosan a p-S6 festés is gyakorlatilag eltűnt a cytospin lemezekon (37.ábra).



**37. ábra Sejtciklus gátló és mitotikus blokkot okozó kezelések hatása KMH2 sejtek p-S6 fehérje mennyiség változásában.** Nocodazol, rapamycin és staurosporin kezelést követő p-S6 fehérje szint változás (Western blot), illetve p-Histon H3 és p-S6 immunocitokémiai festések 24 h nocodazol kezelést követően; a mitotikus alakok, a p-HH3 pozitív sejtek és a +++ p-S6 sejtek arányának változása nocodazol kezelést követően  $(p < 0,05)$  (a.). Kettős immunfestések (p-S6 és p-Histon H3) fluoreszcens és peroxidáz enzim-DAB előhívással (barna) készült humán lymphoma biopsziás minták, utóbbi esetében a sejten belüli festés lokalizációja (kromoszómák – p-Histon H3, citoplazmatikus – p-S6) támasztja alá in vitro megfigyeléseinket (nagyítás 400x) (b.).

Az áramlási citometriai elemzéseinkben a kettős pozitív, osztódó sejteket a magasabb mTOR aktivitással összefüggő magas p-S6 festés mean (átlag) érték jellemezte a kontroll és a kezelt tenyészetekben is, ez közel tízszerese volt a p-HH3 negatív (nem osztódó) sejtekének: p-HistonH3- sejtek p-S6 MFI értéke 23,69-26,38; p-HistonH3+ sejtek p-S6 MFI értéke 189,87-200,58. Ezekkel a vizsgálatainkkal elsőként igazoltuk, hogy az osztódó lymphoid sejtekben az mTOR aktivitással összefüggő p-S6 fehérje mennyisége szignifikánsan emelkedik, tehát mTORC1 aktivitása magasabb, mint a sejtciklus más fázisaiban levő sejteké (37. ábra).

#### IV.2.2. Humán Hodgkin és Non-Hodgkin lymphomák mTOR aktivitásának jellemzése, annak prognosztikai összefüggései

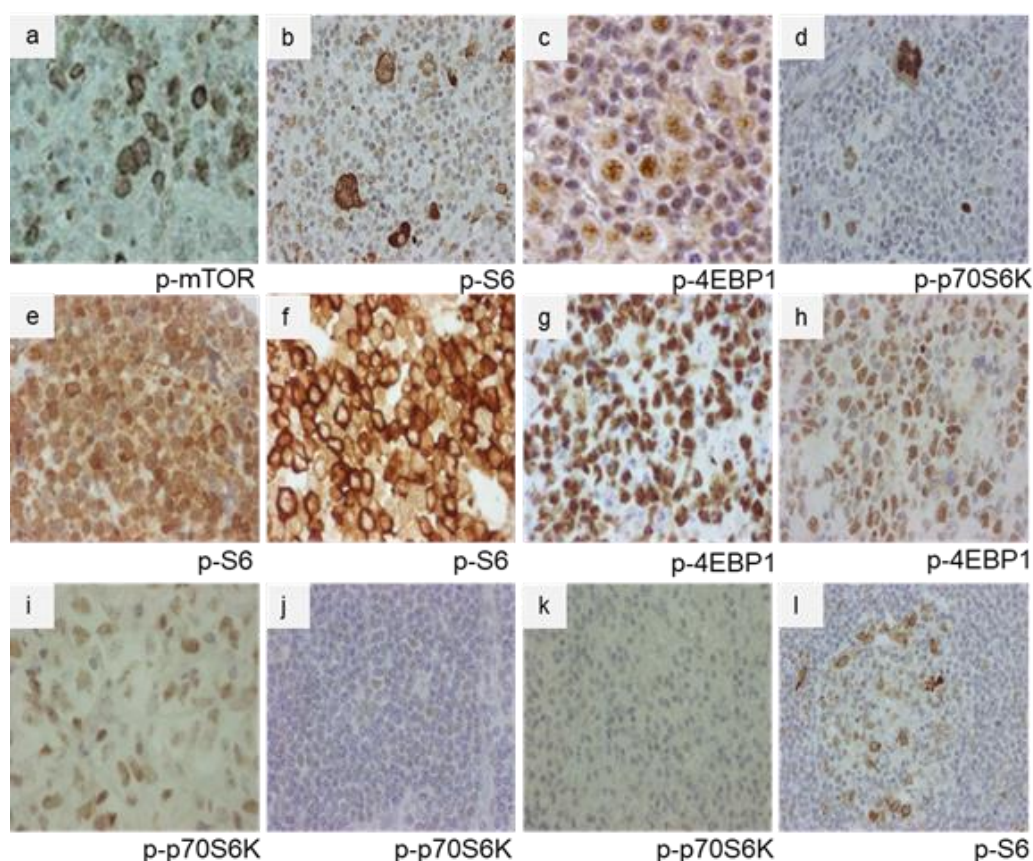
A lymphomák mTOR aktivitásának jellemzését gyakorlatilag az összes lymphoma típust magába foglaló szöveti microarray blokkok segítségével kezdtük meg. TMA metszeteken p-mTOR, p-S6, p-p70S6K immunhisztokémiai reakciók értékelését végeztük el. A p-S6 festődés negatív, legfeljebb enyhén pozitív (0/+) volt a reaktív, nem malignus lymphocytákban, míg az értékelésben és a festés minőségi kontroljában a plazmasejtek erős pozitivitása (++++) nyújtott segítséget. A marginális zóna-, perifériás T-sejtes lymphomák, krónikus lymphoid leukemiák a vizsgált minták túlnyomó többségében negatív vagy gyenge immunhisztokémiai reakciókat mutattak, az mTOR-szignál fokozott aktivitása előbbiekben nem jellemző. Follikuláris lymphomák (FL) esetében a p-S6 festések a minták 100%-ában negatívak voltak, viszont a p-mTOR és p-p70S6K festés az esetek több mint felében egyértelműen erős pozitivitást mutatott. Mivel egyéb vizsgálatok, hasonlóan a miénkhez az mTOR aktivitás legmegbízhatóbb IHC markerének a p-S6 festést ítélték paraffinos metszetek esetében, így a follikuláris lymphomák mTOR aktivitását, az előbbi ellentmondások miatt nem tudtuk egyértelműen meghatározni. Más lymphoma típusok: a Hodgkin, a diffúz nagy B-sejtes (DLBCL), az anaplasias nagy-sejtes (ALCL), köpenysejtes, a lymphoplasmocytás és a Burkitt lymphomák magas mTOR aktivitást mutattak (7. Táblázat, 38. ábra). Ezekben a lymphomákban az esetek minimum 50%-ában az infiltráló gyulladásosejtekhez képest a lymphoma sejtek mTOR aktivitását jellemző festéseket intenzívebbnek értékeltük.

Az előbbiek alapján a Hodgkin lymphomákat és a Diffúz nagy B-sejtes lymphomák heterogén csoportjait vizsgáltuk részletesebben.

7. Táblázat Lymphoma típusok mTOR aktivitása a táblázat a patológiai értékelés eredményeit mutatja

Diagnózis	p-mTOR	p-p70S6K	p-S6	mTOR-szignál aktivitás	n
Burkitt-lymphoma	+	+ / ++	++	+	4
Hodgkin-lymphoma	++	++	++	+	23
Köpenysejtes-lymphoma	70% + / ++	+ / ++	+ / ++	+	11
Anaplasias nagy-sejtes lymphoma	-	+ / ++	++	+	9
Diffúz nagy B-sejtes lymphoma	50% + / ++	50% ++	50% ++	+	10
Marginális zóna lymphoma	80% -	80% -	80% -	-	12
Perifériás T-sejtes lymphoma	75% +	- / +	-	-	12
Follikuláris lymphoma	70% + / ++	60% + / ++	- ?	?	10
Krónikus lymphocytás leukemia / Kis lymphocytás lymphoma	- / +	- / +	-	-	13

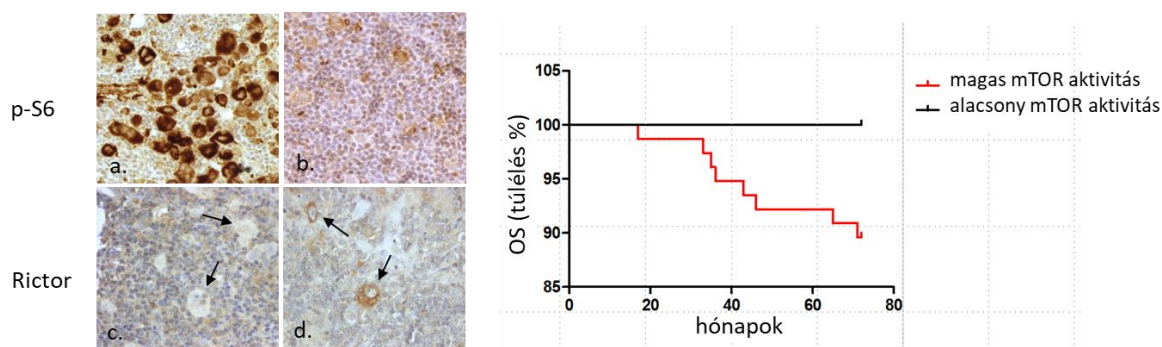




**38. ábra Lymphoma típusok mTOR aktivitása.** p-mTOR, p-p70S6K és p-S6 reprezentatív immunfestések Hodgkin-lymphoma (a-d), köpeny sejtés lymphoma (e), Burkitt-lymphoma (f-g), DLBCL (h), anaplasztikus nagy sejtés lymphoma (i), krónikus lymphocytás leukémia/kis lymphocytás lymphoma (j), marginális zóna lymphoma (k); kontroll nyirokcsomó (l); (IHC), 200X, 400X.

#### ***IV.2.2.1. Hodgkin lymphomák***

Összesen 83 HL-ás beteg mintáit vizsgáltuk, ezek 93 %-a (77 eset) szövettani altípustól független magas mTOR aktivitást mutatott. 72 beteg esetében állt rendelkezésre klinikai kórtörténet. A 6 alacsony és 66 magas mTOR aktivitású beteg a magas mTOR aktivitás mellett is többségében teljes remisszióba került (az esetek 80%-a). Érdekes azonban, hogy ahol a lymphoma sejtek alacsony mTOR aktivitást mutattak (6 eset, alacsony mTOR aktivitású esetek 100%-a), a betegek gyakorlatilag gyógyultnak tekinthetők, a teljes remisszió relapszus mentesen több mint 5 évet ért már el. A lymphoma progresszió miatt elhunyt betegeknél (10 eset) elemzésünk, az előbbiekkal ellentétben kivétel nélkül minden eset magas mTOR aktivitást mutatott. Adataink az előbbiek ellenére nem tudták alátámasztani az mTOR aktivitás különbségek szignifikáns prognosztikai szerepét a vizsgálatban szereplő rossz prognózisú esetek kis száma miatt (39. ábra, 8. Táblázat).

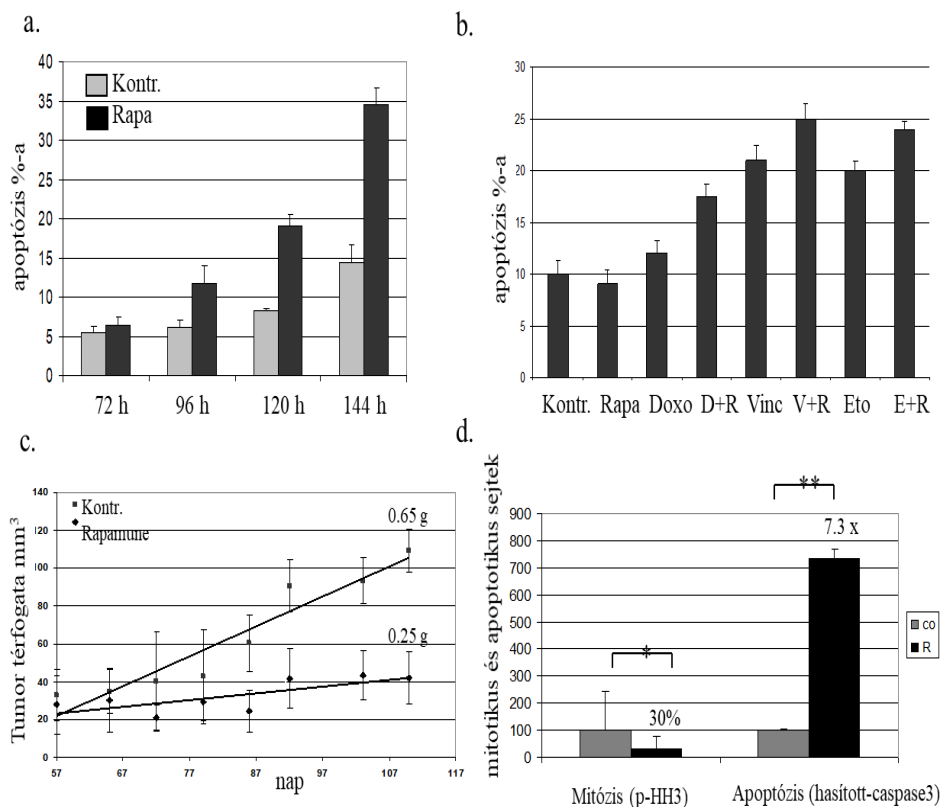


**39. ábra Hodgkin lymphomák mTOR aktivitása jellemzően mTORC1 komplex aktivitással áll összefüggésben.** HL-ben több mint 90%-ában magas mTORC1 aktivitás jellemző alacsony aktivitás csak kevés esetben figyelhető meg azok azonban minden esetben jó prognózisú esetek. Előbbiek mellett az mTORC2-komplexhez köthető Rictor fehérje expressziója nem jellemző, (egy esetben találtunk Rictor overexpressziót, a többi eset nagyon alacsony Rictor expressziót mutatott) (c) (IHC, 400x).

**8. Táblázat Hodgkin lymphomás esetek mTOR aktivitásának, illetve egyéb klinikai jellemzők vizsgálatának eredményei**

Klinikai jellemzők	Összes eset	Magas mTOR	Alacsony mTOR
<b>Összes eset</b>	83	77	6
<b>Életkor</b>			
<18	27 (33%)	24/27 (89%)	3/27
18<<45	41 (49%)	39/41 (95%)	2/41
>45	15 (18%)	14/15 (93%)	1/15
<b>Nemek megoszlása (n=83)</b>			
Férfi	40 (48%)	36/40 (90%)	4/40
Nő	43 (52%)	41/43 (95%)	2/43
<b>Ann Arbor stádium (n=83)</b>			
I-II	53 (64%)	49/53 (96%)	4/53
III-IV	30 (36%)	28/30 (97%)	2/30
<b>B-tünetek (n=83)</b>			
Megjelentek	25 (30%)	25/25 (100%)	0/25
Nem jelentek meg	58 (70%)	52/58 (95%)	6/58
<b>Szöveti altípusok</b>			
NS	47 (57%)	44/47 (94%)	3/47
MC	18 (22%)	17/18 (94%)	1/18
LR	8 (10%)	8/8 (100%)	0/8
LD	3 (4%)	3/3 (100%)	0/3
NLPHL	7 (8%)	5/7 (71%)	2/7
<b>Teljes klinikai kórtörténet</b>	72	66	6
<b>Komplett remisszió</b>	44/72 (61%)	40/44 (91%)	4/44
<b>Betegség kiújulása (n=25)</b>	25/72 (35%)	23/25 (92%)	2/25
Kiújulás után CR	15/25 (60%)	13/15 (87%)	2/15
Csontvelő transzplantáció	13/25 (52%)	12/13 (92%)	1/13
<b>Meghalt betegek</b>	11/72 (15%)	11/11 (100%)	0/11

Eredményeinknek jelentőségét, az mTOR aktivitás potenciális terápiás szerepét megerősítették korábbi megfigyeléseink is, miszerint az *in vitro* rapamycin és az *in vivo* Rapamune kezelés is jelentősen csökkenti a különböző Hodgkin lymphoma sejtvonalak és xenograftok növekedését, a kezelés a sejtekben és *in vivo* xenograft modellben is apoptózist indukál. Kombinációs kezeléseink esetében azt is megfigyeltük, hogy a rapamycin kezelés a hagyományos terápiás kezeléseink eredményeit is fokozza HL sejtekben *in vitro* (40. ábra).

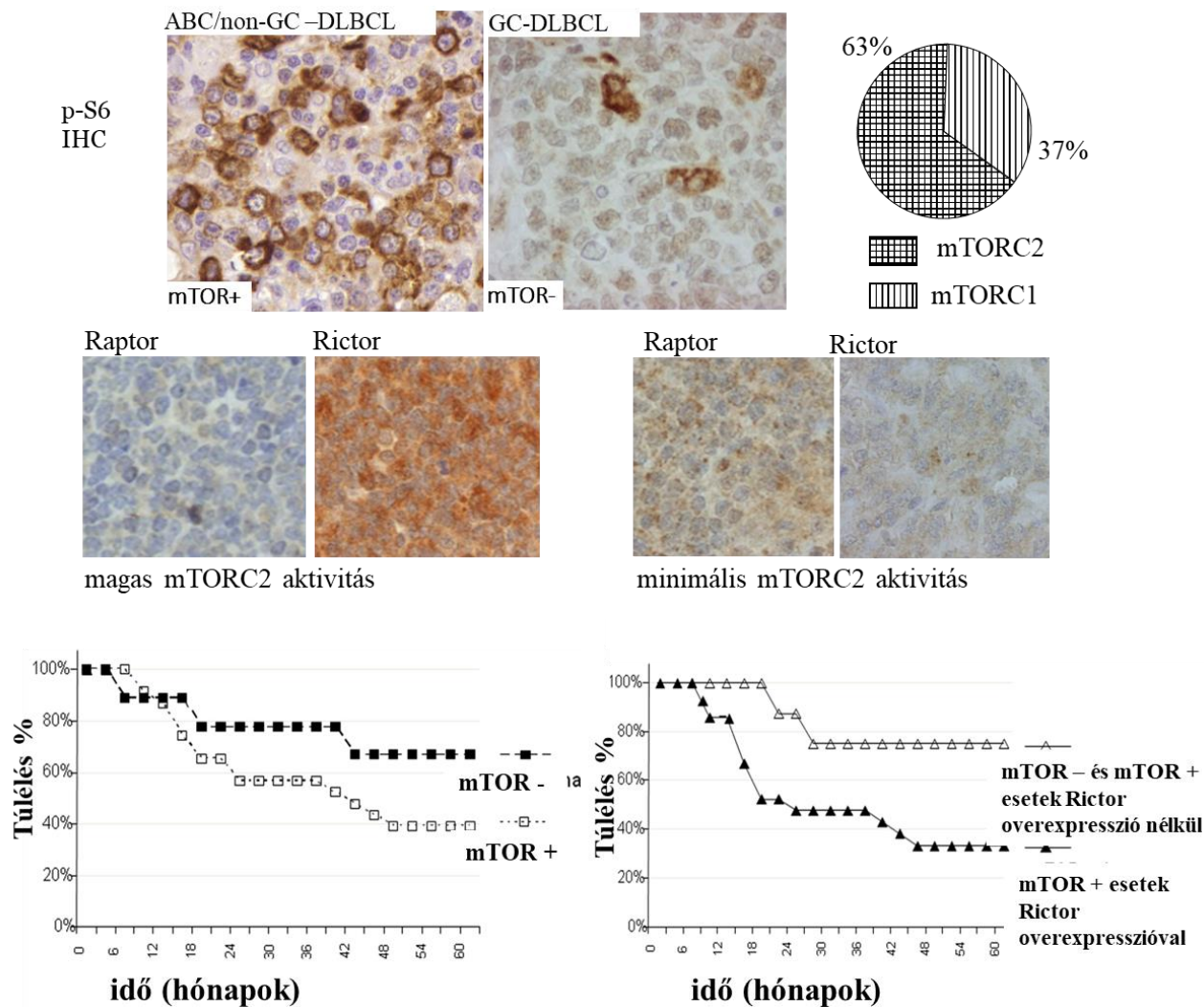


**40. ábra. Rapamycin és Rapamune kezelés proliferáció gátló, apoptózist serkentő hatásai *in vitro* és *in vivo*.** A Rapamycin apoptotikus hatása KMH2 HL sejtekben (a.); A rapamycin fokozza a kemoterápiás szerek hatását (72h rapamycin 50 ng/ml, doxorubicin 10  $\mu$ M, 50nM vincristin, 50 nM etoposide) (b.); Rapamune (3 mg/kg) *in vivo* tumornövekedést gátló hatása (c.); xenograft tumorokban mitotikus és apoptotikus sejtek mennyiségi változása rapamycin kezelés után (p-HH3 és hasított caspase-3 IHC kiértékelése) (d.).  
\*,\*\*p<0,05

#### IV. 2.2.2. Diffúz nagy B sejt lymphomák

Diffúz nagy B sejt lymphomákban az mTOR aktivitás jellemzésekor több immunreakciót is értékeltünk (p-mTOR, p-S6, Rictor, Raptor), a DLBCL altípusokat a megfelelő immunreakciókkal re-klasszifikáltuk és a betegek klinikai és túlélési adatait is összegyűjtöttük. A patológiai értékeléseket követően adataink szerint a 68 esetből magas p-S6 expresszió jellemezte a DLBCL-ás betegek 62%-át. Az aktivált B-sejt eredetű (ABC-DLBCL/non-GC) DLBCL-ekben az esetek 80%-ára (40/50) volt jellemző a magas mTOR aktivitás (mTOR aktív, mTOR+). Míg a jelenlegi terápia mellett jobb prognózisú csíráközpont eredetű DLBCL-ákban (GC-DLBCL) előbbiekkkel ellentétben gyakorlatilag nem tudtunk mTOR aktivitást igazolni (18 esetből kettő mutatott csak enyhe pS6 pozitivitást). A két különböző mTOR komplex jellegzetes fehérjéinek vizsgálata alapján, az esetek 43%-ában fokozott Rictor expressziót figyeltünk meg, az mTOR aktív esetek kétharmadát (63%) magas Rictor expresszió jellemezte, vagy a Raptorhoz képest domináns Rictor expressziót (legalább + különbség a két fehérje IHC reakciójának értékelésében) tapasztaltunk (41. ábra).

A betegek túlélési és egyéb klinikai adatait összevetve az mTOR aktivitás jellemzés IHC-eredményeivel, szignifikáns összefüggést tudtunk kimutatni az mTOR aktivitás és a DLBCL ABC-GC altípusok megoszlása között. Az emelkedett mTOR aktivitás, az ABC/nonGC típushoz hasonlóan összefüggött a rossz prognózissal. A magas mTOR aktivitású esetek között gyakrabban fordult elő Rictor overexpresszió (mTORC2 komplex).



**41. ábra Diffúz nagy B-sejtes lymphomák mTOR aktivitása.** A non-GC típusú DLBCL-ák jellegzetesen magas mTOR aktivitása, illetve mTORC2 komplex mennyiségének emelkedése. Az mTOR aktivitás és a Rictor overexpresszió prognosztikai jelentősége. (reprezentatív immunhisztokémia képek nagyítás 40X).

Ezekben az esetekben figyeltük meg a legrosszabb túlélési eredményeket, ami az mTORC2 komplex jelenlétének és a magas mTOR aktivitásnak (potenciális magas mTORC2 aktivitásnak) negatív prognosztikai szerepére hívta fel figyelmünket (9. Táblázat).

### 9. Táblázat humán DLBCL-es esetek mTOR aktivitásának és egyéb klinikai adatainak összefoglaló táblázata

	Összes eset		Magas mTOR aktivitás (mTOR+)		Alacsony mTOR aktivitás (mTOR-)	
	Betegek száma	%	Betegek száma	%	Betegek száma	%
<b>DLBCL betegek száma</b>	68		42	62	26	38
<b>Életkor (évek)</b>						
<60	22	32	13	59	9	41
>60	46	68	29	63	17	37
<b>Nemek</b>						
Férfi	34	50	24	71	10	29
Nő	34	50	18	53	16	47
<b>Extranodális érintettség</b>						
Nincsen	22	32	15	68	7	32
1 oldal	15	22	9	60	6	40
>1 oldal	31	46	18	58	13	42
<b>Nemzetközi prognosztikus index (IPI)</b>						
0-1-2	24	35	17	71	7	29
3-4	44	65	25	57	19	43
<b>DLBCL altípusok</b>						
GC-DLBCL esetek	18	26	2	11	16	89
non-GC v. ABC DLBCL esetek	50	74	40	80	10	20
<b>Rictor expresszió</b>						
Magas	29	43	26	90	3	10
Alacsony	39	57	16	41	23	59
<b>Stádium</b>						
I-II	19	28	12	63	7	37
III-IV	49	72	30	61	19	39

#### IV.2.3. Gyermekkori akut lymphoid leukémia sejtek jellemző mTOR hiperaktivitása és ennek lehetséges epigenetikai regulációs háttere, jelentősége

Az akut lymphoid leukémia (ALL) a leggyakoribb gyermekkori malignus kórkép. Molekuláris genetikai eltérések az ALL-es lymphoblastok 70-80%-át jellemzik, ezek, mint független tényezők módosítják a betegek prognosztikai besorolását, meghatározzák kezelésüket (jobb prognózissal – 4-es, 7-es, 10-es triszómia, hyperdiploiditás, *ETV6-RUNX1* transzlokáció –, illetve rossz prognózissal összefüggő – transzlokációk: pl. *BCR-ABL1*, *TCF3-PBX1*, *MLL-AF4*; 21-es kromoszóma intrakromoszómális amplifikációja, hypoploiditás – molekuláris eltérések) (323-331). Az azonosított molekuláris változások célzott terápiás lehetőségeket is jelentenek (Ph+ ALL-es betegek tirozin-kináz gátló kezelése) (332). Az életkor, a kezdeti fehérvérsejtszám, az immunfenotípus, a központi idegrendszer érintettsége/hiánya, cytogenetikai eltérések és a 8. napi szteroid válasz alapján az ALL-es gyermekeket rizikó besorolásuknak megfelelően kezelik (SR, MR, HR). A 15. napi blasztok magas arányának is terápiás következménye van. Annak ellenére, hogy a 2 évig tartó kezeléseik eredményei igen jók a betegek 20%-ában recidíva alakul ki, és még a legmodernebb kezeléseik, az allogén őssejtátültetés kombinációja mellett is a betegek 15-20%-át veszítjük el. Ennek leggyakoribb oka a kialakuló terápia rezisztencia, recidíva. Fontos, hogy a terápia közben, illetve azt követően fellépő mellékhatásokat is kezelni kell, mivel 50%-ban krónikus egészségügyi probléma léphet fel (334-336).

A Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekgyógyászati Klinika Hematológiai osztályával együttműködve 2008 és 2012 között kezelt ALL-es betegek (n=79) csontvelői és perifériás vér mintáiból izolált sejteket gyűjtöttünk (n=372) az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben. Összességében 25 gyermek esetében a kezelés valamennyi fázisából (0. napi,

kezeletlen minta, kemoterápia 15. napi, 33. napi és protokoll M előtti időpontok) (n=100) gyűjtött minták, illetve még 28 beteg esetében a diagnóziskori minták álltak rendelkezésre.

Kétféle ELISA (p-S6 és p-4EBP1) mérés eredményeit felhasználva izolált normál perifériás lymphocyták, B- és T-sejtek mTOR aktivitását vetettük össze ALL sejtvonalak mTORC1 aktivitásával (10. táblázat). A leukémia sejtekben jelentős mTOR aktivitás emelkedést igazoltunk. Mivel a p-4EBP1 ELISA esetében a mérési tartományok sokkal megbízhatóbb eredményeket mutattak, ezért az izolált humán leukémia sejtekben meghatározásainkat a p-4EBP1-szint mérésekkel folytattuk.

**10. Táblázat mTOR aktivitást jellemző p-S6 és p-4EBP1 fehérjék mennyiségének vizsgálata ELISA-val.** Normál B-, illetve T-sejtek expressziójához viszonyított változásokat, mint relatív OD értéket adtuk meg T-ALL (Jurkat, CEM) és B-ALL sejtvonalakban (Nalm6, Mn60).

	p-S6		p-4EBP1	
	OD	relatív OD	OD	relatív OD
Jukat	0,397	19,85x	2,537	63,425x
CEM	0,118	5,9x	3,102	77,55x
Nalm6	0,323	16,15x	3,063	76,575x
Mn60	0,423	21,15x	2,895	72,374x
PMNC	0,02	1x	0,04	1x

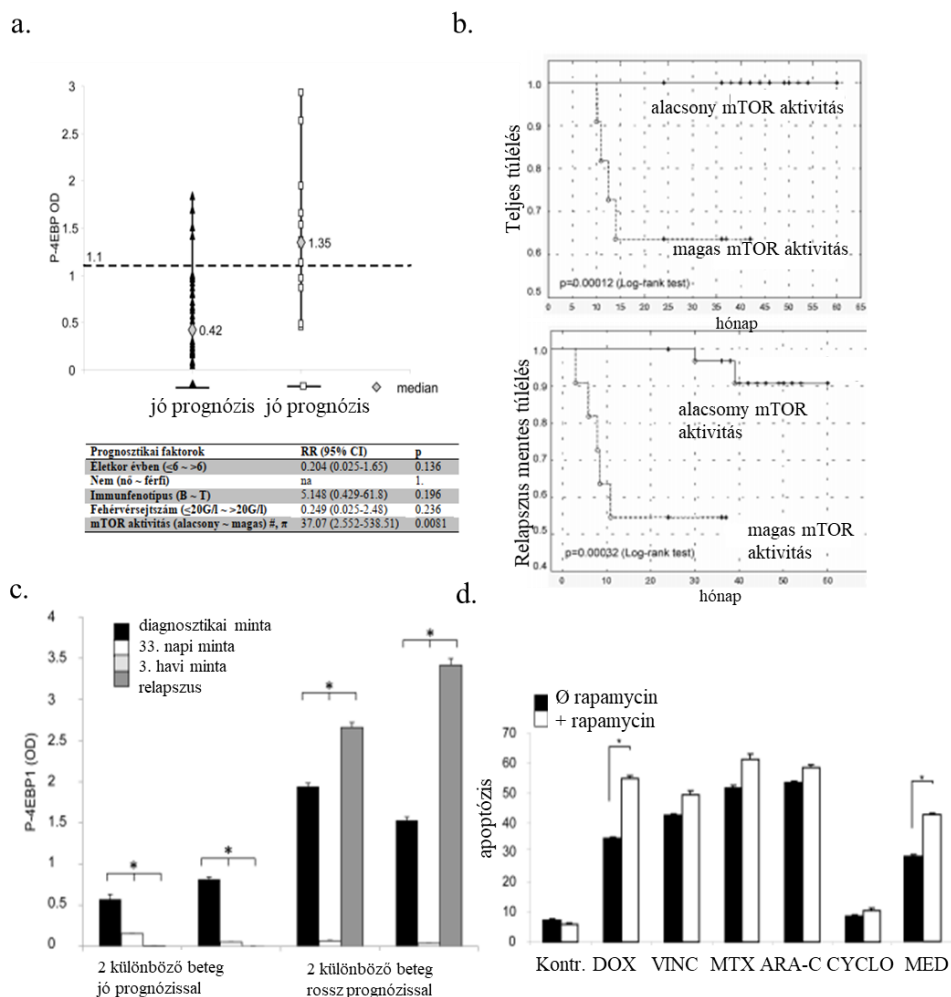
Ezt követően izolált gyermekkori ALL sejtek fokozott mTOR aktivitását vizsgálva igazoltuk, hogy a p-4EBP1 egy meghatározható cut-off értéknél magasabb expressziós értékei szignifikánsan összefüggnek a rosszabb prognózissal (11. táblázat). Egyes primer izolált ALL sejtek mTOR inhibitor érzékenységét *in vitro short-term* tenyésztéseinkben is teszteltük. Ezek egy részében az mTOR gátló jelentős apoptózist indukáló hatását figyeltük meg, míg más esetekben (ezeknél a betegeknél egyébként később recidíva alakult ki) a rapamycin ilyen hatását nem tudtuk kimutatni.

**11. Táblázat ALL-es betegek mTOR aktivitás ELISA eredményei és a klinikai adatok;** § – a p-4EBP1 ELISA OD cut-off érték (OD=1,1); # – életkor a diagnózis megállapításakor; \*\* – a hyperdiploid csoportba két beteg, *ETV6/RUNX1* fúzióval; \*\*\* – prognózis meghatározása lásd korábban a szövegben; & – a betegek állapota a vizsgálat befejezéséig. (SR – alacsony, IR – közepes, HR – magas rizikójú kezelési ág;  $\phi$  – Fisher exakt és  $\chi$  – chi2 tesztek;  $\pi$  – szignifikáns korreláció az mTOR aktivitással)

	esetszám	%	alacsony mTOR aktivitás	%	magas mTOR aktivitás	%	p
ALL betegek	49	100	38	79	11	21	
életkor #							
6 év>	29	59	23	79	6	21	0,722
6 év<	20	41	15	75	5	25	
Nem							
nő	15	31	14	93	1	7	0,137
fi	34	69	24	71	10	29	
Immunfenotípus							
pre-T	8	16	4	50	4	50	
pre-B	41	84	34	83	7	17	0,061
Szteroid válasz $\pi$							
jó (8.nap)	40	81	35	88	5	12	
rossz	9	19	3	33	6	67	<<0,05
Fehérvérszám							
20G/l>	21	43	17	81	4	19	
20G/l<	28	57	21	75	7	25	0,737

kariotípus **, π							
normál	24	49	24	71	7	29	
hiperdiploid	21	43	20	95	1	5	<0,5
rossz prognózisra utaló genetikai elt.	4	8	1	25	3	75	
prognózis ***, π							
jó	37	76	33	89	4	11	<<0,05
rossz	12	24	4	33	8	67	
jelen állapot & π							
SR	21	43	20	95	1	5	
IR	16	33	13	81	3	19	
HR	5	10	10	60	2	40	<<0,05

Az érzékenységkülönbség háttérében eredményeink szerint az mTORC1, illetve C2 komplexek egyedi aktivitás különbségei állhattak; a vizsgált rezisztens esetekben jelentős Rictor expressziót igazoltunk a háttérben. *In vitro* nemcsak rapamycin kezeléseket, hanem különböző kombinációs kezeléseket is teszteltünk. Az mTOR gátló rapamycin kezelés fokozta a kemoterápiás készítmények proliferáció gátló és apoptotikus hatásait. (42. ábra)



**42. ábra** Gyermekkori ALL-es sejtek mTOR hiperaktivitása, annak prognosztikai szerepe, és ezzel összefüggő terápiás lehetőségek. A jó és rossz prognózisú ALL-es betegek mTOR aktivitását jellemző p-4EBP1 fehérje szintek (ELISA eredmények; § – a p-4EBP1 ELISA OD cut-off érték (OD=1.1); az mTOR aktivitás érték prognosztikai jelentősége (a.); KM túlélési görbék (alacsony (n=37), illetve magas (n=12) mTOR aktivitással rendelkező esetek besorolása 1.1-es p-4EBP1 cut-off OD értéknél. (p<<0.05; Log-rank teszt) (b.); Két jó prognózisú, illetve két rossz prognózisú ALL-es mintasorozat p-4EBP1 értékei (A relatív OD értékek megadásakor

a normál PMNC sejtek expressziója 1) (c.), illetve rapamycin kombinációs kezelések apoptózis indukáló hatásai izolált leukémia sejtekben (DOX - doxorubicin, 100 nM; VCR – vincristin, 10 ng/ml, MTX - methotrexate, 20 nM; ARA-C: cytarabine, 10 ng/ml, rapamycin, 50 ng/ml; CYCLO - cyclophosphamide, 500 nM; MED - methylprednisolone, 100 nM. áramlási citometriai mérések, 72 h kezelés után \* $p < 0,05$ .) (d.).

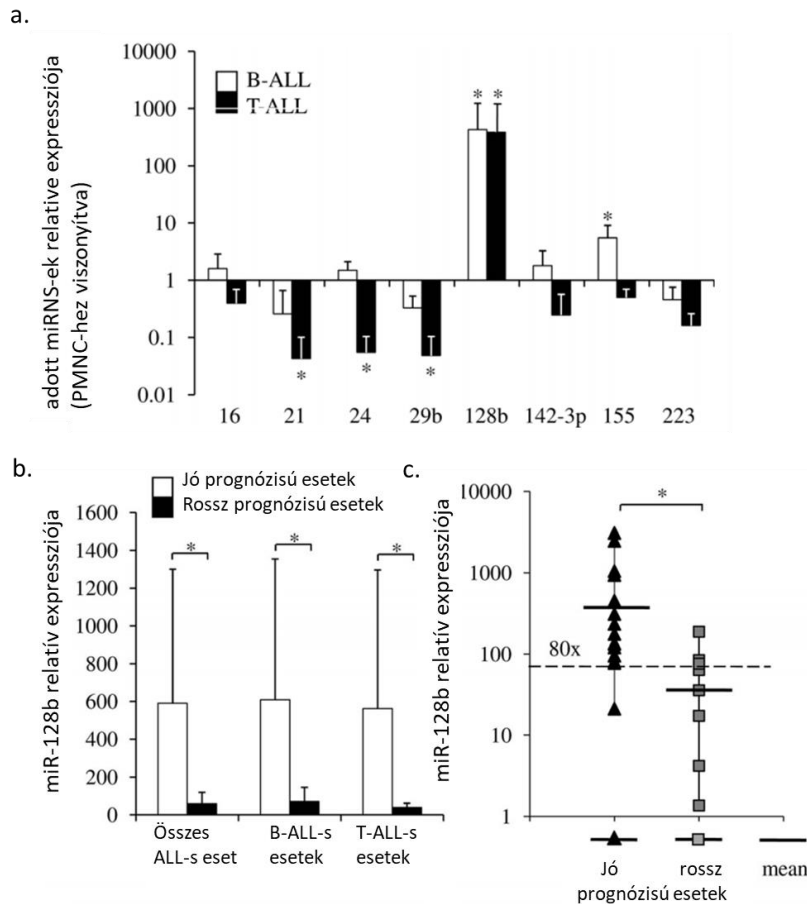
ALL-es minták esetében más lymphomákat érintő vizsgálatok alapján kiválasztott miRNS-ek expresszióját is meghatároztuk (12. Táblázat). Real-time PCR eredményeinket humán perifériás mononukleáris sejtek expressziójával vetettük össze. A vizsgált humán ALL sejtvonalakat miR-128b overexpresszió jellemezte (CEM, Jurkat és Nalm6 több mint 500x relatív expresszió fokozódás). Az „oncomiR”-ként ismert miR-21 és miR-155 közül a miR-21 expresszió egyik vizsgált leukémia sejtvonalban sem emelkedett, míg a miR-155 jelentősebb expresszióját a CEM (T-ALL) sejtvonalban mutattuk ki. T-ALL sejtvonalokban miR-16 overexpressziót, a B-ALL sejtvonalokban a miR-223 expresszió csökkenést tapasztaltunk.

Gyermekekori ALL-es betegek 24 vizsgált mintájában B- és T-ALL fenotípus függő eltéréseket figyeltünk meg. A miR-29b T- és B-ALL-ekben egyaránt csökkent [0,19x (0,001-1,05)], és a miR-21 [0,15x (0,003-0,73)] és miR-223 [0,31x (0,003-1,56)] esetében is alacsony expressziót tapasztaltunk. A miR-155 mérsékelt emelkedése pedig csak a B-ALL-es mintákat jellemezte [5,5x (0,54-11,7)]. Míg, várakozásunknak megfelelően minden esetben szignifikánsan fokozott miR-128b expressziót igazoltunk [409x (17,3-1048)]. Eredményeink esetében a miR-128b expressziós adatoknál meg tudtuk határozni egy olyan cut-off expressziós értéket, amely 75% szenzitivitással és közel 90% specifitással előre jelezte a diagnóziskori minták vizsgálata esetén a várhatóan rossz prognózisú eseteket (43. ábra).

**12. Táblázat A vizsgálatban kiválasztott miRNS-ek és a vonatkozó közlemények adatai.** Alacsony ↓ és fokozott ↑ expresszió.

Vizsgált miRNS22	Lehetséges cél molekulák	Előfordulás
miRNS 16	BCL2, TIAMI, CDK6, HIF1 $\alpha$ és ciklinD1	↓ hematológiai daganatok (337,338)
miRNS 21	PTEN, PDCD4, STAT3	↑ vastagbél-daganat (339), emlő-daganat (340), tüdő-daganat (341), petefészek-daganat (342), hematológiai malignitások (343)
miRNS 24	MAPK foszfatáz-7, JNK2, p38 kináz	↓ TCF3-PBX1 transzlokációt hordozó pre-B-ALL (344)
miRNS 29b	MCL-1, ABL1, BCR/ABL1	↓ AML, osteosarcoma, tüdő-daganat (4345-347)
miRNS 128b	EGFR, PTEN	↓ AML, MLL-AF4 (348) ↑ ALL (349), sugárérzékeny NSCLC (350)
miRNS 142-3p	cAMP, PKA, GR $\alpha$ , TAB1, MAP3K7 binding protein 2	↑ humán B-, T-ALL, AML (351-352)
miRNS 155	c-myc, PIK3RI, Smad5, SHIP1	↑ vastagbél-daganat, emlő-daganat, tüdő-daganat (353), hematológiai malignitások (DLBCL, CLL, Hodgkin-lymphoma) (337)
miRNS 223	E2F1, LMO2, MEF2C, NFIA, CEBP $\alpha$ , E2A	↓ ALL (348) ↓ AML, MALT (354-356)





**43. ábra** Gyermekkori ALL-minták miRNS expresszió vizsgálata (real-time PCR). A miRNS-ek expresszióját az izolált PMNC sejtekhez viszonyítva adtuk meg (\* $p < 0,05$ ) (a.); Jó- (n=16) és rossz (n=8) prognózisú esetek mintáinak relatív miR-128b expressziója (normál lymphoid sejtekhez viszonyítva; \* $p < 0,05$ ) (b.); miR-128b expresszió prognosztikai szerepének vizsgálatára. A cut-off értéket (80x) ROC analízissel határoztuk meg (ennek szenzitivitása 75%, specifitása 87,5%) (c.).

### IV.3. mTOR aktivitás változások és azok jelentősége bizonyos szolid daganatokban, carcinomákban

Az mTOR hipreaktivitás terápia rezisztenciában sugallt szerepét egyre több vizsgálat támasztja alá, munkacsoportunk kollaborációkban is számos daganattípus mTOR hiperaktivitásának jellemzéséhez járult hozzá a 2010-es években (pl. medulloblastomák). Ezek többségében a lymphomákban végzett vizsgálataink alapján már nemcsak az mTOR aktivitást, hanem annak mTORC1, C2 komplex megoszlását is meghatároztuk és így számos esetben az új fejlesztésekben megjelenő 2., 3. generációs mTOR inhibitorok potenciális terápiás jelentőségére sikerült felhívni a figyelmet.

Egyik ilyen első, a szolid daganatok mTOR aktivitását érintő kollaborációs vizsgálatunk a gastrointestinális stromális daganatokat (GIST) érintette. A 2010-es évekre a gastrointestinális stromális daganatok terápiájában a tirozin kináz gátlók hoztak új lehetőségeket a *KIT*, illetve *PDGFRa* mutáns esetekben. Munkánkban arra hívtuk fel a figyelmet, hogy az mTOR hiperaktivitás is potenciális target lehet ezekben a daganatokban, a nem mutáns GIST-ek több mint 70%-ában megjelent az mTOR hiperaktivitás, ami mutációtól független terápiás lehetőségekre hívta fel a figyelmet.

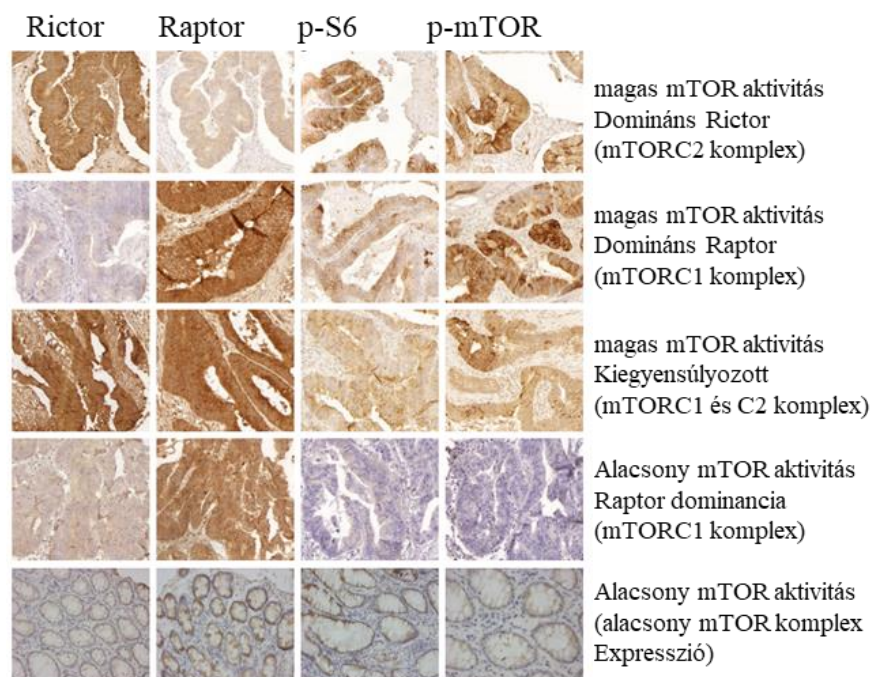
Saját munkacsoportunkban a humán coloncarcinomák és a primer és agyi metasztázist adó tüdő adenocarcinomák, illetve egyéb, ritka tüdő malignitások mTOR hiperaktivitását, emlő carcinomák, rhabdomyosarcomák mTORC1 és C2 komplex protein expressziós profilját és ezek prognosztikai jelentőségét is vizsgáltuk.

### IV.3.1 Humán coloncarcinoma esetek mTORC1 és C2 komplex-függő mTOR hiperaktivitása és ennek prognosztikai jelentősége

Vizsgálataink megkezdésekor a coloncarcinomák kezelésében a célzott anti-VEGF terápia (bevacizumab, aflibercept) vagy az anti-EGFR-terápia (cetuximab, panitumumab) még általában oxaliplatin-alapú kombinációkra korlátozódott (357), bár a PI3K/AKT/mTOR útvonal szabályozási zavara nem volt ismeretlen, ebben a daganattípusban. Felmerült az érintett útvonalak kombinált célzása, köztük az mTOR kináz gátlása everolimus-szal (RAD001) a klinikai eredmények javítása érdekében, de csak minimális terápiai előnyöket értek el. Azt hangsúlyozták, hogy az mTOR gátló monoterápia nem elég hatékony (358) és az érdeklődés a duál mTOR inhibitorok felé irányult ebben az időben (359). Meglepő volt azonban, hogy az mTORC1 és C2 komplex aktivitások részletes *in situ* humán szövettani vizsgálata ennek ellenére sem történt meg. Ennek köszönhető, hogy munkánk hiánypótlónak számított a témában.

103 biopsziás minta TMA metszetein részletes mTOR aktivitás elemzést végeztünk mTOR, p-mTOR, p-S6, p-4EBP1, p-AMPK, Rictor és Raptor immunhisztokémiai reakciók és a klinikai adatok értékelésével. A 4EBP-1 és a p70S6K ismert mTOR kináz, mTORC1 komplex targetek, de ezek foszfoproteinjei mellett immunhisztokémiai szempontból megbízhatóbb a p70S6K target, riboszómális S6 fehérje foszforilált forma megjelenésének vizsgálata (p-S6). Így a p-S6, p-4EBP1 és a p-mTOR panel immunhisztokémiai értékeit minden esetben együttesen értékeltük. Az esetek 73,8%-ában magas mTOR (++) vagy (+++) pozitívitás) aktivitást mutattunk ki. Az alacsony mTOR aktivitású esetekben (27/103 eset; 26,2%), az egymással jó korrelációt mutató p-S6 és a p-mTOR immunreakciók negatív vagy maximum + pozitív értékelést kaptak. 76 esetben azonban intenzív p-mTOR expressziót mutattunk ki. Az AMPK ismert, az mTOR aktivitást negatívan befolyásoló szerepe is igazolódott eseteinkben; míg alacsony mTOR aktivitás mellett minden esetben p-AMPK pozitívítást (aktív forma), addig magas mTOR aktivitáskor p-AMPK pozitívítást csak egyetlen esetben tapasztaltunk. Előbbiek mellett a két komplexben karakterisztikus vázfehérje a Raptor-mTORC1 és Rictor-mTORC2 IHC vizsgálatát is értékeltük. Ezek alapján az eseteket 3 csoportba osztottuk: a. Rictor domináns expressziójú – a Raptor fehérje alig volt kimutatható és intenzív Rictor festést tapasztaltunk (n=51); b. Raptor domináns expressziójú – a Rictor nem vagy alacsony expressziót mutatott és jellegzetes Raptor festődést detektáltunk (n=14); c. kiegyensúlyozott Rictor és Raptor expressziójú – hasonló intenzitású Rictor és Raptor IHC reakciók (n=38). Két esetben, ahol magas p-mTOR expresszió mellett az mTORC1 aktivitás markereinek pozitívítást nem tudtuk kimutatni (alacsony p-S6 és p-4EBP1 hiánya), mTORC2 komplexre jellemző Rictor dominancia volt megfigyelhető. Összefoglalva a magas mTOR aktivitású 76 esetből 39 Rictor dominánsnak (mTORC2), 8 Raptor dominánsnak (mTORC1), míg 29 eset kiegyensúlyozott mTORC1 és C2 komplex mennyiségűnek bizonyult (44. ábra).

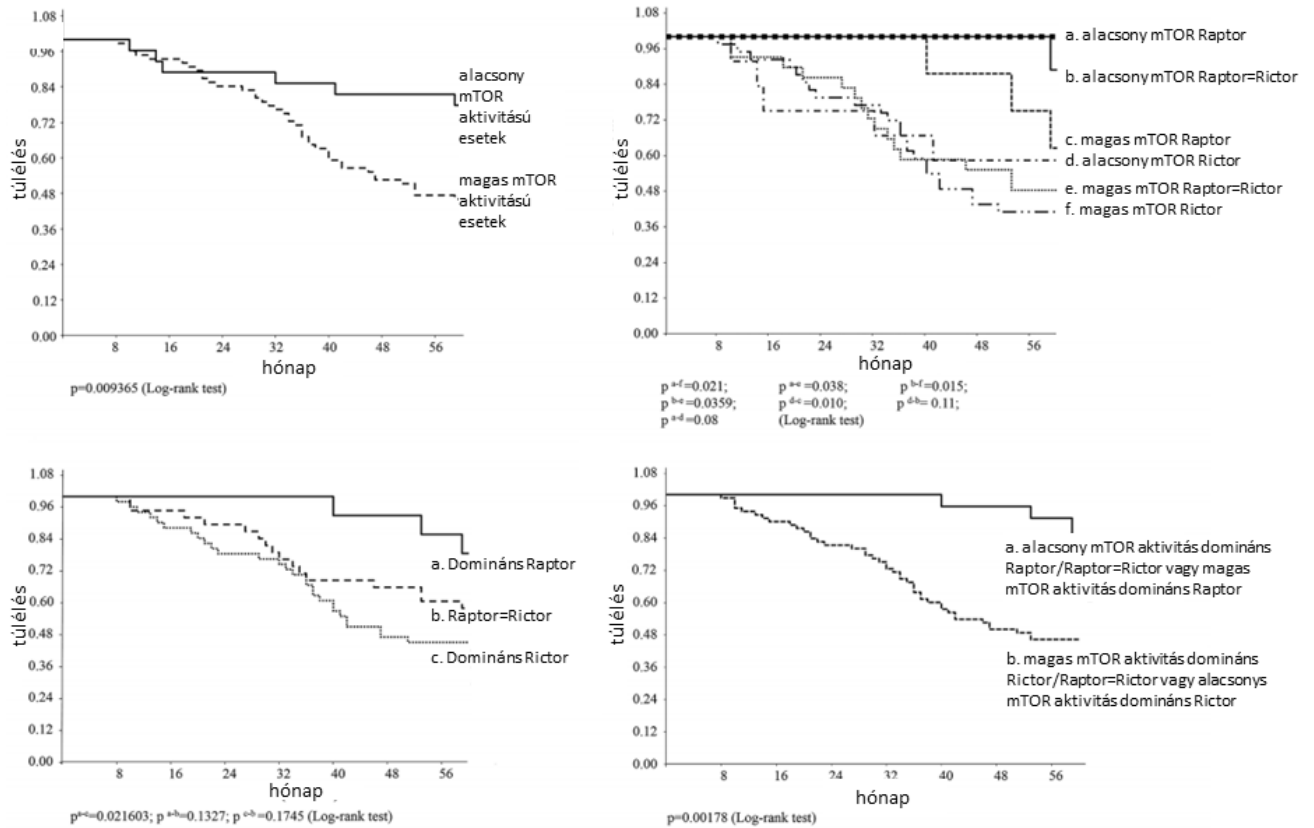
Statisztikai módszerekkel az mTOR aktivitás és a két komplex mennyiségi különbségeit összehasonlítottuk a betegek klinikai jellemzőivel. A betegek neme, életkora, a daganatok Dukés stádiuma és az mTOR aktivitás között szignifikáns összefüggéseket nem tudtunk kimutatni. Az alacsony mTOR aktivitású betegek csoportjában az 5 éves túlélés 77,8% (overall survival = OVS), míg a magas mTOR aktivitásúak esetében ez szignifikánsan rosszabb, 46,1% volt. A legjobb kezelési, túlélési eredményeket azokban az esetekben tapasztaltuk, ahol alacsony mTOR aktivitás mellett domináns Raptor expresszió, alacsony mTORC1 aktivitás volt megfigyelhető, minden beteg a diagnózis után a kezelést követően legalább 5 évet élt.



**44. ábra Humán coloncarcinoma esetek mTOR aktivitás különbségei *in situ*.** Az immunhisztokémiai festések különbségeit bemutató reprezentatív fotók (immunfestések Rictor, Raptor p-S6 és p-mTOR ellenanyagokkal, DAB-barna színreakció, hematoxilin háttérfestés-kék, nagyítás 20x), illetve az értékelés és összefüggései a betegek túlélésével. (overall survival - OVS)

	Teljes esetszám	mTOR magas aktivitás	mTOR alacsony aktivitás
<b>Összes esetszám</b>	103 (100%)	76 (73.8%)	27 (26.2%)
<b>OVS &gt;5 év</b>	56 (54.4%)	35 (46.1%)	21 (77.8%)
<b>Rictor domináns expresszió</b>	51 (49.5%)	39 (76.5%)	12 (23.5%)
<b>OVS &gt;5 év</b>	23 (45.1%)	16 (41.0%)	7 (58.3%)
<b>Raptor domináns expresszió</b>	14 (13.6%)	8 (57.1%)	6 (42.9%)
<b>OVS &gt;5 év</b>	11 (78.6%)	5 (62.5%)	6 (100%)
<b>Nincs dominancia</b>	38 (36.9%)	29 (76.3%)	9 (23.7%)
<b>OVS &gt;5 év</b>	22 (57.9%)	14 (48.3%)	8 (88.9%)

A két rosszabb prognózisú csoportban – magas mTOR aktivitás + Rictor domináns expresszió, illetve magas mTOR aktivitás mellett komplex dominanciát nem mutató esetek – egymáshoz képest számottevő különbséget az 5 éves túlélési adatokban (5 éves OVS 41%, 48,3%) nem tudunk kimutatni. A legrosszabb túlélési adatokat magas mTOR aktivitás mellett Rictort is nagy mennyiségben expresszáló eseteknél tapasztaltunk. Megvizsgáltuk a túlélési adatokat csak az mTOR komplexek mennyiségének függvényében is; a Rictor expresszió az mTOR aktivitástól függetlenül is összefüggést mutatott a betegség rossz prognózisával. A legprogresszívebb, legrövidebb túlélést mutató eseteket a tumorszövetben jellemző magas mTOR aktivitás és a kapcsolt magas Rictor expresszió jellemezte a Kaplan Meier görbék szerint. Cox regressziós analízis igazolta, hogy a magas mTOR aktivitás, a domináns Rictor expresszió független és a Dukes stádium meghatározáshoz képest erősebb rizikó faktor, mindkettő jelezheti a rossz prognózist. A magas mTOR aktivitás vagy Rictor expresszió más faktoroktól függetlenül emelte a rövidebb túlélés relatív kockázatát (magas mTOR aktivitás RR 2,62 (1,2-5,95) p=0,02; magas Rictor expresszió RR 2,518 (0,89-7,094) p=0,081) (45. ábra).



COX REGRESSZIÓS ANALÍZIS EREDMÉNYE		
	HR (95% CI) p	HR <sup>a</sup> (95% CI) p
magas mTOR aktivitás	2.952 (1.329 to 6.558) 0.008	2.577 (1.145 to 5.803) 0.022
magas Rictor expresszió	2.621 (0.994 to 7.274) 0.064	2.597 (0.923 to 7.311) 0.071
Dukes' stádium	2.132 (1.118 to 4.069) 0.022	2.153 (1.125 to 4.118) 0.021
kor	0.996 (0.965 to 1.028) 0.796	1.007 (0.974 to 1.041) 0.701
nem	1.517 (0.872 to 2.641) 0.14	1.446 (0.823 to 2.541) 0.2

Dukes' stádium (B1 és C1-C2-D). Magas Rictor expresszió, ha Rictor≥Raptor)  
HR<sup>a</sup> minden más faktorralegyütt értékelt HR

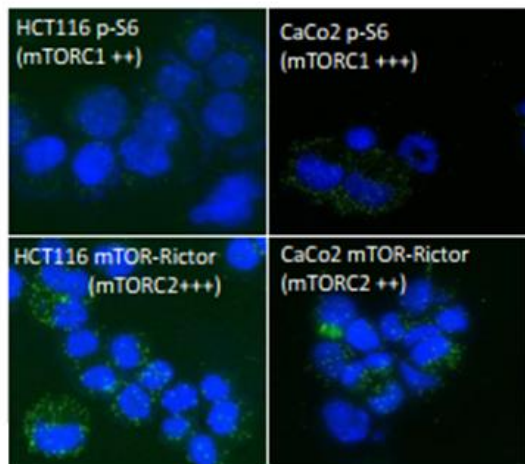
**45. ábra. Különböző mTOR aktivitású colon carcinomás betegcsoport túlélési adatainak elemzése Kaplan-Meier görbékkel, illetve COX regresszió analízissel (relatív kockázat számítások eredményei)**

A bemutatott *in situ* mTOR aktivitás különbségeknek jelentőségét *in vitro* rapalógok illetve második generációs mTOR gátlók és EGFR inhibitor kombinált kezelése EGFR inhibitor érzékenyítő hatásaival igazoltuk colonicarcinoma sejtvonalakban. Kísérleteinkben a gefitinib és a cetuximab nem gátolta a proliferációt, illetve nem indukált apoptózist csak nagyon magas dózisú kezeléseknél (72 h). Western blot és Duolink immunfestés eredményeink a sejtvonalakban a biopsziás minták eredményeihez hasonló magas mTOR aktivitást igazoltak. Az egyedi expressziókülönbségek összefüggést mutattak a 72 órás rapamycin kezelés és az mTORC1 és C2 komplexet is gátló PP242, valamint a duál mTOR inhibitor (NVP-BEZ235) kezelése hatásával. A Rictort nagy mennyiségben termelő sejtek (GC3, HCT116 és HT29) kevésbé érzékenyek a rapamycin kezelésre, míg az mTORC2 aktivitást nem mutató sejtek (alacsony Rictor expresszió) az mTORC1 és C2 komplexet is gátló, dual inhibitor kezeléseknél szemben is hasonló érzékenységgel rendelkeznek (46. ábra).

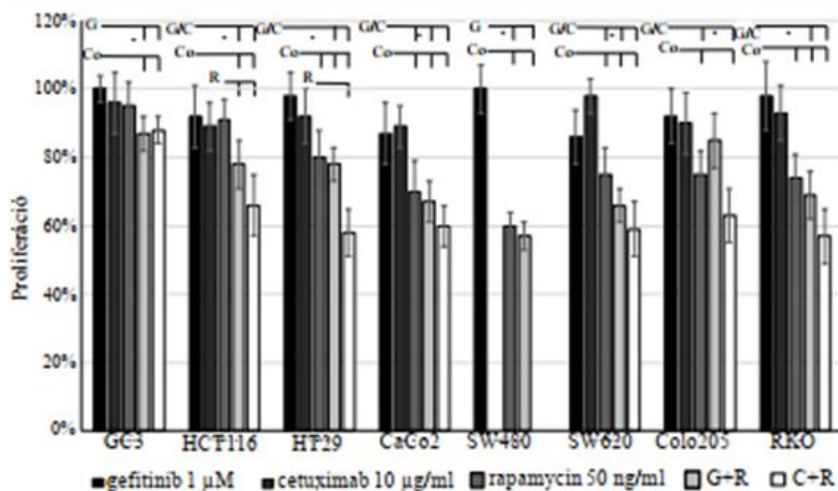
a.

	ICC	SW620	HT29	RKO	SW480	GC3	Colo205	HCT116	CaCo2
p-S6	++	+++	++	+	++	++	++	++	+++
Rictor	++	+++	++	+	+++	+	+++	+++	+++
Raptor	+	++	+	+	++/+++	+	++	++	++

(+ alacsony; ++ közepes; +++ magas expresszió, 2 patológus független értékelése alapján)



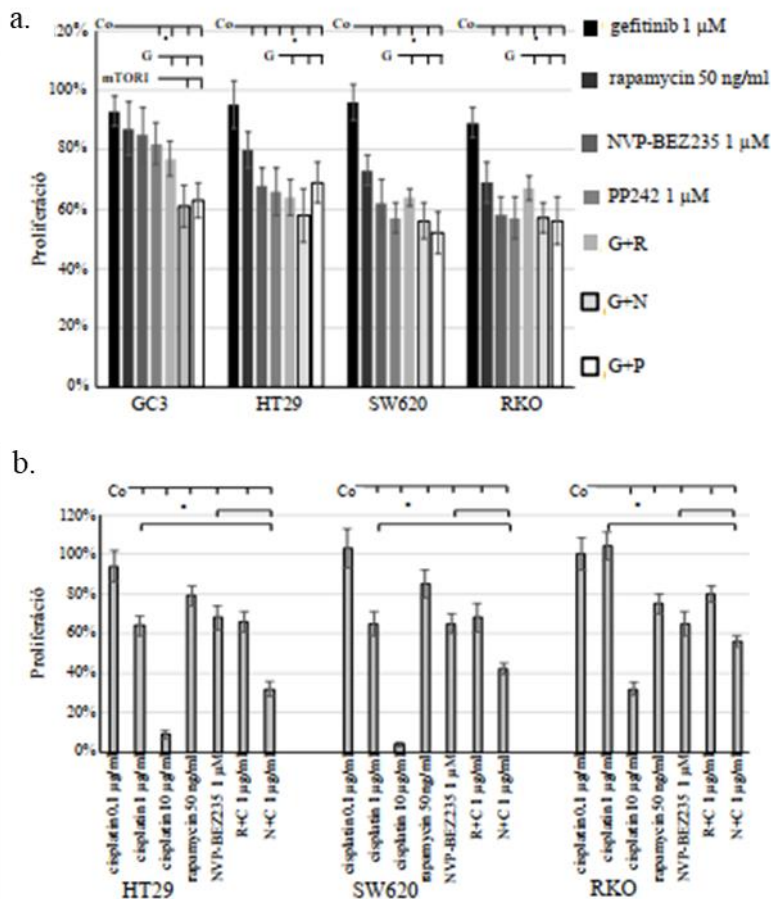
b.



#### 46. ábra Humán coloncarcinoma sejtvonalak mTOR aktivitásának jellegzetességei, illetve EGFR és mTOR inhibitor érzékenyséjük.

A sejtvonalakat általánosan magas mTOR aktivitás és egy részükben igen jelentős mTORC2 komplex expresszió jellemzi (pl. a HCT116 és CaCo2 sejtek Duolink festéseiben mindkét sejtvonalban intenzív immunreakció figyelhető meg az mTOR és Rictor Duolink – mTORC2 festésben – zöld reakció) (a.); Gefitinib- és cetuximab-rezisztencia a különböző coloncarcinoma sejtekben, illetve a rapamycin kezelés érzékenyítő hatása is megfigyelhető a sejtvonalak többségében (b.) (\*  $p < 0,05$ ).

Előbbieknek megfelelően az mTOR gátló rapamycin, illetve NVP-BEZ235 és az EGFR inhibitor érzékenyítő hatást tudtunk igazolni szinte valamennyi rezisztens sejtvonal esetében. A ciszplatin + mTOR gátló kombinációk hatásait is igazoltuk *in vitro* három, eltérő rapalóg érzékenységgű coloncarcinoma sejtvonalban (47. ábra). Utóbbi klinikai jelentőségére azóta számos példát ismerünk nemcsak coloncarcinómák, de egyes más adenocarcinómák, így tüdődaganatok esetében is.



**47. ábra mTOR inhibitorok EGFR inhibitor és ciszplatin érzékenyítő hatásai colon carcinoma sejtvonalakban *in vitro*.** Kiemelkedően magas mTORC2 komplex aktivitással rendelkező humán coloncarcinoma sejtvonalak esetében a rapamycin kevésbé, de a dual inhibitor kezelések szignifikánsan fokozták a gefitinib hatásait *in vitro* tenyésztéseinkben (a.), Előbbiek mellett a ciszplatin érzékenyítő hatásokat is jellemeztük három, eltérő ciszplatin érzékenységű sejtvonal esetében. Ezek az eredmények jól mutatják, hogy az alacsonyabb dózisu ciszplatin kezelés is hatásossá tehető kombinált kezeléseknél (b.)

### IV.3.2 Bizonyos tüdődaganatok mTOR aktivitásának vizsgálata

A jelátviteli hálózat, a PI3K/Akt/mTOR útvonal szabályozási zavarai a tüdődaganatok kialakulásában és progressziójában is fontos szerepet játszanak (178, 360). Az útvonal aktivitás zavara többféle mechanizmuson keresztül is megvalósulhat; *PIK3CA*, *PTEN*, *TSC1/2*, *STK11*, *AKT*, *RICTOR* és *mTOR* kináz, illetve egyéb onkogének, tumorszuppresszorok mutációi is ismertek (179, 361). Előbbiekén túl az mTOR aktivitást a jelátviteli hálózat mTOR jelpályával kapcsolódó útvonalainak zavarai is befolyásolhatják. Az *EGFR* konstitutív aktiváció vagy a *KRAS* mutáció gyakori eltérések a tüdőcarcinomákban (pl. NSCLC-k 25%) (362, 363). Ezekkel összefüggésben az mTOR aktiváció gátlása további terápiás lehetőséget nyújthat a tüdődaganatok kezelésében.

Nem-kissejtes tüdődaganatok (NSCLC) között az adenocarcinomák 90%-a, a laphámrákok 40%-a és a nagysejtes carcinomák 60%-a PI3K/Akt/mTOR jelátvitel hiperaktivitással jellemezhető (364), ennek jelentőségét írták le invazitásukkal, metasztázis képzésükkel és rossz prognózisukkal összefüggésben (365, 366). *PIK3CA* aktiváló mutációt a NSCLC-k 4-7%-ában, amplifikációt a laphámrákok 33%-ában, az adenocarcinomák 1%-ában mutattak ki. Az előbbiek mellett *RICTOR* amplifikációt a NSCLC-k 10%-ában, illetve ezeken túl *PTEN* (laphámrákokban gyakoribb) és *STK11* (adenocarcinomák) mutációkat is leírtak (367-369). A neuroendokrin tüdődaganatok között a kissejtes tüdődaganatok az összes tüdődaganat 15-20%-át adják (370). A *TP53*, *RB1* mutációk és *MYC* amplifikáció mellett a PI3K/Akt/mTOR útvonal

elemeinek (pl. *PIK3CA*, *PTEN*, *AKT2*, *AKT3*, *mTOR* és *RICTOR*) genetikai zavarai gyakran jelennek meg SCLC-kben, ezek között a *RICTOR* amplifikáció mutatható ki leggyakrabban (6-14%) (371,372).

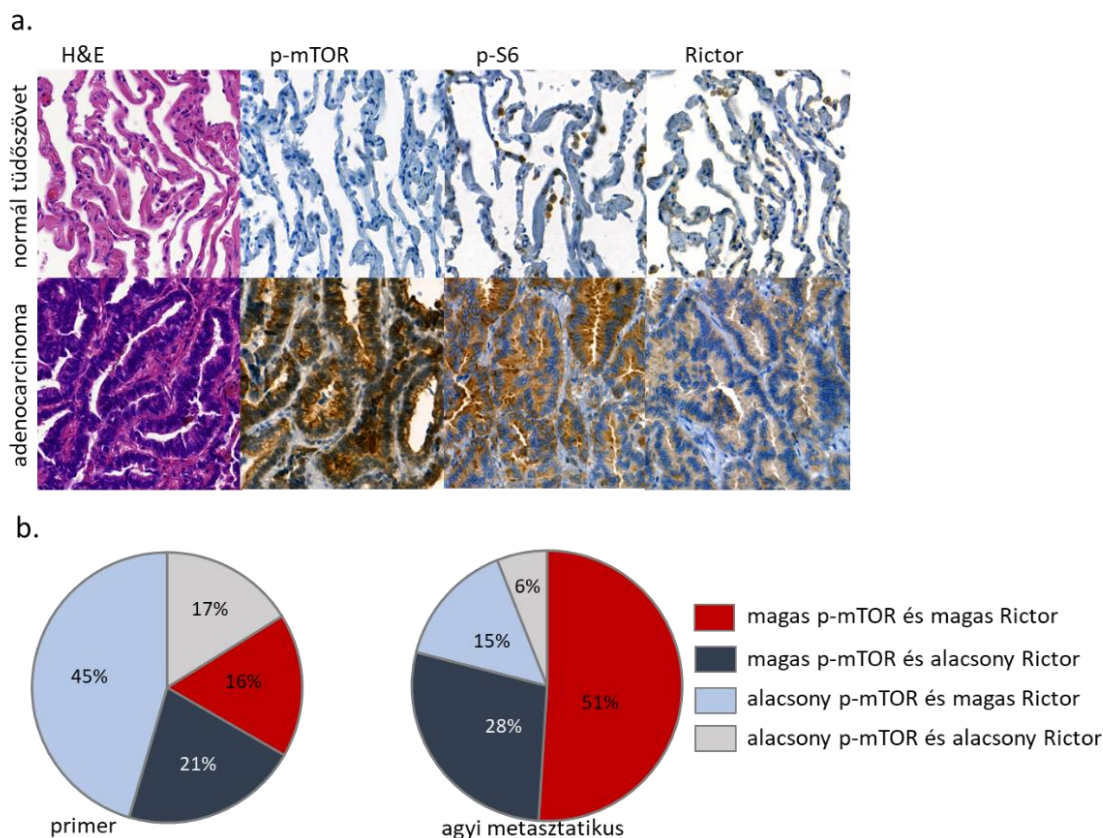
A ritka tüdődaganatok egyik formája a lymphangiioleiomyomatosis (LAM), kialakulásában a *TSC1/2* gének funkcióvesztő mutációjának van szerepe. Terápiásan igazolható, hogy mTOR aktivitás gátló rapalóg készítményekkel lassítható előbbi malignus folyamat miatt bekövetkező tüdőszövet károsodás, de ebben az mTORC2 komplex-függő aktivitások még nem voltak jellemezve vizsgálataink kezdetén (373-375).

Tüdődaganatok jellemzésével kapcsolatos munkáinkban az újgenerációs mTOR gátlók klinikai alkalmazását segítve az mTOR aktivitást, mTOR komplexek mennyiségi változását jellemeztük, míg LAM esetében kapcsolódó metabolikus vizsgálataink segítségével kiegészítettük ezeket az eredményeinket metabolikus jellemzéssel is, annak érdekében, hogy új terápiás targetek azonosítására kerülhessen sor ebben a ritka betegségben.

#### ***IV.3.2.1. Az mTORC1/2 komplex fehérjék mennyisége primer és agyi áttétet adó tüdő adenocarcinómákban in situ***

Primer tüdő adenocarcinómákban (n=67) és tüdő adenocarcinómák agyi áttéteiben (n=67) az mTORC1 és az mTORC2 komplexek mennyiségével és potenciális aktivitásával összefüggésben a p-mTOR, a p-S6 és a Rictor fehérjék mennyiségét vizsgáltuk *in situ*.

A tüdődaganatok melletti ép szövetben mindhárom vizsgált marker festődésének intenzitása alacsony volt, míg a daganatsejtekben a p-mTOR, a p-S6 és a Rictor intenzív citoplazmatikus reakciója volt jellemző. A sejtmagokban egyetlen esetben sem mutattunk ki Rictor vagy p-S6 expressziót. Emelkedett p-mTOR, p-S6 és Rictor fehérje mennyiséget a primer adenocarcinómák 33, 34%-ában és 37%-ában, illetve az agyi áttétek 79, 70%-ában és 66%-ában figyeltünk meg. A legtöbb esetben mindhárom marker intenzívebb pozitivitást mutatott az agyi metasztázisokban, mint a primer daganatokban, a H-score értékek szignifikánsan magasabbak voltak. Az mTOR aktivitás és a p-S6 fehérje mennyiségének szoros összefüggését jól mutatta, hogy az alacsony p-mTOR expresszió és alacsony p-S6 expresszió, illetve a magas p-mTOR expresszió a magas p-S6 expresszió együttes előfordulása az esetek 72%-ában jellemző volt (96/134 eset). Magas p-mTOR H-score értékekhez egyes esetekben alacsony p-S6 expresszió párosult, ezek nagy százalékában pedig magas Rictor expressziót igazoltunk. Ez utalhat arra, hogy az mTOR aktivitás ezekben az esetekben mTORC2 komplexben jelenik meg. Ez a mintázat (magas p-mTOR és magas Rictor H-score) a primer tüdő adenocarcinómák 16%-át, míg az agyi metasztázisok 51%-át jellemezte (48. ábra). Ezeknek az eredményeknek szignifikáns összefüggését egyéb klinikai adatokkal a primer, és az áttéti daganatokban nem tudtuk igazolni. Trend-jellegű összefüggéseket találtunk primer adenocarcinómákban a magasabb stádium és a Rictor expresszió között (p=0,067), illetve szoliter agyi áttétek esetében a magas Rictor és alacsonyabb p-S6 jellegzetesebbnek bizonyult, mint multiplex agyi áttétekben (Rictor magas H-score 70% vs. 33%, p=0,061, p-S6 magas H-score 65% vs. 92%, p=0,178).



**48. ábra** Tüdő adenocarcinómák és agyi metasztázisaik magas mTORC1 és C2 aktivitása. A reprezentatív immunfestések jól mutatják a normál szöveti sejtekhez képest emelkedett mTOR aktivitást (a.), míg a primer és áttéti adenocarcinómák mTOR aktivitás alapján meghatározható eltérő aktivitású csoportok felhívják a figyelmet az agyi metasztatikus daganatok nagyszámban jellemző emelkedett mTORC2 (magas p-mTOR és Rictor) aktivitására (b.).

15 esetben (6 férfi és 9 nő) ugyanazon beteg primer tumor és agyi áttét szöveti mintapárjait is összehasonlíthattuk (az agyi metasztázis  $25,8 \pm 19,3$  hónappal követte a primer daganatok kimutatását ezekben az esetekben). 9 betegben a p-mTOR és a p-S6, míg 6 esetben a Rictor H-score a primer daganatokhoz képest megváltozott az áttétekben. Elsősorban mTORC1 aktivitás fokozódását tapasztaltuk, a Rictor expresszió a primer daganatok többségében (10/15 eset – 67%) már eleve magas volt, míg ez más primer tüdő adenocarcinómák esetében kevésbé volt jellemző.

#### ***IV.3.2.2. Az mTORC2 aktivitás marker H-score értékelés és a Rictor amplifikáció összefüggésének vizsgálata kissejtes tüdődaganatokban***

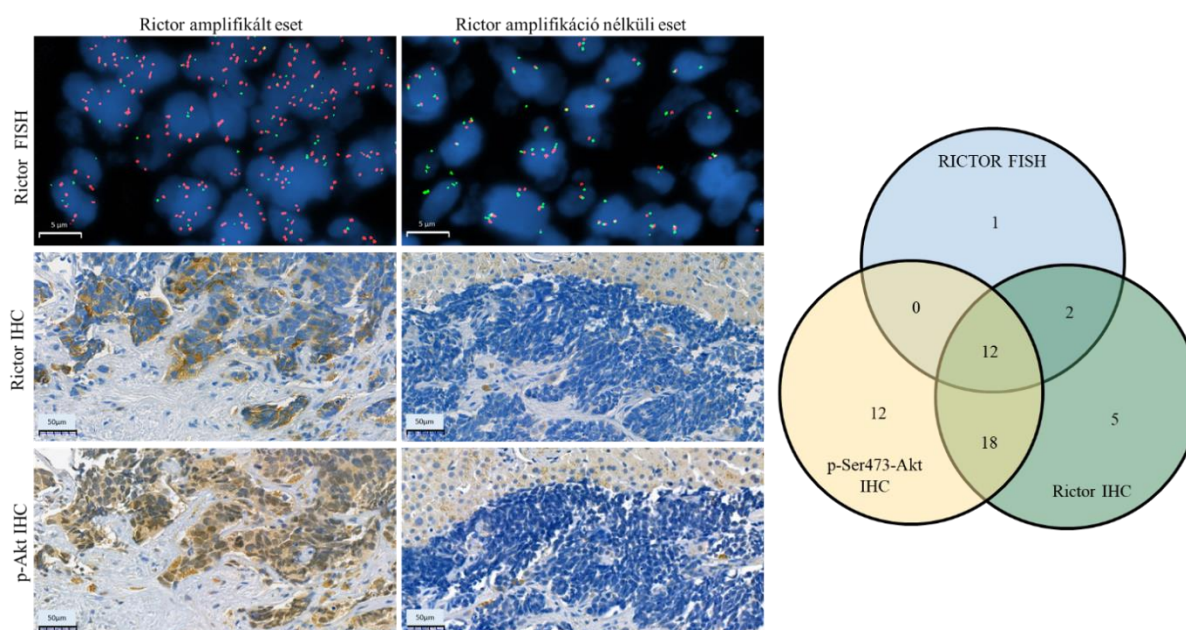
92 kissejtes tüdődaganatos (SCLC) beteg 100 mintájának elemzését végezhattük el a tüdődaganatok érintő kollaborációs munkánkban a Mayo Klinikával. FISH vizsgálattal a mintákban Rictor amplifikációt 15 esetben (15%) állapítottunk meg, 3 (3%) bizonytalan és 82 (82%) amplifikáció negatív eset volt.

Ugyanezekben a mintákban IHC-val a Rictor (az mTORC2 vázfehérjéje) és a p-Ser473-Akt (az mTORC2 aktivitását specifikusan jelző target fehérje) mennyiségét, a PD-L1 értékeléshez hasonlóan %-os pozitivitás alapján elemeztük. A Rictor festések 14 esetben magas, 23 esetben közepes, 25 esetben alacsony Rictor expressziót mutattak, 38 eset pedig negatívnak



bizonyult. A p-Ser473-Akt kimutatható mennyisége 16 esetben magas, 26 esetben közepes, 35 esetben alacsony volt, 23 esetben nem tudtuk kimutatni a jelenlétét a tumorsejtekben. A szenzitivitás és specificitás statisztikai elemzésében a magas és közepes expressziót pozitívnak, az alacsony vagy negatív értékelést negatívnak tekintettük. A Rictor és p-Ser473-Akt festődési értékek között erős pozitív korrelációt mutattunk ki ( $\rho=0,466$ ;  $p<0,001$ ). Rictor-FISH kópiaszám vizsgálatunkkal pozitív korreláció mutatható ki a Rictor ( $\rho=0,416$ ;  $p<0,001$ ) és a p-Ser473-Akt ( $\rho=0,289$ ;  $p<0,01$ ) pozitívítás értékek és az amplifikáció között. A Rictor amplifikációt mutató 15 esetből 14 Rictor pozitív értékelést kapott (5 magas, 9 közepes Rictor expressziós értékkel) és 12 eset mutatott p-Ser473-Akt immunpozitivitást is (5 magas, 7 közepes expresszió). Egyetlen Rictor amplifikációt mutató eset volt, amelyben sem Rictor, sem a p-Ser473-Akt IHC festés nem jelezte az mTORC2 komplex mennyiségének, illetve aktivitásának emelkedését. A 85 Rictor amplifikációt nem mutató – negatív vagy bizonytalan – esetben 23, illetve 30 eset volt Rictor és p-Akt IHC pozitív. Ezek alapján a Rictor FISH-t gold standard eljárásnak tekintve a Rictor IHC szenzitivitása 93%, specificitása 73%; a p-Ser473-Akt IHC szenzitivitása 80%, specificitása 65% a Rictor amplifikáció kimutatásában.

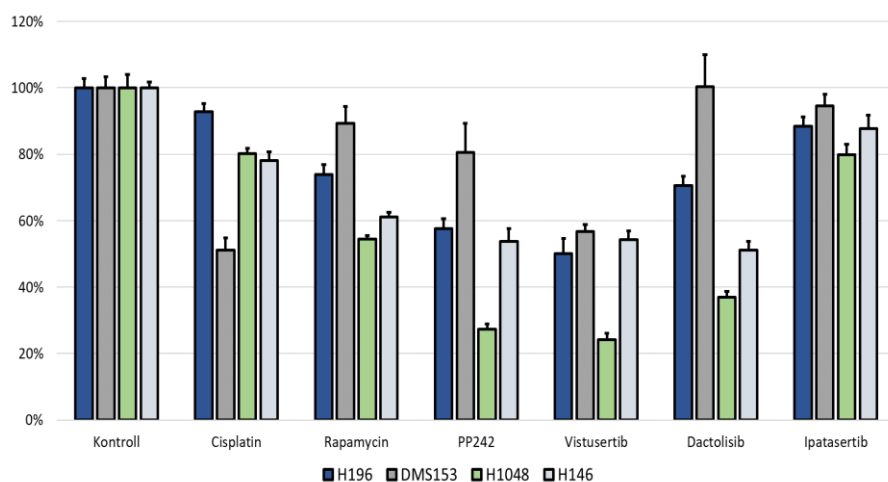
A Rictor amplifikáció megléte vagy hiánya nem mutatott összefüggést a betegek túlélési adataival, a teljes túléléssel. A Rictor (log-rank  $p=0,007$ ), és a p-Akt (log-rank  $p<0,001$ ) fehérjék *in situ* értékelésének eredményei, ezek fokozott mennyisége a szövetekben viszont szignifikánsan rövidebb teljes túléléssel társult. (49. ábra)



**49. ábra Rictor amplifikáció és a Rictor, illetve p-Ser473-Akt immunfestések összefüggése.** Reprezentatív Rictor amplifikációs képek, illetve immunfestések (Rictor és p-Ser473-Akt) egy Rictor amplifikált és egy amplifikáció nélküli esetben, a festések szemléltetik genetikai változások fehérje expressziós következményeit. A jobb oldali diagram elemzéseink adatait mutatja, alátámasztja, hogy a két immunfestés a FISH vizsgálat előszűrésére alkalmas.

A kapott eredmények, a Rictor amplifikáció jelentőségét *in vitro* vizsgálatainkban mTOR inhibitorok *in vitro* hatásainak elemzésével is megerősítettük. RICTOR amplifikáció negatív és pozitív humán SCLC sejtvonalak eltérő cisplatin érzékenységűnek bizonyultak: a Rictor-mutáns DMS153 sejtvonal cisplatin érzékeny (~50%-os csökkentés,  $p<0,05$ ), míg a Rictor amplifikált H196 sejtvonal cisplatin rezisztens volt. A rapamycin a H196 sejtekben ~25%, a

H1048 és H146 (Rictor vad) sejtvonalakban 40-50% proliferáció gátlást okozott, a DMS153 sejtvonala pedig rapamycin rezisztensnek bizonyult. Az mTORC1 és C2 gátló PP242 a H196, H1048 és H146 sejtvonalakban szignifikánsan jobban csökkentette a proliferációt, a DMS153 sejtvonala pedig 20% növekedésgátlást mutatott. A vistusertib (mTORC1 és C2 gátló szintén) legalább 40%-kal csökkentette a proliferációt az összes vizsgált sejtvonalaiban, ami alátámasztja a vistusertib potenciális terápiás jelentőségét (50. ábra).



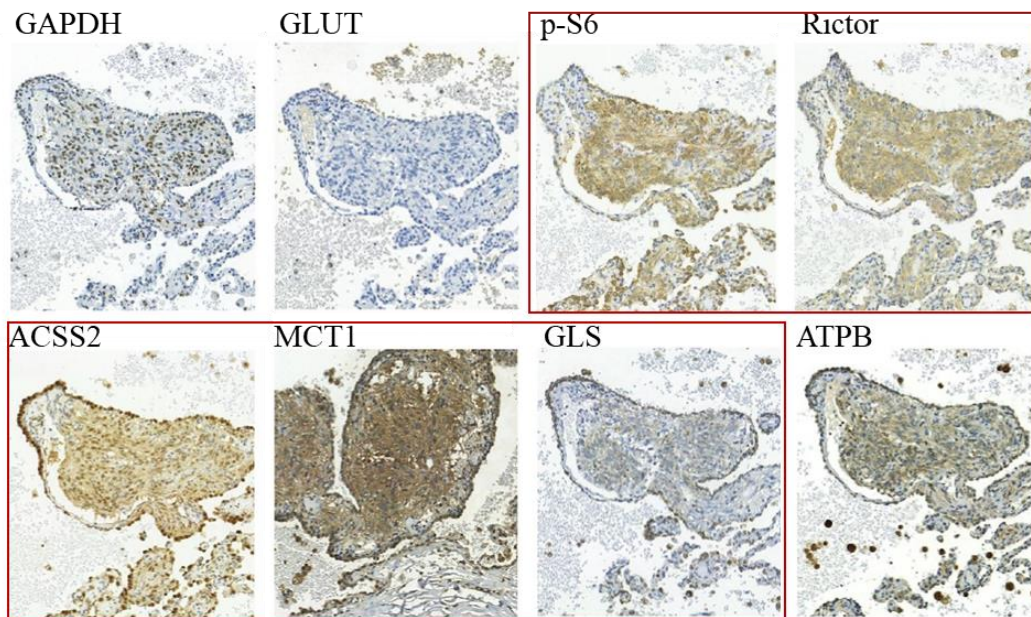
**50. ábra** Különböző mTOR inhibitorok proliferáció gátló hatásai eltérő cisplatin érzékenyséű humán tüdőcarcinoma sejtvonalaiban. 72 h-ás kezelések proliferáció gátló hatásait SRB proliferációs tesztekkel mutattuk ki (rapamycin 50 ng/ml, cisplatin 10 µg/ml PP242, dactolisib, vistusertib, ipatasertib 1 µM)

#### ***IV.3.2.3. Az mTORC1 és C2 komplexek in situ vizsgálata humán lymphangiomiomatosisban***

Az mTORC1 aktivitás terápiás jelentősége vizsgálataink kezdetén ismert volt lymphangiomiomatosisban (LAM), azonban az mTORC2 komplexek mennyiségét és aktivitását még nem jellemezték korábban a LAM patobiológiájában. A LAM rendkívül ritka tüdő malignitás, 11 esetet sikerült a Mayo Klinika segítségével vizsgálatainkba bevonni. 10-ben magas p-S6 fehérje mennyiségeket tapasztaltunk a LAM sejtekben, ami a fokozott mTORC1 aktivitást igazolja. A kontrollnak tekinthető bronchiális simaizomsejtekben (BSM) alacsony p-S6 és a Rictor expressziót vagy azok hiányát tapasztaltuk. Az mTORC2 komplex vázfehérjének, a Rictornak, szintén nagy mennyiségét tuduk kimutatni az esetek jelentős részében, 6 esetben, ami az mTORC2 komplex potenciális aktivitásának szerepére hívja fel a figyelmet. Csupán egy olyan esetet találunk, amiben sem a p-S6, sem a Rictor expressziója nem mutatott nagy mennyiséget. Az esetek több mint felében kimutatott magas Rictor expresszió, emelkedett mTORC2 aktivitásra enged következtetni, ami adott esetekben magyarázhatja a rapalógok hatástalanságát is. Mindezek alapján mTORC2 hiperaktivitás igazolása esetében javasolható más mTORC1/C2 gátlók vagy duál mTOR inhibitorok alkalmazása ebben a ritka malignitásban.

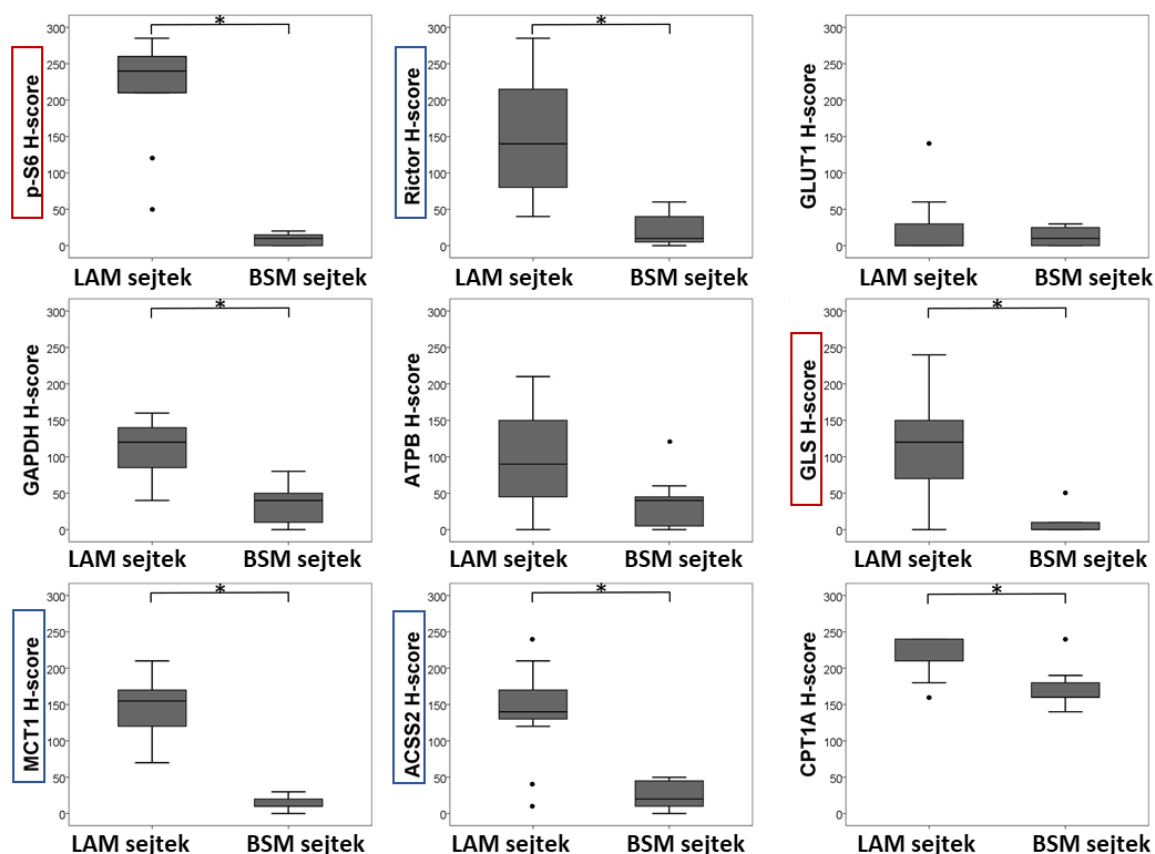
Az előbbiekkal összefüggésben tovább, a LAM sejtek metabolikus változásaival kapcsolatos érdekes expresszió különbségeket figyeltünk meg metabolikus jellemzésünkben. A LAM sejteket a kontrollnak tekinthető BSM-sejtekhez képest magasabb GLUT1- expresszió nem jellemezte, ez a sejtek alacsony glükózfelvételét, glükóz független növekedését mutatja. A vizsgált esetek heterogenitást a GAPDH expresszióban (7 esetben emelkedett) és az ATPB expresszióban (4 esetben mutatott magas H-score értéket) mutattak ugyan, de ezeknek az enzimeknek is inkább alacsony expresszióját figyeltük meg a BSM-sejtekhez képest. Előbbiek

mellett mind a LAM, mind a BSM-sejtekben igen magas CPT1A enzim expressziót írtunk le, de a H-score értékek alapján a CPT1A-expresszió szignifikánsan magasabb volt a LAM-sejtekben, mint a BSM-sejtekben ( $p < 0,01$ ). Ez a zsírsav oxidáció jelentőségére (zsírsavak  $\beta$ -oxidációjában sebességmeghatározó szerep) hívja fel a figyelmet a LAM sejtekben. Előbbi jelentőségét alátámasztotta, hogy a laktát és acetát transzportban szerepet játszó MCT1 expresszió 11-ből 7 esetben szintén emelkedést jelzett, illetve az acetáthasznosítás kulcsenzime az ACSS2 is magas volt a 11 esetből 9-ben, míg ennek a két enzimnek az expresszióját a normál sejtekben gyakorlatilag nem figyeltük meg. Jelentős mértékű emelkedést mutattunk még ki a GLS expresszióban is, a vizsgált 11 esetből 10-ben, míg BSM-sejteket a GLS expresszió gyakorlatilag nem jellemezte ( $p < 0,01$ ) (51. ábra).



**51. ábra Humán LAM sejtek mTOR, mTORC2 hiperaktivitása és metabolikus jellegzetességei.** Reprezentatív immunhisztokémiai képek, amelyek az emelkedett p-S6 és Rictor expressziót és egyes a normál BSM-sejtekhez képest szintén emelkedett metabolikus fehérjék mennyiségét mutatják be a sejtekben (20X).

Az mTOR aktivitást jellemző expresszió változásokat összevetettük a metabolikus eltérésekkel. Erős pozitív korrelációt mutattunk ki a LAM-sejtekben megfigyelt p-S6 (mTORC1 aktivitás) és GLS expresszió ( $\rho = 0,732$ ;  $p = 0,01$ ), valamint Rictor (mTORC2 komplex fehérje) és ACSS2 expresszió ( $\rho = 0,849$ ;  $p < 0,01$ ) között. Megfigyeltük még, hogy a Rictor és az ATPB expressziója magasabb az explantált végállapotú tüdőkből, mint a betegség korábbi stádiumát reprezentáló diagnosztikus biopsziákban, ami a betegség progressziójával állhat összefüggésben. Munkánk az első humán LAM mintákon végzett metabolikus és mTORC1 és C2 aktivitást érintő tanulmány, amiben a korábbról már ismert mTORC1 hiperaktivitás mellett igazoltuk, a LAM sejtekben az mTORC2 komplex emelkedett mennyiségét (ami rapalog kezelésekkel szembeni érzékenység különbségek hátterében állhat), illetve potenciális alternatív bioenergetikai folyamatok enzimeinek magasabb expresszióját, így a glutaminolízis, az acetáthasznosítás és a lipid anyagcsere változások jelentőségét (52. ábra)



**52. ábra** Az immunhisztokémiai festések H-score értékeinek különbségei BSM sejtek és LAM sejtek között. Az emelkedett mTORC1 aktivitással összefüggő GLS expresszió fokozódás, illetve az mTORC2 hiperaktivitással összefüggést mutató egyes metabolikus enzimek (MCT1, ACSS2) expresszió különbségeit piros, illetve kék kerettel jelöltem

#### IV.4. Tumorok mTOR hiperaktivitása és annak bioenergetikai szabályozásban játszott szerepe

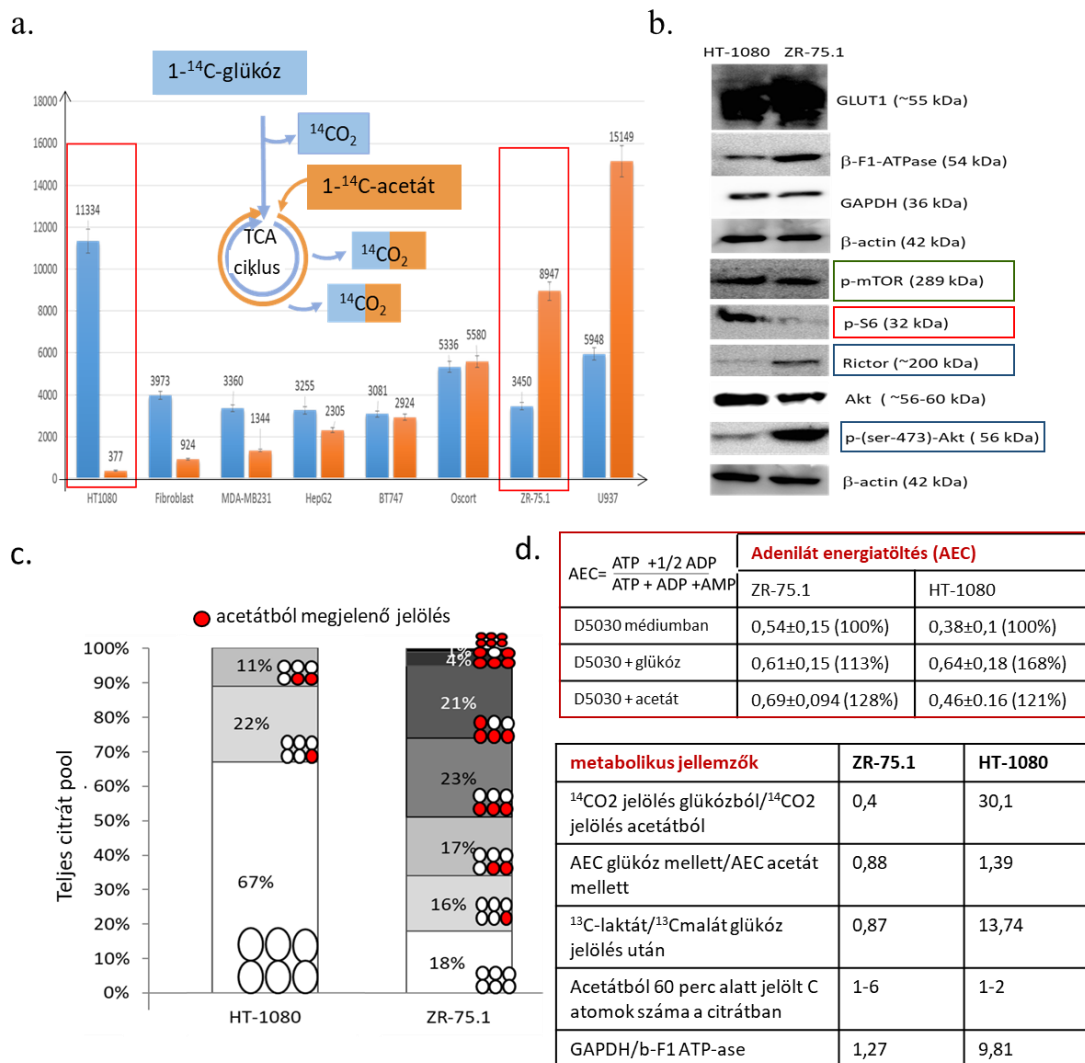
Az mTOR hiperaktivitás szerepe a metabolikus szabályozásban mára már megkérdőjelezhetetlen, ahogy ezt a ritka tüdő tumor elváltozások (LAM) esetében is bemutattam az előző részben. Az mTOR aktivitásnak legkülönbözőbb katabolikus és anabolikus folyamatokban, köztük a glikolitikus enzimek, a glutamináz expressziójának vagy a lipídanyagcsere, a lipidszintézis, illetve akár az autofágia szabályozásában játszott szerepe egyre jobban ismert. Az mTOR, mint jelátviteli csomópont centrális szerepe arra teremt lehetőséget, hogy a daganatos mikroenvironment és stresszhatások eredőjével szinkronban az mTOR hiperaktivitás a metabolikus alkalmazkodás egyik kulcsszereplője legyen a daganatsejtek túlélésében, rezisztencia mechanizmusaiban és terápiarezisztens tumorainak progressziójában. Az elmúlt években munkánk során egyre több olyan jelenséget, az mTOR hiperaktivitással is összefüggő metabolikus változást ismertünk meg, amelyek ennek a szerepnek az igazolását, esetleges terápiás kiaknázását tehetik lehetővé a jövőben.

#### IV.4.1. Szubsztráthasznosítási, bioenergetikai útvonal különbségek jellemzése

Egyik első metabolikus vizsgálatunkban különböző típusú *in vitro* tumor sejtvonalak glükóz- és acetáthasznosításának különbségeit tanulmányoztuk szérum- és glutaminmentes médiumban  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -glükóz és  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -acetát szubsztrátok segítségével. A keletkező  $^{14}\text{CO}_2$  mennyiségét meghatározva hasonlítottuk össze a sejtvonalak és humán fibroblasztok mitokondriális oxidációs kapacitásának szubsztrátfüggését. A vizsgált sejtvonalak többségében a glükóz hasznosítása kifejezettebb volt, mint az acetát hasznosítás (53.a ábra). A sejtvonalak egymáshoz képest jelentősebb eltéréseket azonban inkább az acetát oxidációs képességben mutattak. Feltételeztük, hogy ennek hátterében a tumorsejtek eltérő acetáthasznosítása, az ezzel összefüggő mitokondriális aktivitás eltérése állhat. Részletes bioenergetikai és mTOR aktivitás vizsgálatokat a két legnagyobb eltérést mutató adherens sejtvonal, a HT-1080 fibrosarcoma és a ZR-75.1 emlőcarcinoma sejtvonalakban végeztünk.

Egyes az energiatermelésben, anyagcserében szerepet játszó enzimek expressziójának különbségeit tapasztaltuk. Míg a GLUT1 (glükóz transzporter 1) fehérje mennyisége mindkét sejtet jellemezte, addig a  $\beta$ -F1-ATPáz esetében fehérje szinten is igazolni tudtuk a real-time PCR méréskor tapasztalt mRNS expressziós különbségeket. Az alacsonyabb  $\beta$ -F1-ATPáz expresszió összefüggést mutatott a HT-1080 magasabb glikolitikus aktivitásával a ZR-75.1 tumorsejtekhez képest. További eltéréseket találtunk a HT-1080 és ZR-75.1 sejtek mTOR komplex aktivitásában. A HT-1080 sejteket magas p-mTOR, p-S6 és relatív alacsony Rictor fehérje mennyiség jellemezte, ez domináns mTORC1 aktivitásra utal, ellentétben a ZR-75.1 sejtekkel, amelyet magas p-mTOR mellett alacsony p-S6, de igen jelentős, magas Rictor és p-Ser473-Akt expresszió jellemzett, kifejezetten magas mTORC2 aktivitást jelezve (53.b ábra).

A mitokondriális kapacitás különbségeket is megerősítettük a két sejtvonal között, D5030-DMEM-ben (glükóz- és glutaminmentes tápfolyadék)  $U\text{-}^{13}\text{C}$ -glükóz és  $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetát mellett tartott sejtek intracelluláris metabolit koncentrációjának LC-MS méréseivel, illetve a  $^{13}\text{C}$  atomok meghatározott citrátköri (TCA) metabolitokba és laktátba épülésének követésével. A jelölt C-atomok mennyisége és adott metabolitokban megjelenő nagyobb számú jelölt C-atomok száma a sejtek bioenergetikai folyamatainak intenzitásával összefüggően változott. HT-1080 sejtekben  $U\text{-}^{13}\text{C}$ -glükóz jelölést követően a laktátban és a glükóz-6-foszfátban nagyobb mértékben figyeltük meg  $^{13}\text{C}$  atomok feldúsulását, mint a citrátciklus intermedierekben. Míg HT-1080 esetében glükózból 2-3  $^{13}\text{C}$  atom beépülését detektáltuk a malátban, addig a ZR-75.1 sejtekben akár 4  $^{13}\text{C}$  atom is kimutatható volt. Ez alacsonyabb mértékű mitokondriális glükóz oxidációra utal a HT-1080, mint a ZR-75.1 sejtekben. Ezt az intracelluláris  $^{13}\text{C}$ -laktát/ $^{13}\text{C}$ -malát arányok összehasonlításával is jellemezhetjük (HT-1080 – 13,74, ZR-75.1 – 1,17), ami a HT-1080 fibrosarcoma sejtvonal igen jelentős glikolitikus, Warburg-fenotípus eltolódását mutatja.  $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetátból az acetyl csoport második szénatomjának citrátköri metabolitokba épülése az előbbiekhöz hasonlóan segíti az acetát szubsztrát hasznosításából származó  $^{13}\text{C}$  atomok útjának követését. Citrátban acetát jelölést követően 1-2  $^{13}\text{C}$  atom beépülését figyeltük meg HT-1080 sejtek esetében, míg a ZR-75.1 emlőcarcinoma sejteknél akár 6 stabil izotóp C-atomot tartalmazó citrát molekulákat is detektáltunk 60 perces jelölést követően. Ez az eredmény is alátámasztja az intenzívebb Warburg-glikolitikus aktivitás melletti alacsonyabb TCA oxidációs kapacitást a HT-1080 sejtekben, míg magasabb mitokondriális oxidációs kapacitást, kiegyensúlyozottabb metabolikus fenotípust a ZR-75.1 sejtekben (53.c-d. ábra).



**53. ábra *In vitro* sejtvonalak metabolikus jellegzetességei.** Radioaktív jelzett glükóz és acetát mellett a sejtvonalak izotóp jelölt „kilégzési CO<sub>2</sub>” mennyiségi különbségei (beütés számok detektálása) (a.); Két alapvetően eltérő szubsztrát hasznosítású sejtvonal metabolikus és mTOR aktivitását jellemző fehérje expressziós profilja (Western blot adatok) (b.); Stabil izotóp jelölt acetátból nyomkövetett C atomok beépülése citrátba – különböző mértékben jelölt citrát molekulák %-os aránya a teljes citrát poolban (LC-MS mérés) (c.); Különböző metabolikus jellemzők összehasonlító bemutatása eltérő módszerek adatai segítségével (LC-MS mérések, radioaktív kilégzési CO<sub>2</sub>-mérés, AEC és expressziós adatok) (d.).

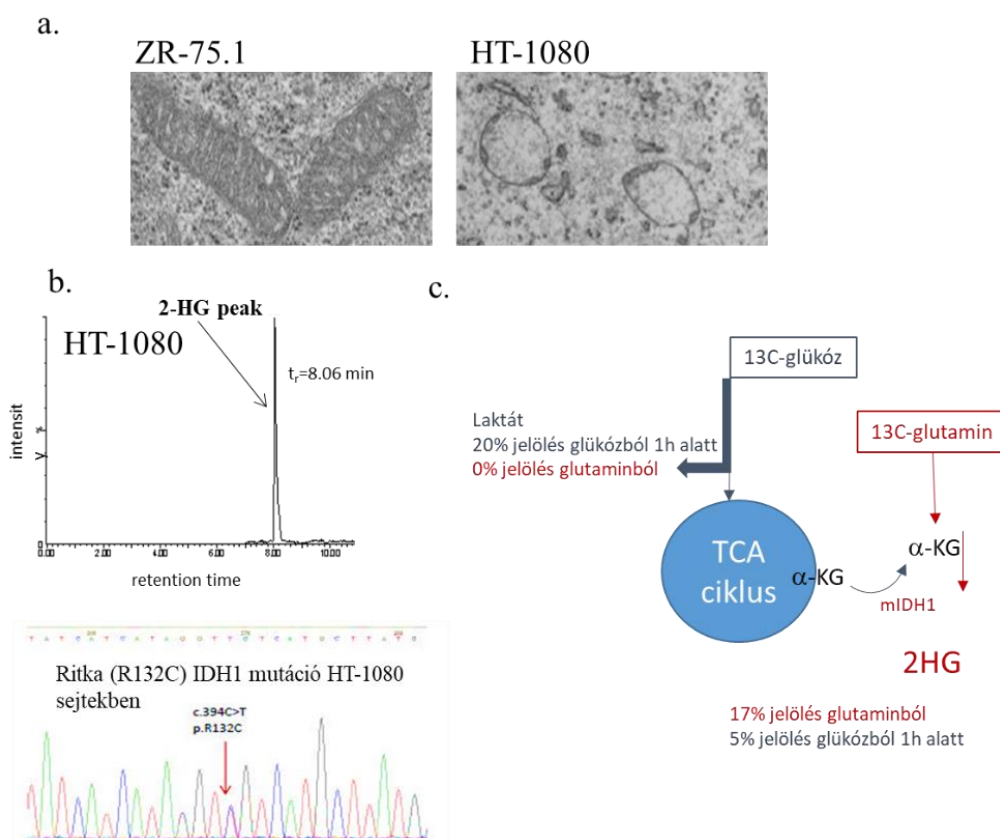
Az adenilát energiatöltés (AEC) vizsgálataink glükóz és acetát jelenlétében, illetve hiányában szintén megerősítették a két sejtvonal bioenergetikai különbségeit. Teljes médiumban tenyésztett sejtekhez képest (AEC=0,75-0,85) tápanyag hiányos D5030 DMEM médiumban a ZR-75.1 sejtekben (0,54) és HT-1080 sejtekben (0,38) is jelentős energiatöltés csökkenést mutattunk ki, amit a HT-1080 sejtek esetében a glükóz, míg a ZR-75.1 sejtekben az acetát emelt meg szignifikánsan nagyobb mértékben (53.d ábra). Folytatva anyagcsere vizsgálatainkat, a két sejtvonal xenograft modelljeinek korábban Paku Sándor által készített elektronmikroszkópos felvételeit vizsgáltuk meg (54.a ábra). A mitokondriális funkciók csökkenésének hátterében a HT-1080 fibrosarcoma xenograftokban csökkent számú és sérült morfológiájú mitokondriumokra figyeltünk fel, ami a leírt bioenergetikai különbségekkel is összefügghet.

Mindezen bienergetikai méréseink alapján egyrészt egyértelműen igazoltuk a két sejtvonal bioenergetikai, szubsztrát-hasznosítási különbségeit – a HT-1080 Warburg glikolitikus

preferenciáját, illetve a ZR-75.1 sejtek lényegesen kiegyensúlyozottabb bioenergetikai szabályozását, másrészt a beállított módszerek lehetőséget teremtettek különböző tumorsejtek bioenergetikai jellegzetességeinek térképezésére és további vizsgálatok kivitelezésére.

#### IV.4.2. mTOR aktivitás függő onkometabolit termelés vizsgálata

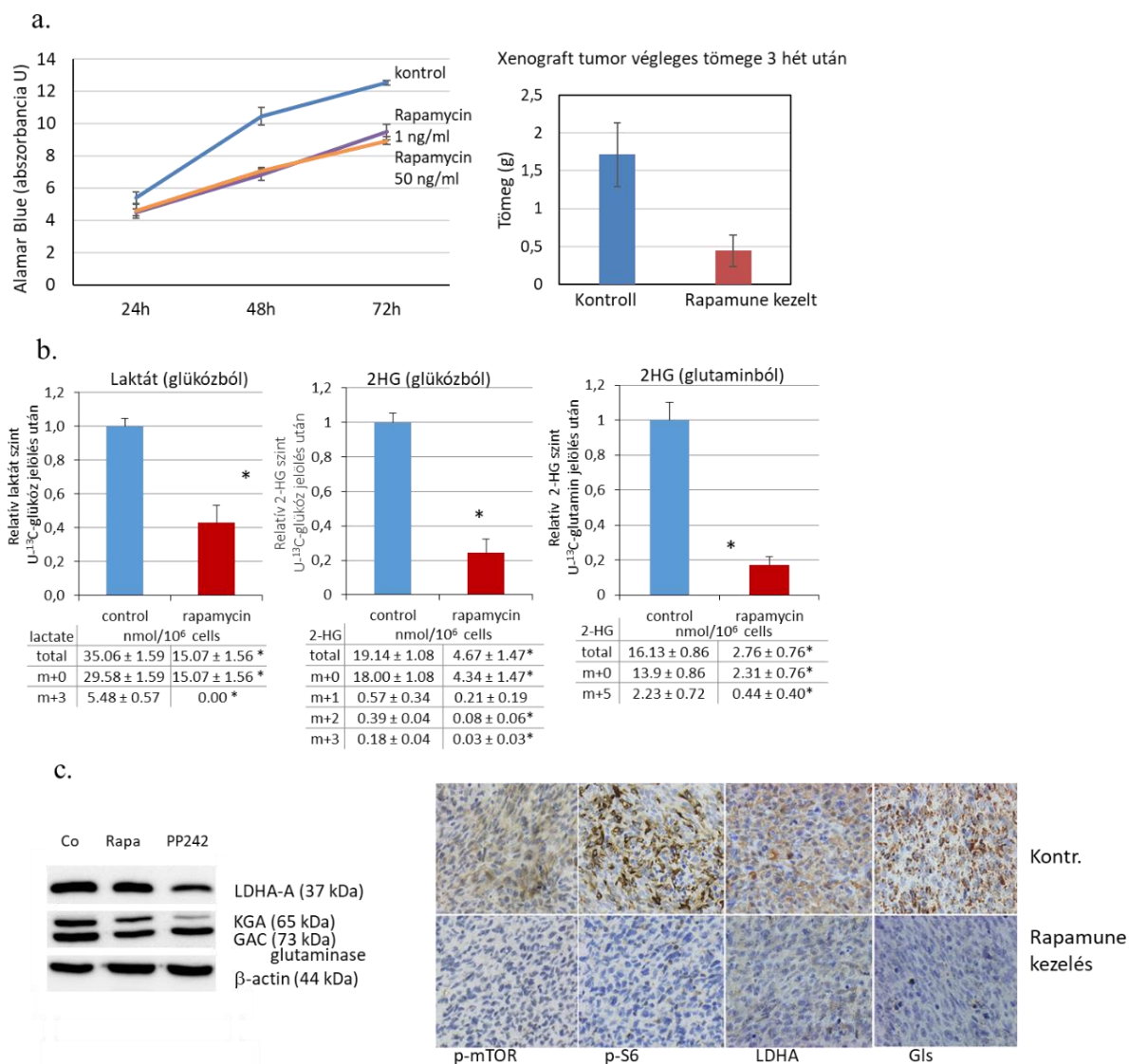
LC-MS vizsgálataink közben a HT-1080 sejtek spektrumján egy nagyon jellegzetes csúcsot figyeltünk meg. Ezt beazonosítottuk, igazoltuk a 2-hidroxioglutarát (2-HG) onkometabolit megjelenését és mennyiségének emelkedését a vizsgált fibrosarcoma sejtekben ( $18 \text{ nmol}/10^6$  sejt). Felmerült, hogy IDH mutáció áll a háttérben, majd intézetünk onkohematológiai laboratóriuma segítségével Sanger szekvenálással sikerült is igazolnunk a heterozigóta IDH1 R132H (missense, funkciónyerő) mutációt és következtébe kimutatott D-2-hidroxioglutarátot. Az onkometabolit termelés szubsztrát forrását is meghatároztuk. 60 perces  $U\text{-}^{13}\text{C}$ -glükóz,  $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetát,  $U\text{-}^{13}\text{C}$ -glutamin jelölést követően a 2-HG-ban  $^{13}\text{C}$  szénatom jelölés mértéke alapján megállapítottuk, hogy: 2-HG  $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetátból nem keletkezik; és glükózból a teljes 2-HG mennyiségének alig 6%-a jelölődik (egy, illetve két jelölt szénatomos 2-HG molekulákat figyeltünk meg (M+1 és M+2)); míg legnagyobb mértékű jelölés  $U\text{-}^{13}\text{C}$ -glutamin szubsztrát mellett keletkezett (16%). Ez az eredmény arra utal, hogy a 2-HG termelés elsődleges forrása a glutamin a vizsgált IDH mutáns fibrosarcoma sejtekben (54. ábra).



**54. ábra HT-1080 sejtek onkometabolit termelése és annak szubsztrát forrása.** A HT-1080 károsodott és kriszta szegény, illetve a ZR-75.1 ép mitokondriumai elektronmikroszkópos felvételen (a.); HT-1080 sejtek D 2-hidroxioglutarát (2-HG) onkometabolit termelése (LC-MS) és a háttérben igazolt heterozigóta IDH1 gén mutáció (b.); jelölt glükóz és glutamin segítségével meghatároztuk, hogy a 2-HG fő bioenergetikai forrása a glutamin (adott szubsztrátok után a jelölés %-os arányát mutatja be az ábra) (c.)

Ennek a metabolikus szempontból különleges, dominánsan glikolitikus, károsodott oxidatív mitokondriális funkciókkal jellemezhető sejt vonalnak tehát jellegzetessége két onkometabolit termelése is: laktát és D-2HG jelenik meg a sejtekben, illetve az extracelluláris térben. A következő vizsgálatokban a HT-1080 sejtekre jellemző magas mTORC1 aktivitás szerepét

vizsgáltuk az előbbi két onkometabolit termelésében. mTORC1-et specifikusan gátló *in vitro* rapamycin, illetve *in vivo* Rapamune kezelés mellett nemcsak a tumornövekedés kismértékű gátlását, de párhuzamosan a két onkometabolit termelésének szignifikáns csökkenését is igazoltuk (LC-MS mérések). Utóbbiakban az mTORC1 aktivitás GLS, illetve az LDHA fehérjék termelésében játszott szerepének hatását is kimutattuk (55. ábra). A későbbiekben az mTORC1 gátlás laktát termelést csökkentő hatásait egyéb sejtvonalakban, köztük a ZR-75.1 emlőcarcinoma sejtvonalban (40%-os csökkenés 72 h alatt *in vitro*), illetve egyes Hodgkin lymphoma sejtvonalakban (DEV, KMH2 kisebb mértékű ~20%-os csökkenés) is igazoltuk.



**55. ábra Az mTOR aktivitás jelentősége onkometabolitok termelésében.** A laktátot és 2-HG (2HG) termelő HT-1080 sejtekben az mTORC1 aktivitás gátlásnak *in vitro* és *in vivo* is tumor növekedést csökkentő hatásait jellemeztük (a.); párhuzamosan az előbbivel az onkometabolit (2-HG és laktát) termelés csökkenését is kimutattuk (b.); az mTOR aktivitás az LDHA, illetve a glutamináz expresszió fenntartásával segíti az onkometabolitok termelését, vizsgálatunkban előbbi fehérjék expresszió változásait is igazoltuk *in vitro* (Western blot) és *in vivo* is (szöveti IHC vizsgálat eredményei) (c.)

Más citrátköri onkometabolit termeléssel járó mutációk, így az *SDH* gén mutációk esetében két kollaborációs vizsgálatban vettünk részt, ahol a kóros SDH mutáns sejtek szukcinát

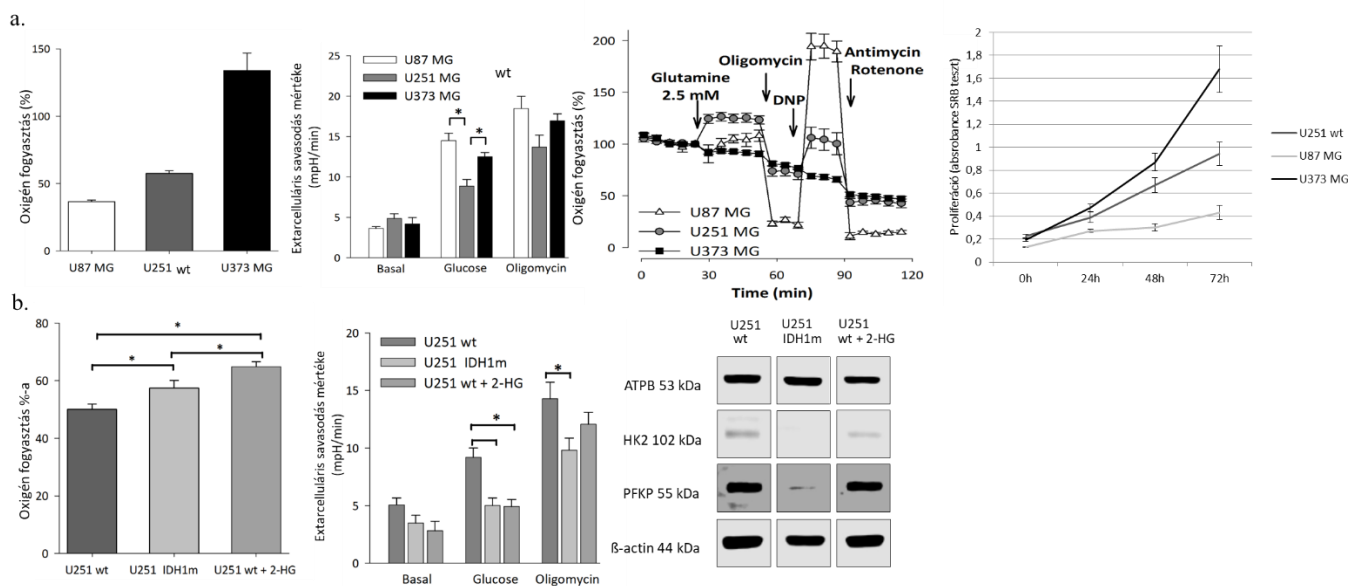


felhalmozódását igazoltuk humán pheochromocytoma sejtvonalban, illetve genetikailag módosított *C. elegans* modellekben. Mindkét esetben segítettük LC-MS és fehérjeszintű vizsgálatainkkal a sejtek potenciális alternatív bioenergetikai adaptációs mechanizmusainak igazolását is. Eredményeink azt sugallják, hogy ezekben az SDH mutáns sejtekben az alternatív útvonalak közül a glutaminhasznosításnak, illetve a fémmodellben a glioxalát ciklusnak is van jelentősége, amelyek aktivitásának szabályozásában az mTOR aktivitás is részt vesz.

#### **IV.4.3. IDH mutáns és vad típusú glioma sejtvonalak metabolikus jellemzése, a glioma sejtek gamma-amino-vajsav (GABA) oxidációs képessége**

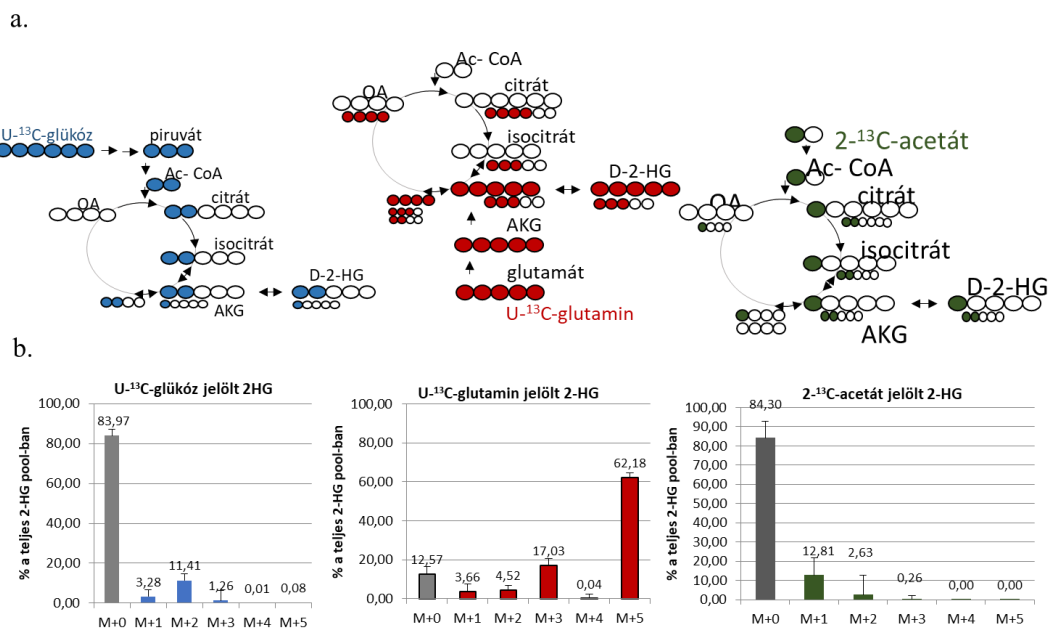
Az IDH mutáció és következményeként a 2-HG onkometabolit termelés pl. gliomák esetében nagyobb jelentőségű, egyrészt gyakorisága (~65-70%), másrészt a jelenlegi kezelés mellett prognosztikai szempontból; mivel az IDH mutáns esetek jobban reagálnak kemoterápiára, így prognózisuk valamivel jobb. Vizsgálatainkban endogén IDH mutációval rendelkező glioma sejtvonal azonban nem állt rendelkezésünkre, ilyen sejtvonalak, talán pont kevésbé agresszív viselkedésük miatt jelenleg alig elérhetők. Stabilizálni mutáns sejtvonalakat csak rövid ideig sikerül és xenograft modellekben is igen nehéz vizsgálni ezeket. Dr. William Leenders (Radboud University, Hollandia) segítségével azonban vad és IDH1 mutáns (*IDH1* R132H fehérjét overexpresszáló) U251-MG sejtvonalpárhoz férhettünk hozzá, így tudtuk folytatni további összehasonlító vizsgálatainkat. Az IDH mutáns glioma sejtvonalban is igazoltuk a rapamycin hatásait: p-S6 fehérje mennyiségének csökkenését (mTORC1 aktivitás csökkenés), glutamináz expresszió csökkenését, illetve az előbbieket mellett enyhe proliferáció gátlást (20%), és közel 30%-os 2-HG termelés csökkenést figyeltünk meg.

Ennek a sejtvonalpárnak, illetve további két IDH vad típusú glioma sejtvonalnak (U87-MG és U373-MG) metabolikus jellemzését végeztük el. Alaplégzésüket összehasonlítva Seahorse technikával a legalacsonyabb oxigénfelhasználás az U87-MG, míg legmagasabb az U373-MG sejteket jellemezte, ennek ellenére azonban a médium savasodásában (extracellular acidification – ECAR), tehát az alap tejsavas glikolitikus aktivitásban a glioma sejtvonalak nem mutattak szignifikáns különbségeket. A sejtek egyedi bioenergetikai jellegzetességeit egyéb szubsztrátok oxidációs különbségeiben figyeltük meg. Az U251-MG sejteknek volt például a legmagasabb glutamin oxidációs képessége, míg a leggyorsabban proliferáló és a glükózhasznosításban is magas értékeket mutató U373-MG sejtek előbbiekkal párhuzamosan magas alap oxidációs kapacitással rendelkeztek. Az IDH1 mutáns sejtekben, a 2-HG termeléssel párhuzamosan azt tapasztaltuk, hogy a sejtek alaplégzése magasabb, míg glikolitikus kapacitása csökkent a vad típusú sejthez képest. Azt, hogy ebben a metabolikus különbségben a 2-HG szint emelkedésének van jelentősége 2-HG kezelt sejtek segítségével támasztottuk alá. 72 h-ás D-2-HG kezelést követően a vad típusú U251-MG sejtek emelkedő oxigénfogyasztást mutattak, és ezzel összefüggésben szignifikánsan csökkent a Warburg glikolitikus aktivitása is a sejteknek, és ez még mitokondriális gátlószerek mellett sem állt helyre. Megfigyeltük továbbá, hogy az IDH mutáns sejtek lassabban proliferálnak, a duplázódási idő egy órával hosszabbnak bizonyult (sejtszámolás és Alamar blue tesztek eredményei alapján). A 72 h-ás D-2-HG kezelés viszont nem befolyásolta a sejtek növekedési ütemét *in vitro*, annak ellenére sem, hogy az IDH mutáció jelenléte, illetve az exogén 2-HG hozzáadása befolyásolta egyes metabolikus enzimek expresszióját is, csökkentette a  $\beta$ -F1-ATPáz, a hexokináz-2 és a foszfo-fruktokináz P mennyiségét (56. ábra).



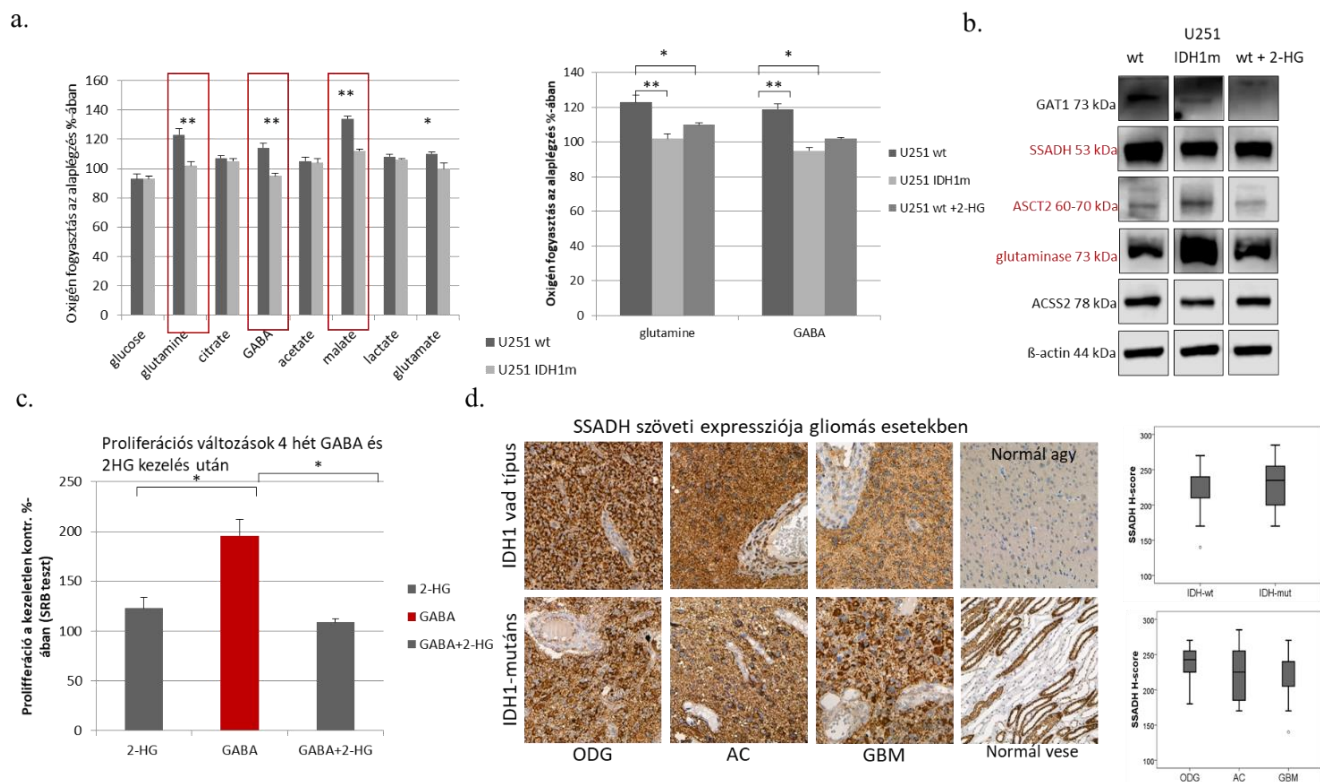
**56. ábra Glioma sejtvonalak metabolikus eltérései.** Az alap oxigénfogyasztás, extracelluláris pH változás (Seahorse eredmények) és sejtek proliferációjának (SRB teszt) eltérései három IDH vad típusú alap glioma sejtvonala esetében (a.); Az IDH mutáció metabolikus hatásainak (oxigén fogyasztás és extracelluláris savasodás vizsgálata Seahorse-al) és egyes enzimek expressziójának összehasonlítóvizsgálata IDH vad típusú és mutáns sejtvonala, illetve 2-HG kezelés (1 mM) esetében (b.)

A metabolikus különbségeket a mutáns és vad sejtvonala, valamint a 2-HG kezelt vad típusú sejtek intracelluláris metabolit koncentráció különbségei is mutatták. Az intracelluláris 2-HG szintek emelkedése mellett az  $\alpha$ -ketoglutarát (aKG) és egyes TCA metabolitok szintjének emelkedését tapasztaltuk LC-MS méréseinkben. Érdekes azonban, hogy IDH1 mutáns sejtekben szignifikánsan alacsonyabb glutamátszintet figyeltünk meg, míg 2-HG kezelés hatására vad típusú sejtekben emelkedett a glutamát mennyisége. Ebben a glutamát forrású 2-HG termelésnek, illetve a kezelés esetében az egyensúly ellentétes irányú eltolódásának lehet szerepe. A glutamin-glutamát-aKG-2-HG irányú folyamatok fontos szerepét az IDH1 mutáns sejtekben,  $^{13}\text{C}$  izotóp jelölt szubsztrátok felhasználásának LC-MS vizsgálatában is igazoltuk. Az IDH1 mutáns sejtekben  $^{13}\text{C}$ -jelölt szubsztrátokkal (U- $^{13}\text{C}$ -glutamin, U- $^{13}\text{C}$ -glükóz és 2- $^{13}\text{C}$ -acetát) vizsgáltuk a 2-HG forrását. 24 órás jelölés után kapott eredményeink egyértelműen igazolták, hogy a 2-HG termelés elsődleges forrása a glutamin (2-HG 88%-a jelölődött U- $^{13}\text{C}$ -glutamin esetén), ami szignifikáns összefüggést mutat a mutáns sejtek emelkedett glutamináz és glutamin transzporter (ASCT2) fehérje mennyiségével. A különböző tömegszámú jelölt 2-HG mennyiségi arányai (M+5 tömegszám 62% mellett M+3 tömegszám 17%), arra is felhívják azonban a figyelmet, hogy a 2-HG a glutamát-aKG-2-HG útvonalon keletkezik elsősorban, de a citrátcikluson keresztül is képződhet (M+3-as tömegszám). 24 óráig jelölt mintáinkban azt is kimutattuk, hogy a 2-HG származhat glükózból és acetátból is, csak utóbbiból jóval kisebb mértékben (57. ábra).



**57. ábra** Az IDH mutáns glioma sejtvonal 2HG termelésének elsődleges szubsztrátforrása a glutamin. D5030 tápfolyadékban U-<sup>13</sup>C-glutamin, U-<sup>13</sup>C-glükóz és 2-<sup>13</sup>C-acetát jelölés felhalmozódásának vizsgálata 24 h-ás jelölést követően IDH mutáns sejtvonalban termelődő 2-HG-ban (LC-MS mérés eredményei)

Az IDH mutáns és vad sejtek bioenergetikai szubsztrát oxidációs különbségeit, oxigénfogyasztását Seahorse technikával mértük az egyetem Biokémia Intézetében, Tretter professzor úr munkacsoportja segítségével. Az IDH1 mutáns sejtek esetében glutamin, glutamát és malát esetében alacsonyabb mértékű oxigénfogyasztást mutattunk ki, és gamma-amino-vajsav (GABA) esetében is szignifikánsan, közel 20%-kal emelkedett a vad típusú U251 sejtek oxigénfogyasztása. Ez az emelkedés a mutáns sejtvonalakban nem jelent meg, illetve a vad típusú U251 sejtek GABA oxidációs képessége 2-HG kezelés mellett jelentősen csökkent. Azt, hogy ez nem GABA-receptor-mediált folyamat függő jelenség, hanem a tényleges GABA oxidáció következménye alátámasztja, hogy az általunk használt sejtvonalak GABA receptor, illetve receptor alegység mRNS negatív sejtek (Human Protein Atlas - [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)). A GABA oxidációban, hasznosításban szerepet játszó enzimek mennyiségét vizsgálva előbbiekkal összefüggésben az U251 glioma sejtekben jelentős mennyiségű szukcinát szemialdehid-dehidrogenáz (SSADH) és GABA transzporter (GAT1) fehérjét mutattunk ki Western blot vizsgálatainkban. Ezeknek a fehérjéknek mennyisége az IDH1 mutáns U251 és a 72 óráig 2-HG-al kezelt U251 sejtekben azonban alacsonyabbnak bizonyult, mint a vad típusú kezletlen sejtekben. Mivel a GABA oxidáció jelét a többi vizsgált vad típusú glioma sejtvonalban nem tapasztaltuk és ezek a sejtvonalak SSADH expressziót sem mutattak, megvizsgáltunk humán gliomás eseteket is. A vizsgált humán glioma minták (n=47) 97%-ában – immunhisztokémiai festésekkel –, a kontroll peritumorális normál astrocyta sejtek alacsony vagy közepes SSADH expressziójához (H-score < 150) képest a vizsgált klinikopatológiai paraméterektől (kor, nem, tumor típusa, grádusa vagy IDH1 mutációs státusz) függetlenül *in situ* magas SSADH fehérje mennyiséget mutattunk ki a humán glioma szövetekben (58. ábra).



**58. ábra Glioma sejtek potenciális alternatív szubsztrát oxidációja és annak jelentősége.** IDH vad típusú SSADH-t, ASCT2-t expresszáló glioma sejtek gamma-amino vajsav (GABA) oxidációs képessége, illetve ennek csökkenése IDH mutáció vagy 2-HG jelenlétében (a. Seahorse oxigén fogyasztási adatok, b. Western blot eredmények); GABA kezelés proliferáció fokozó hatása, illetve annak felfüggesztése 2-HG kezeléssel (c. SRB teszt 4 hét kezelés után GABA 5mM, 2HG 1mM); SSADH általános expressziója humán gliomákban szubtípus és IDH mutáció független (d. IHC vizsgálat, H-score értékelése)

Azt, hogy előbbi megfigyeléseinknek, a szubsztrát hasznosításnak és így például a GABA oxidációnak lehet daganatbiológiai jelentősége, *in vitro* tumornövekedési vizsgálatokban teszteltük. Eredményeink szerint a GABA kezelés az U251 sejtek rövidtávú (72 h) tenyésztésében ugyan nem, de hosszabbtávon szignifikánsan fokozta az IDH vad típusú U251 sejtek proliferációját. Ez a hatás azonban 2-HG kombinált kezelés esetében már nem volt detektálható. Mindezek alapján a terápiás szempontból különösen nagy kihívást jelentő gliomák esetében érdemes megfontolni az általunk feltárt bioenergetikai jellegzetességek további vizsgálatát, esetleg egyes fenotípusos és funkcionális jellegzetességek célzott gátlását.

#### IV.5. Metabolikus plaszticitás és az mTOR hiperaktivitás

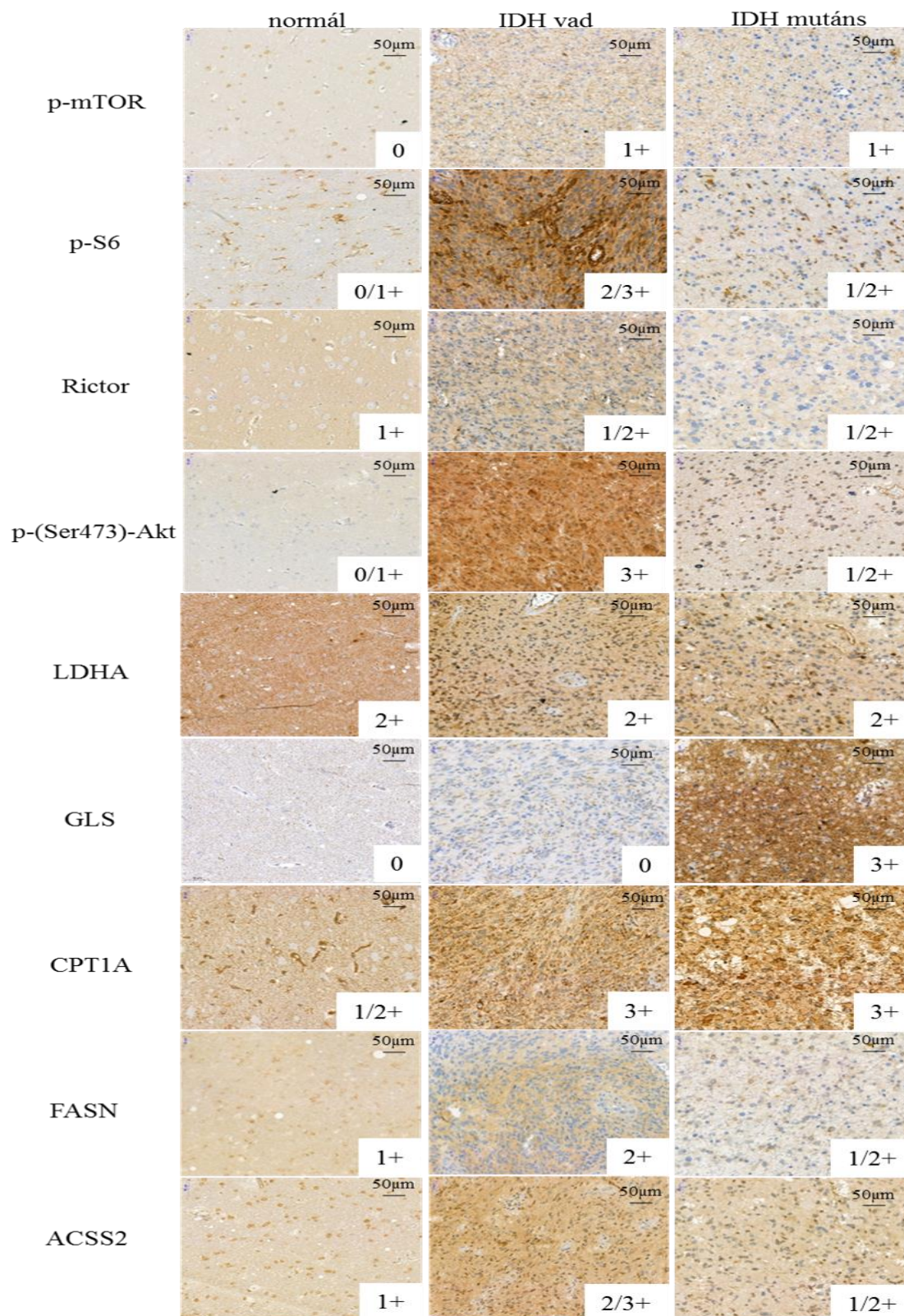
Előbbi vizsgálataink közben részt vettünk egy olyan munkában, amelyben normál gliasejtek éhezés utáni állapotaiban az mTORC1 aktivitás változásának jellemzésében segítettünk felhasználva az mTOR hiperaktivitás meghatározások során beállított méréseinket. A gliomák esetében már jól ismert mTOR hiperaktivitás, mTORC1 gátlók terápiás tesztelése is zajlik, zajlott fáziskísérletekben. Saját az mTOR aktivitás és annak metabolikus adaptációban játszott szerepével kapcsolatos vizsgálatainkat humán glioma sejtvonalak és humán biopsziás minták patológiai karakterizálásával kezdtük meg. Ebben fel tudtuk használni korábbi mTOR aktivitás vizsgálatainkban, illetve metabolikus karakterizálásban beállított módszereinket.

## IV.5.1. A metabolikus plaszticitás mint potenciális target bizonyos szolid daganatok kezelésében

### IV.5.1.1. Humán gliomák metabolikus plaszticitása mint potenciális target

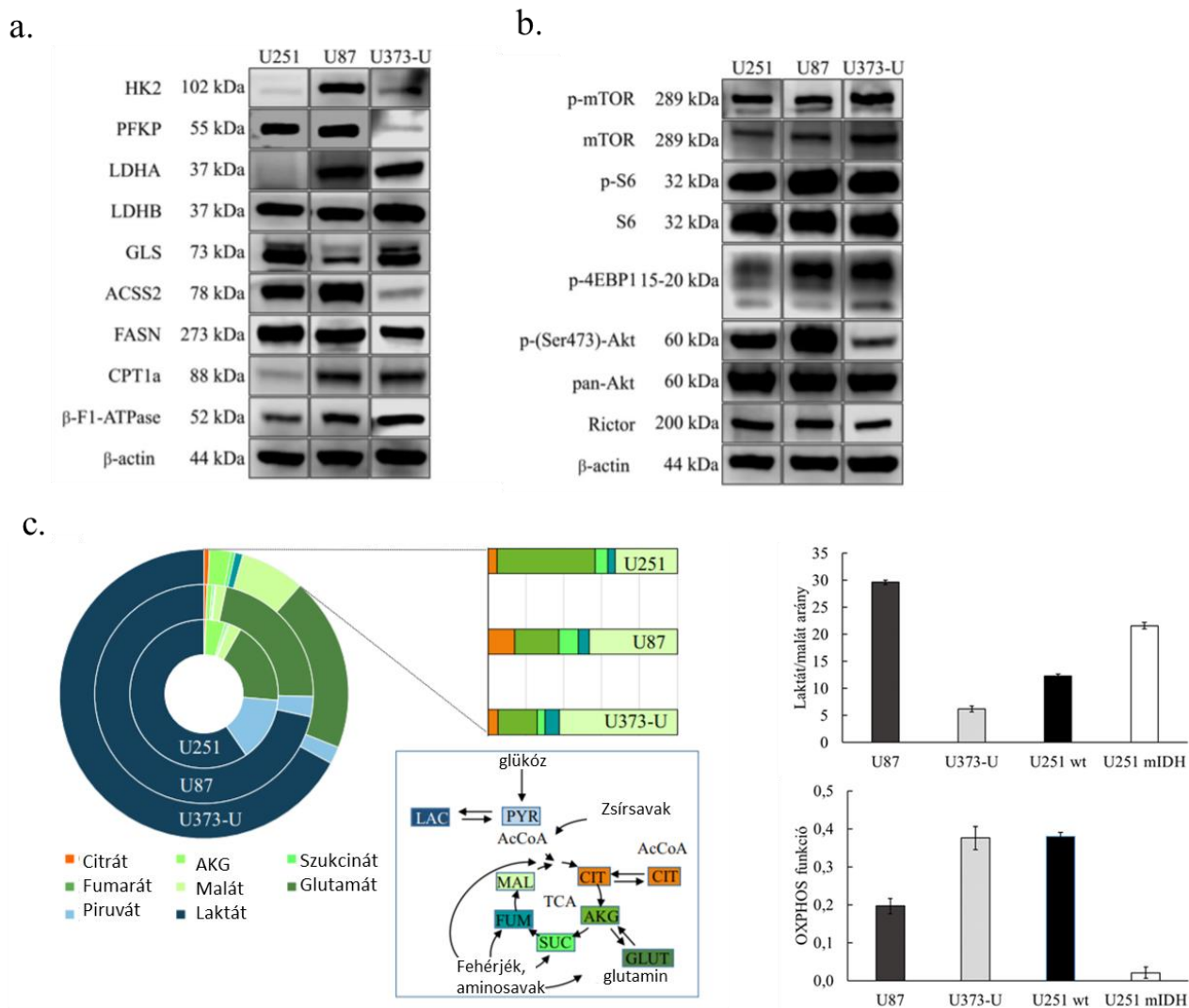
Immunchisztokémiai festések H-score értékelésével az mTOR és metabolikus aktivitással összefüggő fehérjék expressziós mintázatát hasonlítottuk össze *in situ*. Ehhez normál peritumorális cerebrum mintákat, illetve IDH mutáns és vad humán glioma biopsziás mintákat használtunk fel (n=20-20 eset). A tumorokban a jól ismert fokozott mTOR aktivitás jelei mellett a normál agyszövethez képest magasabb metabolikus aktivitással összefüggő fehérje expressziós mintázatot tapasztaltunk. Az IDH mutáns tumorokban közepes intenzitású, míg a vad típusú gliomákban pedig még az előbbinél is jelentősebb mennyiségű p-mTOR, p-S6 és p-Ser473-Akt fehérjét mutattunk ki. Ez, a más tumorok esetében is már korábban megfigyelt, rosszabb prognózissal összefüggő mTORC2 aktivitás emelkedésére utal. Ezzel kapcsolatban még annak ellenére is alig voltak adatok, hogy az mTORC1 gátlók várt terápiás hatásai temozolomide kombináció klinikai fázis kísérletekben elmaradtak. Előbbiek mellett metabolikus értékeléseink szerint a normál agyszövetben is jellegzetes intenzív Warburg-glikolízisra jellemző, magas LDHA expressziót figyeltünk meg humán gliomákban. Hasonlóan ehhez a zsírsavszintézis markerének tekinthető FASN mennyisége sem mutatott lényeges különbséget a normál szövet és a malignus tumorok esetében. Glioma típustól független lényeges különbséget a lipidoxidáció szubsztrátok mitokondrium mátrixtranszportjában, illetve az acetáthasznosításban szerepet játszó CPT1A és ACSS2 emelkedésében írtunk le. Korábbi *in vitro* eredményeinket is alátámasztották a kapott adatok, a normál agyszövethez képest a glutamináz expresszió esetében az IDH vad és IDH mutáns gliomák között markáns különbséget figyeltünk meg. Az IDH mutációval szignifikánsan magasabb glutamináz expresszió függött össze *in vivo*, ez megerősíti az IDH mutáns gliomák glutaminfüggő anyagcseréjét és a glutaminase 2-HG onkometabolit termelésben játszott szerepét. A viszonylag kis mintaszám miatt további klinikopatológiai paraméterrel összefüggő expresszió különbséget csak p-Ser473-Akt és a grade IV-es esetek megjelenése között figyeltünk meg (59. ábra).

*In vitro* vizsgálatainkban U251 mutáns sejtvonalakban alacsonyabb HK2, LDHA expressziót és párhuzamosan magasabb GLS expressziót figyeltünk meg a vad típusú sejtekhez képest, míg a reverz Warburg effektusban kulcs enzim LDHB mennyiségében nem volt szignifikáns különbség a sejtekben. Ezek alapján a Warburg glikolitikus fenotípus az LDHA és HK2 expresszió különbségek vizsgálatával jól meghatározható lehet. Míg az alternatív útvonalak megközelítésére a GLS, CPT1A, FASN, ACSS2 festésekkel volt lehetőségünk, ezek alapján a legalacsonyabb glutaminolízissel, zsírsavoxidációval és acetáthasznosítással összefüggő enzimexpressziót az U87 sejtekben találtunk. Az anyagcsere-eltéréseket az intracelluláris metabolit koncentrációk különbségei is alátámasztották; a laktát/malát arány legnagyobb az U87 sejtekben volt, ez összefügg a HK2 és LDHA expresszió különbségekkel és az oxidációs folyamatokat szolgáló egyéb TCA ciklus feltöltő mechanizmusokat segítő enzimek alacsony szintjével is. U373 sejtekben a glikolitikus enzimek magasabb mennyisége mellett, alacsonyabb laktát/malát arány jelent meg, ami felveti a glutamin anaplerózis, a glutaminoxidáció mint alternatív bioenergetikai folyamat megjelenését ebben a sejtben, amivel összefüggésben a glutamátszint emelkedése is megjelent.



**59. ábra mTOR aktivitás markerek és metabolikus enzimek/fehérjék *in situ* mennyiségének és eloszlásának jellemzése.** Reprezentatív IHC festések IDH mutáns és vad típusú humán glioma metszeteken. 0-3+ értékeléseket is feltüntettük a normál peritumorális cerebrum, IDH vad típusú és mutáns gliómák esetében. DAB kromogén (barna) mellett hematoxilin háttérfestést alkalmaztunk, a nagyításokat feltüntettük, a metszeteket szkenneltük majd Panoramic Viewer programmal értékeltük

Az IDH mutáns sejtvonalban a magas 2-HG onkometabolit szint jelentősen módosította az LC-MS mérésekkel meghatározott metabolitok mennyiségét, emelkedett piruvát szintet mértünk a vad típusú U251 sejtekhez képest. Mindez a mitokondriális működés csökkenésére, csökkent OXPHOS kapacitásra hívta fel a figyelmünket. Az IDH mutáció hatásainak kompenzálásaként megjelenő metabolikus átrendeződések a csökkent LDHA szint ellenére a laktát termelés, a Warburg-effektus relatív emelkedését mutatták a vad típusú sejtekben tapasztaltakhoz képest (60. ábra).



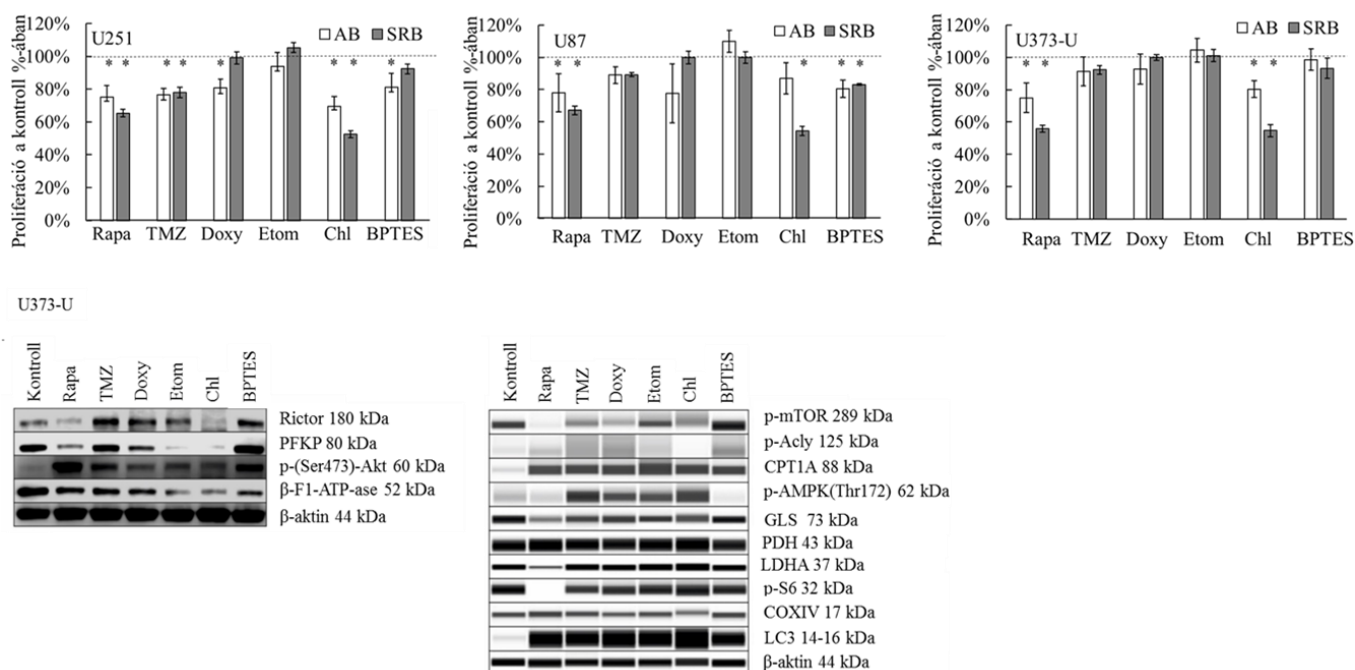
**60. ábra Humán glioma sejtvonalakban a metabolikus és mTOR aktivitást jellemző fehérjék expressziós profilja, illetve az intracelluláris metabolit szintek eltérései alapján megfigyelhető glikolízis/OXPHOS jellegzetességei.** Fehérje expressziós profilok Western blot elemzése (a., b.); metabolitok mennyiségi különbségei (LC-MS eredmények) alapján a glikolitikus folyamatok jellemzésére a laktát/malát arányt, míg az OXPHOS funkció jellemzésére (citrát/szukcinát) / (fumarát/malát) arányokat használtuk fel (c.)

A sejtvonalak terápiás érzékenységének *in vitro* vizsgálatában a gliomák esetében alkalmazható temozolomide szignifikánsan nem befolyásolta a sejtek növekedését (proliferációs tesztek). Az mTORC1-C2 gátló és dual mTOR inhibitor kezelése szignifikánsan jelentősebb proliferáció gátló hatást mutattak, mint a rapamycin és a temozolomide. A gliomák rossz prognózisa szempontjából a legnagyobb kihívást jelentő IDH vad típusú sejtvonalakat

tanulmányoztuk részletesebben, a metabolikus enzim expresszió változásokat vizsgáltuk 72 órás temozolomide és mTORI kezelésekben. Az mTORC1 aktivitással összefüggő p-S6 fehérjék mennyiségét mindegyik mTOR inhibitor csökkentette. Az mTORC2 aktivitással összefüggő p-Ser473-Akt mennyiségének emelkedését azonban, mint a rapamycin kezeléskor az S6K-függő negatív feedback mechanizmus hiányát valamennyi esetben megfigyeltük. Kimutattuk azt is, hogy a dual és mTORC1-C2 gátló kezelések esetében az mTORC2 komplex függő p-Ser473-Akt szint emelkedés a vártan megfelelően elmaradt. Az mTOR inhibitor kezelések a metabolikus alkalmazkodás eredményeként a HK2, FASN és a GLS (kivéve NVP-BEZ235 az U251-ben) mennyiségét csökkentették, míg párhuzamosan a CPT1A és ACSS2 expresszióját fokozták. Ezek az mTOR gátlás után megjelenő anyagcsere átrendeződések, az oxidációs folyamatok, a lipid- és acetátfelhasználás emelkedésére utalnak. A temozolomide kezelés eredményeink szerint nem befolyásolta sem az mTORC1, sem az mTORC2 komplexek aktivitását és metabolikus hatásai is kevésbé voltak jellegzetesek, de fontos egyedi különbségeket mutattak a sejtekben. A FASN expressziót csökkentette ugyan a temozolomide kezelés, de egyidőben a CPT1A és a GLS mennyisége nem változott. Illetve az ACSS2 expresszió fokozódása mellett a HK2 mennyisége csak az U251-ben és U373-U sejtekben csökkent temozolomide kezelést követően. Ezek az eredmények egyértelműen alátámasztják azt, hogy adott kezeléseknek jelentős egyedi metabolikus következményei vannak a vizsgált glioma sejtek túlélésekor.

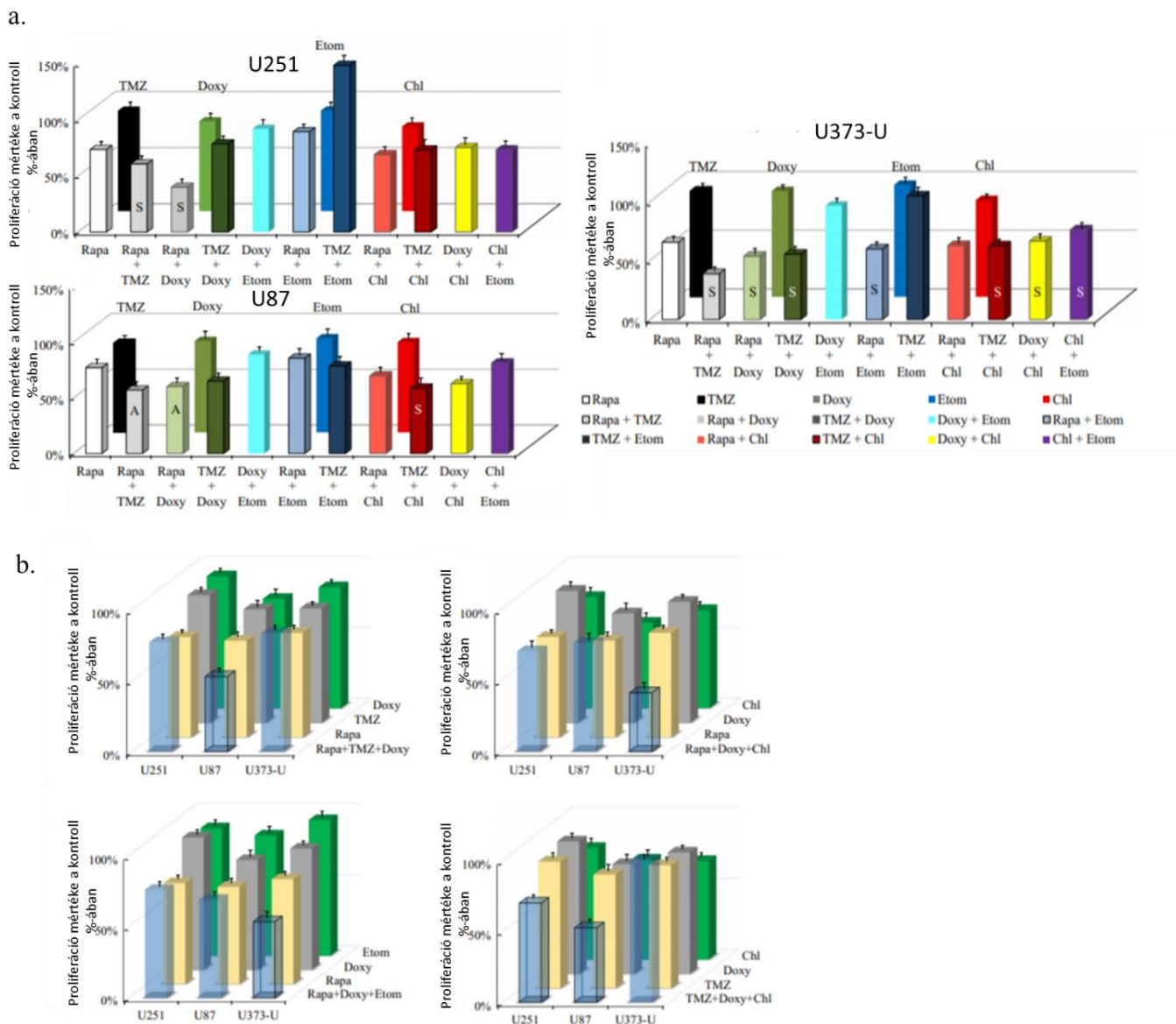
A glioma sejtek alkalmazkodási, metabolikus adaptációs lehetőségeit, képességeit jól mutatja, hogy jelentős mértékű proliferáció gátló hatást gyakorlatilag más metabolikus gátlószer monoterápiás kezelések esetében sem tapasztaltunk (GLS gátlás-BPTES, a zsírsavszintézis gátlás – etomoxir és a doxycycline). Az autofágia gátlás felszabadítása (rapamycin) vagy akár gátlása (chloroquine) okozta a legjelentősebb, de sejtvonalfüggő növekedés gátló hatásokat. Utóbbi két kezelés legjobban az U373 sejtek proliferációját gátolta. Megvizsgálva a különböző gátlószerek fehérje expresszióra gyakorolt hatásait Western blot, illetve WES technikával utóbbi sejtvonalban, az eredmények összhangban voltak a fehérjeszintű változásokkal. A BPTES, a doxycycline és az etomoxir kezelést követően jelentős fehérje vagy foszfoprotein expresszió változást az mTOR aktivitásban nem figyeltünk meg azokban kezelésekben sem, ahol AMPK aktiváció mértéke megváltozott (doxycycline és etomoxir). A temozolomide rezisztenciát is az mTORC1 aktivitás változatlansága jellemezte (csak enyhe p-mTOR és p-S6 expresszió csökkenés) mTORC2 aktivitás eltolódással (fokozódó p-Ser473-Akt és Rictor expresszió), illetve CPT1A és LC3 expresszió fokozódással. Összességében lipolitikus metabolikus eltolódást, egymással összefüggő potenciális kompenzációs anyagcsereváltozásokat figyeltünk meg, és a várt mTOR aktivitás csökkenés is megjelent (p-S6 és p-mTOR), mTORC2 aktiváció és a temozolomide esetében is tapasztalt lipolitikus kompenzáció mellett (CPT1A és LC3 expresszió emelkedés). A chloroquine monoterápia esetében teljesen ellentmondásos metabolikus változások jellemezték az U373 sejteket (változatlan glikolitikus enzim expresszió és mTORC1 aktivitás mellett p-Ser473-Akt mennyiségének emelkedése, de Rictor expresszió csökkenés és párhuzamosan lipid anyagcsereváltozások, glutaminolízis és mitokondriális COXIV expresszió csökkenés), ami jelentős metabolikus zavarra, akár az anyagcserezabályozás felborulására is utalhat, a jelentős proliferáció gátló hatásokkal is összefüggésben. (61. ábra)





**61. ábra Rapamycin, TMZ és metabolikus inhibitor kezelések proliferáció gátló hatásai high grade humán glioma sejtvonalakban.** Rapamycin – Rapa 50 ng/ml; Temozolomide – TMZ 100  $\mu$ M; Doxycycline – Doxy 10  $\mu$ M; Etomoxir – Etom 50  $\mu$ M; Chl – chloroquine 50  $\mu$ M; BPTES 10  $\mu$ M kezelések (72 h) proliferáció gátló hatásai (Alamar Blue és SRB tesztek) (felső rész).  $p < 0,01$  \*-gal jelölve; A metabolikus adaptáció mechanizmusára utaló fehérje expressziós változások kimutatása Western blot (bal oldali kép) és WES Simple technikával (jobb oldali kép) U373 glioma sejtvonalban (alsó rész)

*In vitro* eredményeinket elemezve teszteltük a metabolikus gátlók kombinációit, annak érdekében, hogy adott metabolikus alkalmazkodási útvonalak gátlásával megakadályozzuk a sejtek proliferációját és túlélését. A metabolikus gátlószereket rapamycinnel, temozolomide-dal és egymással kombináltuk 72 órás *in vitro* kísérleteinkben. A rapamycin több kombinált kezelésben is hatásosabbnak bizonyult, szenzitizálta az összes vizsgált sejtvonalat a temozolomide-dal szemben. A chloroquine anti-proliferatív hatását egy további gátlószer hozzáadása vagy a temozolomide is fokozta. Természetesen a vizsgált sejtvonalak mutattak egyedi különbségeket (pl. a rapamycin az etomoxir hatását csak az U251 és U373 sejtekben fokozta). A rapamycin+temozolomide mindhárom sejtvonalban rendkívül hatásosnak bizonyult (két sejtvonalban szinergista – U251 és U373, míg az U87 sejtekben additív hatás). Különösen hatásos új kombináció volt a doxycycline+rapamycin kezelés (62. ábra). Az U251 sejtvonalban tanulmányoztuk a kombinált kezelések mTOR aktivitást és egyéb metabolikus enzimek mennyiségét befolyásoló hatásait is, azt figyeltük meg, hogy a zsírsav-felépítésre utaló enzimexpresszió csökkent, de ezzel párhuzamosan a várt zsírsavoxidációval összefüggő CPT1A mennyisége a korábbi rezisztenciák esetén tapasztaltak alapján vártan megfelelően nem emelkedett. Megfigyeltük azt is, hogy a TMZ rezisztencia esetében tapasztalt mTORC1 aktivitást a rapamycin teljesen felfüggesztette (mTORC2 aktivitás emelkedés elmaradt) és párhuzamosan az oxidációs aktivitáshoz szükséges  $\beta$ -F1-ATP-áz mennyiség is csökkent. Ezek a megfigyeléseink arra utalnak, hogy a metabolikus folyamatok zavart szenvedtek a vizsgált kombinációk hatásában, a kompenzációs mechanizmusok nem megfelelően működtek, talán azt is mondhatjuk metabolikus káosz alakult ki a sejtekben.



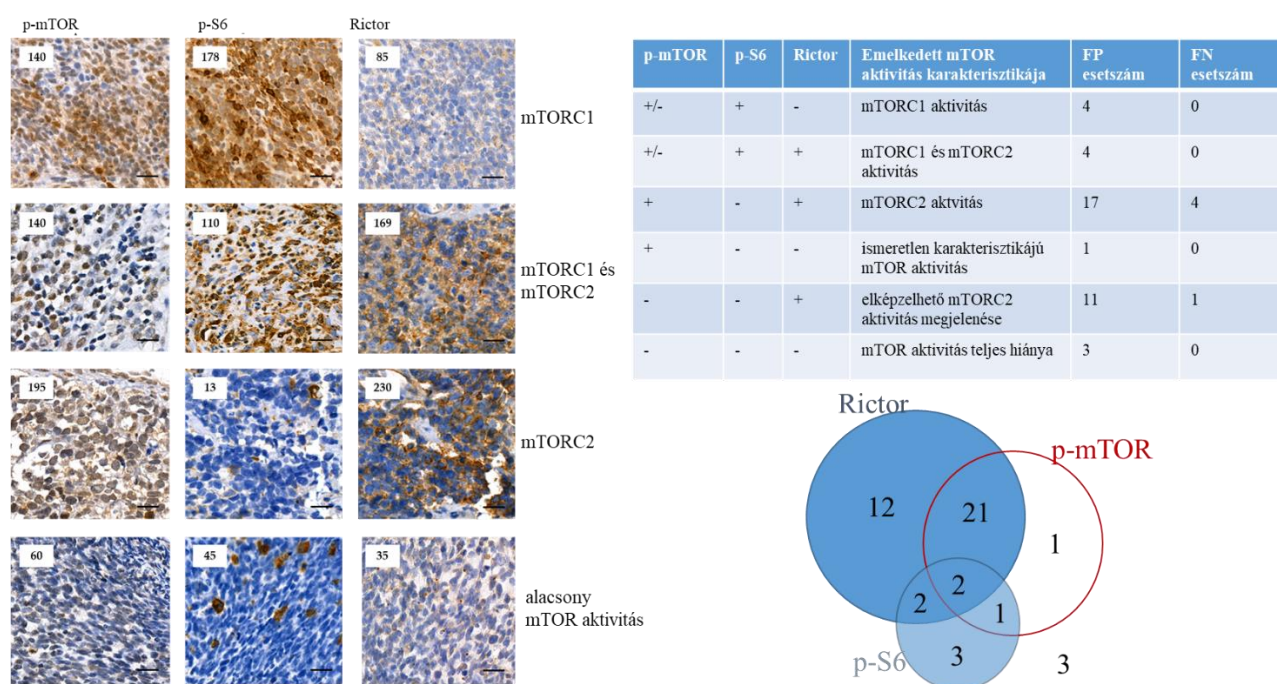
**62. ábra Metabolikus gátlószerek kombinációja mTOR gátlóval és temozolomide-al.** Alamar Blue teszt eredmények 72 h órás kombinált kezelések után (rapamycin – Rapa 50 ng/ml, temozolomide – TMZ 100  $\mu$ M, doxycycline – Doxy 10  $\mu$ M; etomoxir – Etom 50  $\mu$ M; chloroquine – Chl 50  $\mu$ M). A kombinációk additív (A) vagy szinergista (S) hatásait a CI számítás (combination index) alapján jelöltük az adott kezelésekben (a.); A leghatásosabb hármas kombinációk eredményei alapján legalább egyik kezelés hatásos volt a high grade glioma sejtvonalak *in vitro* kezelésében (b.)

#### IV.5.1.2. Gyermekkori rhabdomyosarcomák mTOR hiperaktivitása és metabolikus jellegzetességei

Preklinikai vizsgálatokban több adat is alátámaszja mTOR kináz aktivitás változások szerepét, gátlásának felhasználhatóságát a gyermekkori rhabdomyosarcomákban (RMS) (376). Az mTORC1, illetve C2 komplexekkel és aktivitásukkal összefüggő fehérjék *in situ* mennyiségéről azonban gyakorlatilag nem álltak adatok a rendelkezésünkre saját vizsgálataink megkezdéséig. Vannak egyes eredmények bizonyos mTOR aktivitással összefüggő fehérjék vizsgálatáról

(377-380), de komplex vizsgálatot, főleg kiegészítve ezeket a metabolikus enzimek változásainak vizsgálatával PhD hallgatónk munkájában mi végeztünk és közöltünk elsőként ebben az évben. Egyetlen 86 beteget érintő vizsgálatban ismert a konvencionális kemoterápiás kezelés mellett alkalmazott bevacizumab (angiogenezis gátló) és temsirolimus (mTORC1 inhibitor) kezelés hatásának vizsgálata. Ami szerint temsirolimus kombinációs kezelés esetében a betegek túlélése szignifikánsan jobb volt, mint a bevacizumab kombinációban, illetve hagyományos kezelés mellett (381).

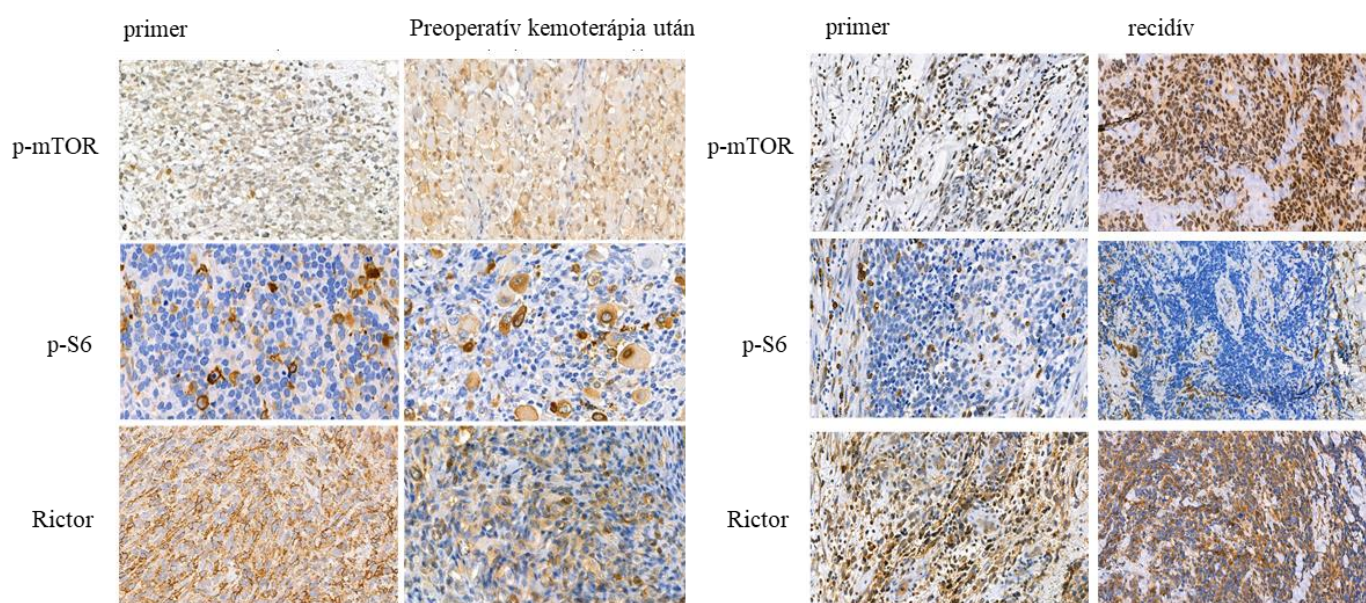
Vizsgálatunkban a p-mTOR antitest festés a minták 56 %-ában (25/45 minta) mutatott intenzív immunpozitivitást. Míg a p-S6 festés csak a minták mindössze 18%-ban (8/45 minta) adott értékelhető immunreakciót, addig az mTORC2 markerként ismert Rictor immunfestés a minták 82%-ában (37/45 minta) emelkedett mTORC2 aktivitásra hívta fel a figyelmünket. A vizsgált primer RMS-ek összesen 64%-ában (29/45 minta) mutattunk ki p-mTOR és/vagy p-S6 immunpozitivitást. mTOR aktivitásban alapvető mTORC2 dominanciát figyeltünk meg a primer RMS sejtekben (63. ábra). A *PAX-FOXO* fúzió pozitív esetekben szignifikánsan többször figyeltünk meg emelkedett Rictor expressziót (T-próba,  $t(43)=-2,41$ ,  $p=0,020$ ), mint a fúzió negatívak között.



**63. ábra Primer humán rhabdomyosarcoma esetek mTOR aktivitásának jellegzetességei.** Az ábra bal oldalán reprezentatív immunfestések mutatják be az eltérő mTOR aktivitással jellemezhető esetek IHC festését (p-mTOR, p-S6 és Rictor festések, a bal felső sarokban az adott esethez, festéshez tartozó H-score értékek is fel lettek tüntetve) (40x nagyítás); míg a jobb oldalon a táblázat és a diagram a vizsgált esetek megoszlását mutatja.

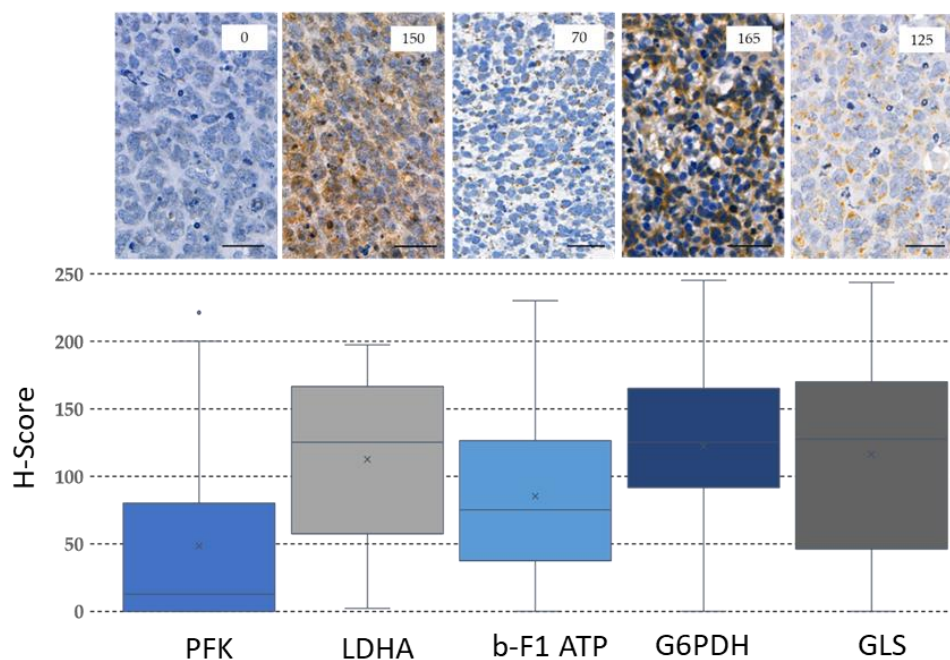
Neoadjuváns kemoterápia után eltávolított reziduális tumorból vett szövettani mintákat ( $n=9$ ) nemcsak önálló csoportként, hanem az azonos betegek primer mintáival összehasonlítva is elemeztük ( $n=8$ ). Ezek alapján az p-mTOR mennyisége változatlan maradt, a Rictor expresszió tendenciáját tekintve csökkent, míg a p-S6 H-score értékek emelkedtek a kezelést követően. Utóbbi háttérben az egyedülálló, „3+” intenzitással festődő, újra osztódásnak indult, mitotikus sejtek számának növekedését figyeltük meg. Primer, majd ezt követő recidíva utáni

tumorpárokban is elemeztük a változásokat (n=11). A p-mTOR mennyisége 7 esetben emelkedett, a p-S6 szintje gyakorlatilag nem változott, míg a Rictor 6 esetben emelkedett a recidívában, ami az mTORC2 irányú aktivitás eltolódásra utalt a recidív esetekben. Eredményeink szerint a kezelésre nem reagáló eseteket kifejezetten fokozott p-mTOR expresszió jellemezte azokhoz az esetekhez képest, ahol a recidíva kezelése után sikerült remisszióba vinni a betegeket. Ezt a tendenciózus megfigyelésünket azonban az alacsony elemszám miatt statisztikai elemzéssel nem tudtuk megerősíteni (64. ábra).



**64. ábra** Primer és preoperatív kemoterápia utáni, illetve primer és recidív rhabdomyosarcomás szöveti mintapárok mTOR aktivitását bemutató reprezentatív immunfestések. Reprezentatív p-mTOR, p-S6 és Rictor festések (40x nagyítás).

Az előbbi mTOR aktivitás változásokkal összefüggésben a tumorsejteket metabolikus átrendeződések is jellemezték, ezeket különböző metabolikusmarker festéseink elemzését követően foglaltuk össze. A glükóz hasznosításra a PFKP és LDHA (glikolízis markerek), míg az oxidatív folyamatok jelentőségére a  $\beta$ -F1-ATPáz (ATPB) enzimek vizsgálatának eredményeiből következtettünk. A minták közel felében az emelkedett LDHA, az alacsony PFK és ATPB expresszió a mitokondriális oxidatív foszforilációval szemben a Warburg-effektus jelentőségére hívja fel a figyelmet a RMS sejtekben. Spearman's rank korrelációs analízissel igazoltuk az mTOR aktivitás, az LDHA és a GLS expresszió közötti összefüggéseket. Statisztikai elemzéssel a *PAX-FOXO* fúzió pozitív minták esetében szignifikánsabb több PFK immunpozitív esetet detektáltunk, mint a fúzió negatív esetekben (Fisher-egzakt teszt,  $p=0,033$ ). A G6PDH festések alapján 82%-ban kimutatható jelentős expressziót tapasztaltunk, ami alapján a pentóz-foszfat útvonal aktivitásának jelentősége feltételezhető a primer tumorok kialakulása esetében. A GLS fehérje mennyiségének jelentős emelkedése is jellemezte a primer esetek 69%-át, ami jelentős glutamin szubsztrátfüggéssel állhat összefüggésben. Előbbiekben a kemoterápiát követően szignifikáns változást egy esetben sem tudtunk igazolni. (65. ábra)



**65. ábra Primer rhabdomyosarcoma esetek jellegzetes metabolikus enzim expressziója.** A felső részen található immunhisztokémiai festések egy reprezentatív *PAX-FOXO* fúzió negatív eset festését mutatják (jobb felső sarokban az adott H-Score van feltüntetve), az alsó részen az összes vizsgált esetet jellemző H-score értékeit ábrázoltuk. (nagyítás  $\times 50 \mu\text{M}$ )

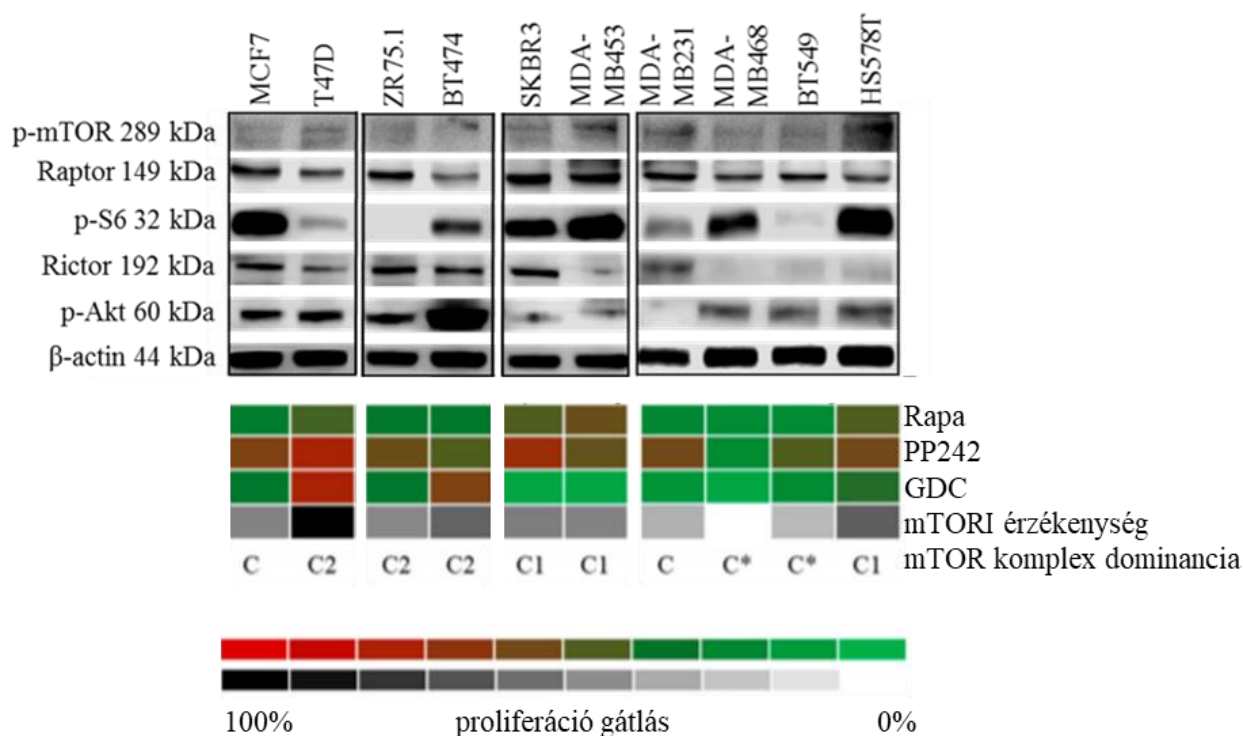
#### ***IV.5.1.3. Humán emlőcarcinomák metabolikus plaszticitása mint potenciális target***

Az emlődaganatok incidenciájának növekedése és emiatt a rossz prognózisú, terápiarezisztens daganatok még mindig nagy száma indokolja újfajta megközelítésekkel új terápiás lehetőségek feltárását.

Metabolikus és mTOR aktivitás vizsgálataink eddig bemutatott eredményei, pl. a ZR75.1 emlőcarcinoma sejtek jellegzetes kiegyensúlyozott metabolikus fenotípusának megismerése közben merült fel, hogy a metabolikus különbségek egy nagyon heterogén, de alapvetően néhány nagy molekuláris szubtípusba sorolható szolid daganattípus esetében vajon milyen metabolikus jellegzetességekkel függhetnek össze. Ennek megfelelően 10, a négy nagy emlőcarcinoma szubtípust reprezentáló sejtvonal mTOR aktivitását, metabolikus enzim expresszióját, intracelluláris metabolit mennyiségét, illetve az mTOR és más metabolikus gátlók hatásait vizsgáltuk *in vitro* kísérleteinkben.

Eredményeink alapján mTOR aktivitás szempontjából 3 csoportba osztottuk a 10 sejtvonalat: 1. mTORC1 komplex, 2. mTORC2 komplex, illetve 3. kiegyensúlyozott aktivitású sejtvonalak. Az első csoportban az alacsonyabb p-Ser473-Akt és jelentős p-S6 fehérje szintek mellett a rapamycin szignifikáns proliferáció gátló hatást mutatott, míg a specifikus Akt-kináz gátlóval (GDC) szemben rezisztensek voltak a sejtek (SKBR3, MDA-MB453 (HER2+) és HS578T (TN)). mTORC2 komplex domináns fenotípusának fogadtuk el azokat a sejtvonalakat, amelyekben a rapamycin kezelés nem vagy alig hatott, de GDC és/vagy PP242 (mTORC1/C2 komplex gátló) hatása szignifikáns volt; párhuzamosan ennek megfelelően pedig p-Ser473-Akt fehérje mennyisége magasabb volt, mint a p-S6-é ezekben a sejtvonalakban (T47D (LumA), ZR75.1 és BT474 (LumB)). A harmadik csoportba azok a rapamycin rezisztens sejtvonalak kerültek, amelyekben rapamycin érzékenységet vártunk a p-Ser473-Akt és p-S6 fehérjék mennyisége alapján, de csak PP242 érzékenységet mutattak (MCF-7, MDA-MB231, BT549)

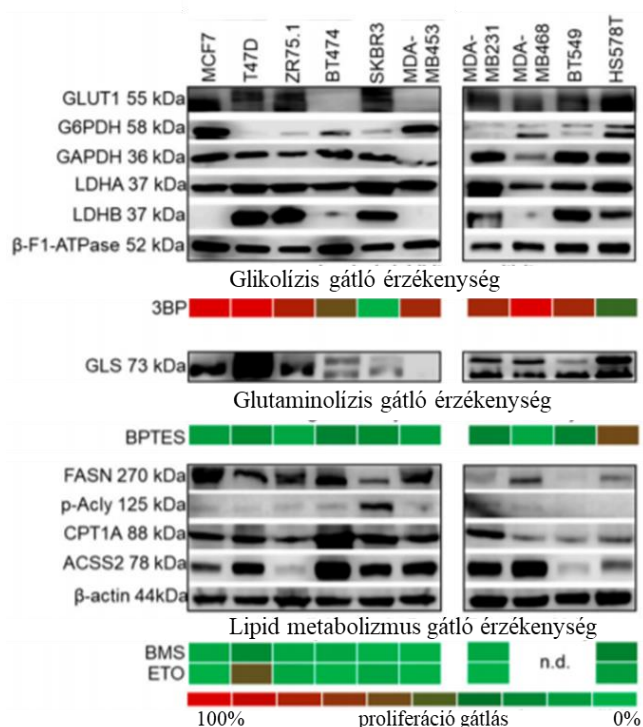
vagy egy sejt esetében még azt sem (az MDA-MB468 sejt mTOR gátló rezisztens). Ebbe a csoportba ugyan többségében TN sejtvonalak kerültek (MDA-MB231, MDA-MB468, BT549), de egy viszonylag jobb prognózisú LumA típusú sejtvonallal, az MCF-7 is ilyen jellegzetességeket mutatott (66. ábra).



**66. ábra Humán emlőcarcinoma sejtvonalak mTORC1 és C2 komplex aktivitás jellemzői, mTOR inhibitor érzékenységi adatai.** Western blot adatok két-két Luminális A (MCF7, T47D) és Luminális B (ZR75.1, BT474), illetve HER2+ (SKBR3, MDA-MB453) és négy tripla negatív sejtvonallal. 72 h-ás *in vitro* kezelések (Rapa – 50 ng/ml, a C1 / C2 PP242 – 1  $\mu$ M és az Akt inhibitor GDC – 1  $\mu$ M) proliferáció gátló hatásait hőterképpel jelöltük. Az mTOR komplexek aktivitás értékelését a fehérje expresszió és az inhibitorok hatásai alapján végeztük el (C1 – domináns mTORC1, C2 – domináns mTORC2, C – nincs komplex aktivitás dominancia, C\* – mTOR inhibitor rezisztens).

A metabolikus enzimek mennyiségi különbségei és a gátlószerek hatásai között is találtunk ugyan összefüggéseket, ezek alapján azonban különböző metabolikus fenotípusú csoportokat nem tudtunk kialakítani, mert az adatok nagyon sokfélék voltak. Minden vizsgált sejtvonallal magas LDHA fehérje expresszió jellemzett, és az LDHB mennyisége sem mutatott szignifikáns különbségeket (Western blot). A Warburg-fenotípushoz társuló egyéb enzimek megjelenése is csak kisebb eltéréseket mutatott, ami a sejtek *in vitro* környezetben jellemző glükózhasznosításával és a 3BP proliferáció gátló hatásával összefüggött. A leghatásosabb metabolikus proliferáció gátló kezelésnek a glikolízis gátló bizonyult, bár a GLUT1 és LDHA fehérjék alacsonyabb mennyisége összefüggött a kisebb mértékű gátlóhatással a BT474 és HS578T sejtekben, illetve a gyakorlatilag rezisztens SKBR3 sejtekben. A glutaminolízis gátló BPTES kevésbé hatékonyan gátolta a vizsgált sejtek növekedését, csak a HS578T kezelésekor tapasztaltunk szignifikáns proliferáció gátlást. Lehetséges magyarázatként a sejtvonallal a GLS mindkét vizsgált izoformájának expressziója magasabb volt, mint a többi TN sejtben. A lipidanyagcserével összefüggő enzimek közül a FASN inkább a nem-tripla negatív carcinomákat jellemezte, míg a CPT1A minden sejtvonallal jelentős expressziót mutatott. A legjelentősebb intertumorális különbségeket az ACSS2 (acetáthasznosítás) mennyisége mutatta, igaz az összes sejtvonallal esetében megjelent. Előbbiek ellenére a BMS (zsírsavfelépítés

gátlószere) és az etomoxir (zsírsavoxidáció gátló hatású inhibitor) alig mutatott proliferáció gátló hatásokat. Ezek alapján szubtypustól függetlenül különböző anyagcsere-útvonal átrendeződésekkel jellemezhetők az emlőcarcinoma sejtek, amit az intracelluláris metabolit koncentráció különbségek is megerősítettek (a TN sejtvonalak esetében tapasztaltuk a legnagyobb laktát/malát és Warburg/OXPHOS hányados eltéréseket) (67. ábra).



Metabolit koncentrációk (LC-MS eredmények alapján)

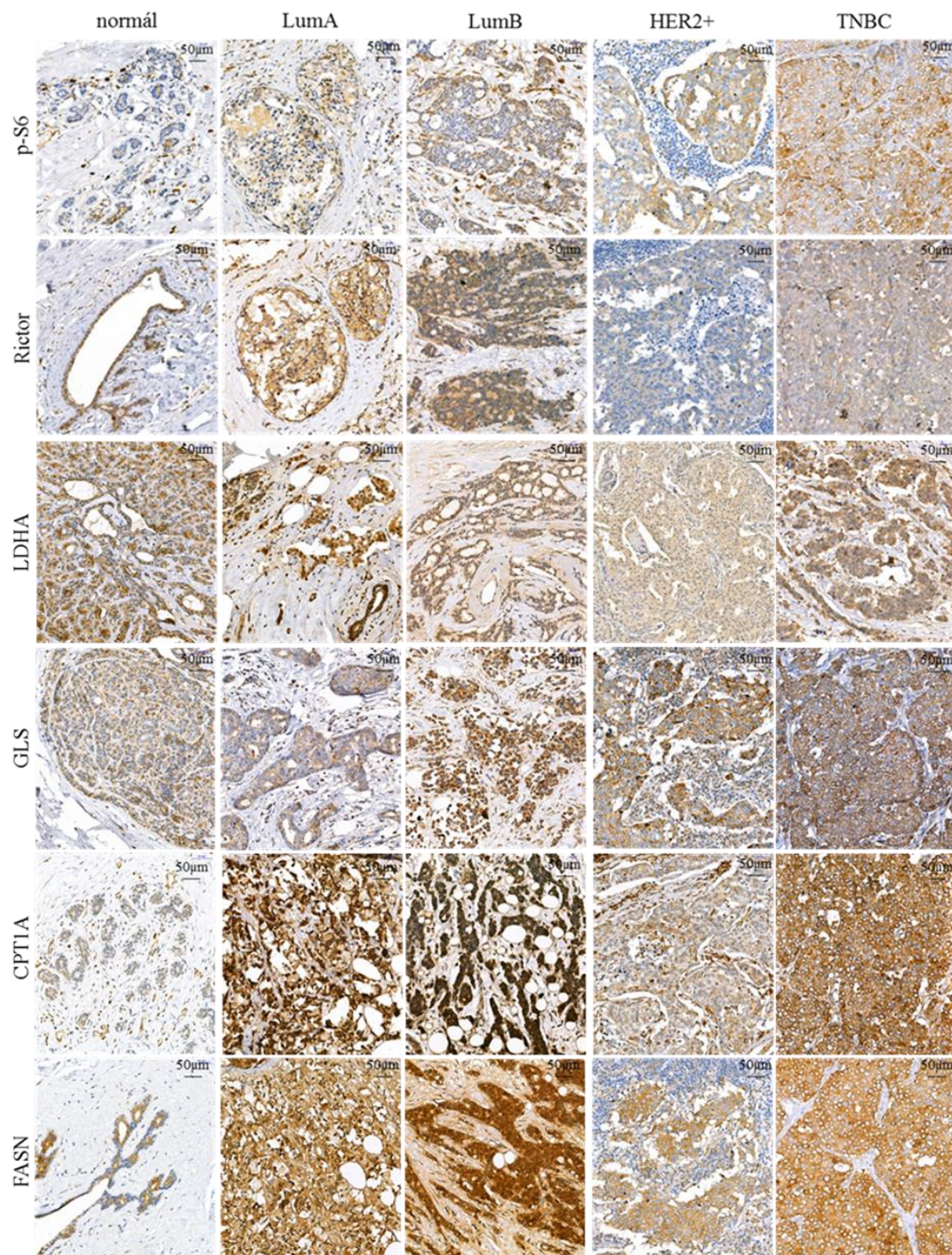
sejtvonala	szubtypus	Laktát/malát arány	Glikoitikus sorrend
HS578T	TNBC	72,2±0,04	1.
BT549	TNBC	64,7±0,03	2.
MDA-MB468	TNBC	21,2±0,03	3.
BT474	LumB	17,6±0,01	4.
T47D	LumA	14,3±0,05	5.
MDA-MB453	HER2+	10,9±0,07	6.
MDA-MB231	TNBC	10,2±0,08	7.
SKBR3	HER2+	8,9±0,06	8.
ZR75.1	LumB	5,6±0,05	9.
MCF7	LumA	1,5±0,04	10.

**67. ábra Humán emlődaganat sejtvonalak metabolikus fehérje expressziós profil és intracelluláris laktát/malát arány különbségei.** Metabolikus enzimek expresszióját Western blottal az inhibitor érzékenységeket pedig Alamar Blue és SRB proliferációs tesztekkel vizsgáltuk 72 h-s *in vitro* kezeléseket követően (glikolízis gátló 3BP – 100 µM, glutamináz gátló BPTES – 10 µM, lipid szintézis gátló BMS – 10 µM, lipid oxidáció gátló etomoxir – Etom 50 µM); az ábra jobb oldalán a sejtvonalak intracelluláris metabolit koncentráció mérései (LC-MS) alapján meghatározható laktát/malát arányokat is feltüntettem.

Előbbiek és korábbi IHC vizsgálataink alapján a következő fehérje markereket választottuk ki – p-S6, Rictor, LDHA, GLS, CPT1A, FASN – humán emlődaganatok *in situ* metabolikus jellemzéséhez (68. ábra).

A különböző festések (átlag vagy medián H-score) összehasonlító értékeléséhez minden szubtypusból azonos számú (n~20) esetet, csak invazív duktális carcinomákat válogattunk be a vizsgálatba (így a hisztológiai variációk nem zavarták az értékelést). A betegek klinikai adatai reprezentálták a nemzetközi standard kezeléseknél megfelelő várható terápiás eredményeket. A közel 100 humán biopsziás mintában kapott IHC festések értékelésének eredményei a normál szövetekhez képest az mTOR aktivitás, elsősorban mTORC1 aktivitás emelkedés jeleit, fokozott p-S6 expressziót mutattak az esetek nagy részében. A p-S6 IHC festésekben jelentős intra- és intertumoralis expressziókülönbségeket tapasztaltunk, ami ebben a festésben volt a legjellemzőbb. A normál duktális epitheliális sejtekhez hasonló, magas Rictor expressziót figyeltünk meg a daganatsejtek (medián H-score=180) jelentős részében is, ami az mTORC2 komplex jelenlétére utal a normál duktális és az emlőtumorsejtekben egyaránt. A CPT1A és FASN enzimek funkcióiban ismert eltérések alapján azt vártuk, hogy emelkedett lipidszintézis (magas FASN) esetében a zsírsavak mitokondriumba szállítása inkább gátolt (a lipoxidáció

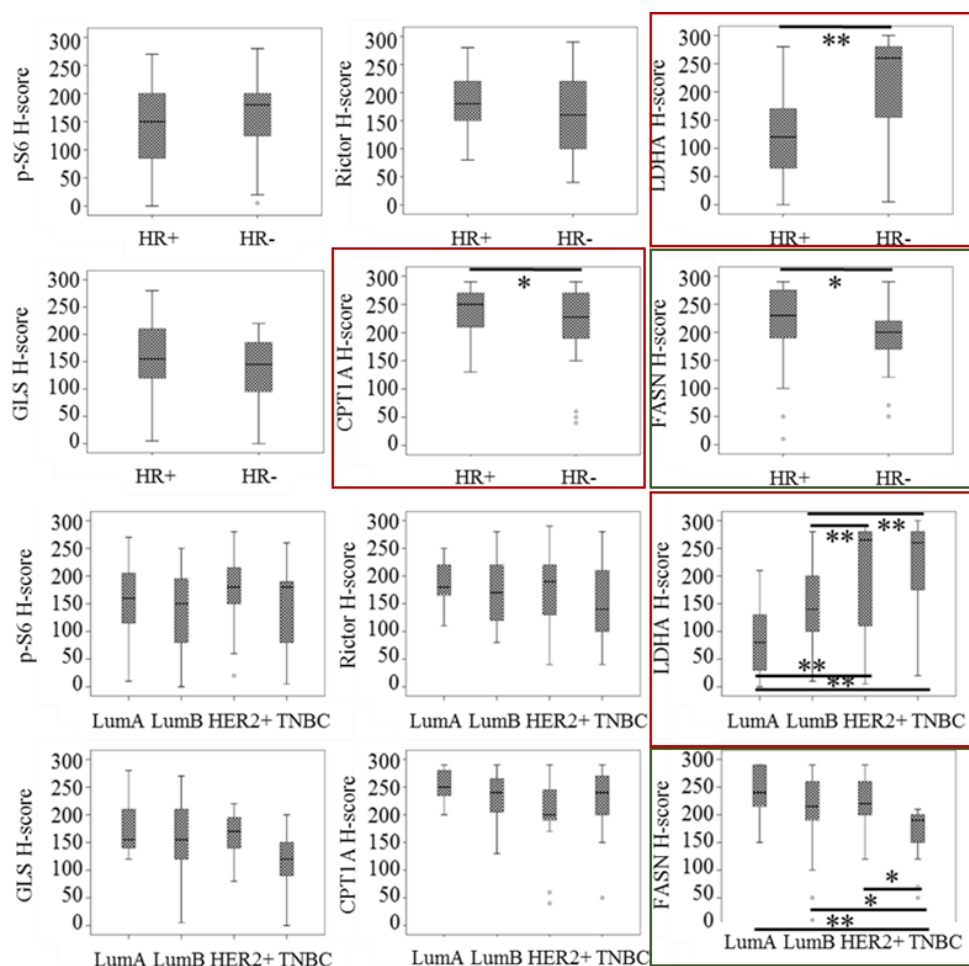
csökkenés, alacsony CPT1A) ugyanazon tumorterületeken. Ettől eltérően azonban mindkét fehérje jelentős expresszió emelkedést mutatott a tumorok többségében (H-score=240, illetve 210). Inverz festődési mintázatot (magas FASN expresszió, alacsony CPT1A vagy ennek ellenkezője) ritkán figyeltünk meg, a FASN és CPT1A overexpresszió a szövetek azonos területein, gyakorlatilag azonos sejtekben jelent meg az esetek ~60%-ában. A lipidadyagcsere enzimek fokozott expressziója mellett homogén citoplazmatikus LDHA és mitokondriális fehérjékre jellemző granuláris GLS expresszió jellemezte a normál és a tumorszöveteket.



**68. ábra** Humán emlőcarcinomás esetek reprezentatív immunhisztokémiai festései mTOR aktivitás és metabolikus markerekkel. Anti-p-S6, anti-Rictor Anti-LDHA, anti-GLS, anti-FASN, anti-CPT1A immunfestések (DAB-barna reakció, hematoxilin háttérfestéssekl, a nagyítás feltüntetve).



Előbbieket kiegészítve átlag H-score értékek alapján szubtípusoktól független közepes mértékű mTOR aktivitás (p-S6 és Rictor) és GLS expressziós szint jellemző *in situ* az emlőcarcinomás esetekben. A Warburg-glikolízissel összefüggő LDHA és a lipidanyagcsere jellemzéséhez kiválasztott CPT1A és FASN magas H-score értékek szignifikáns összefüggést mutattak a HR-negatív státusszal. A CPT1A fehérje mennyiségének emelkedése ugyan általánosan jellemezte az összes esetet, összehasonlítva azonban a szubtípusokat, relatíve alacsonyabb CPT1A és FASN expressziós score volt jellemző a HER2+ és TN esetekben, mint a HR negatív LumA és LumB csoportban (69. ábra).

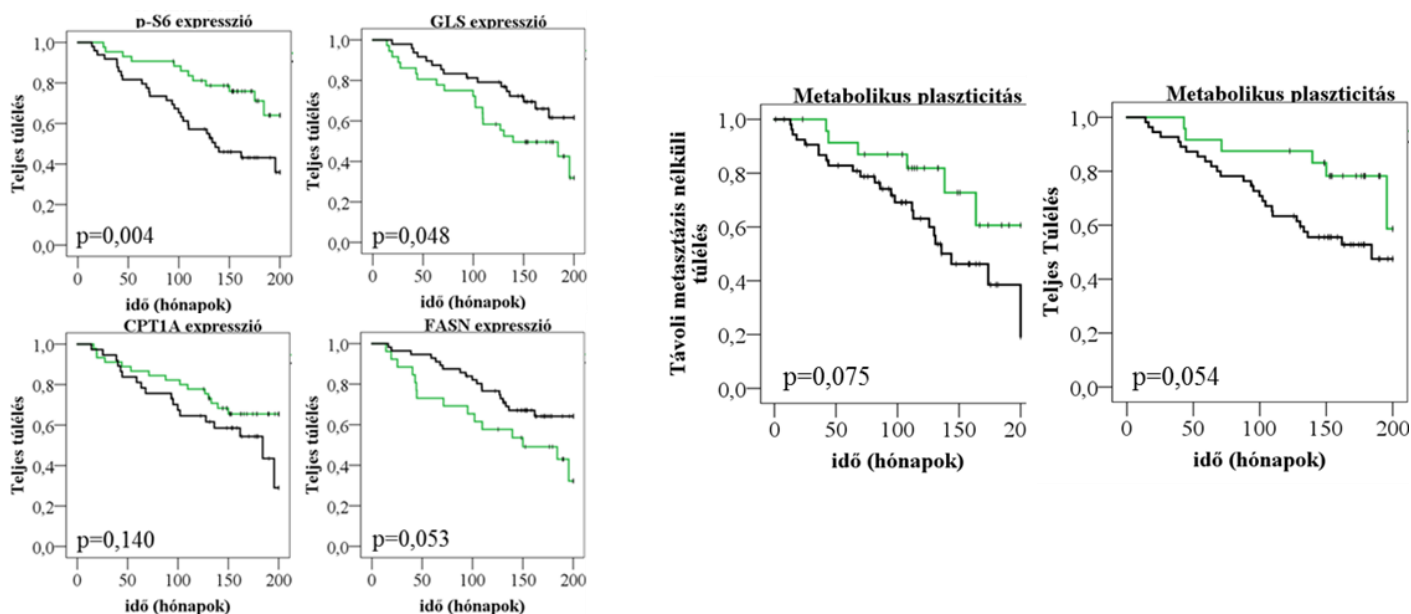


**69. ábra Humán emlődaganatok mTOR és metabolikus enzim festéseinek H-score értékelés eredményei, hormonreceptor és szubtípusfüggő expresszió különbségek.** Átlag H-score értékek és szórásuk \*\*p < 0,01, \* p < 0,05. Színes keretekkel kiemeltük a lényegesebb összefüggéseket mutató ábrákat.

A klinikai és túlélési adatok (távoli metasztázismentes túlélés és teljes túlélés) és az IHC értékelésekben kapott adott fehérjék esetében meghatározott IHC H-score értékek elemzését elvégezve a betegeket festésenként alacsony és magas H-score értékű csoportokba osztottuk. Ehhez a cut-off értéket a medián H-score érték alapján határoztuk meg (p-S6, Rictor, LDHA, GLS 150, illetve CPT1A és FASN 200). A magas p-S6 H-score értékek szignifikánsan összefüggtek a betegek magasabb életkorával, míg az LDHA H-score értékek a szubtípusokkal, HR-státusszal, grade-del és stage-el. A magas p-S6 H-score szignifikáns összefüggést mutatott szubtípustól függetlenül a távoli metasztázis megjelenéssel, a rövidebb metasztázismentes és teljes túléléssel. Meglepő összefüggést mutatott elemzésünk a GLS expresszió és a hosszútávú teljes túlélés között, a magasabb H-score értékek mellett szignifikánsan jobb túlélési

eredményeket figyelhettünk meg – ennek persze technikai oka is lehet, az IHC-vel használható ellenanyag ugyanis a két funkcióiban eltérő GLS izoforma elkülönítésére nem alkalmas. Tendenciában jelentős különbséget mutatott még a CPT1A és FASN H-score értékek elemzése is, mutatta a korábban említett inverz jelleget, az alacsonyabb CPT1A H-score a jobb, míg az alacsonyabb FASN H-score a rosszabb prognózissal függött össze.

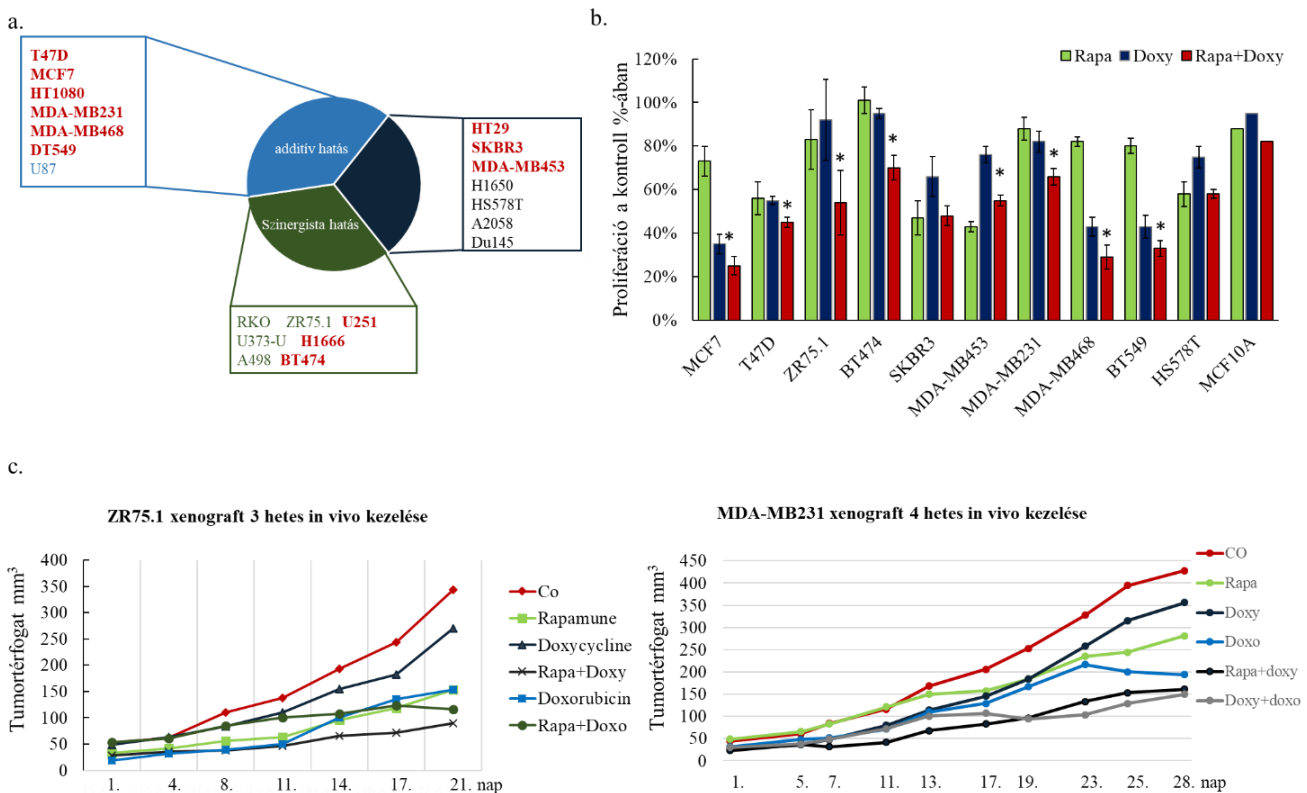
A legérdekesebb eredményeket abban az elemzésben kaptuk, ahol kombináltuk az mTOR aktivitás és a többi metabolikus útvonal markereinek értékelését a metabolikus alkalmazkodási képesség megítélése érdekében. Magas metabolikus plaszticitásúnak tekintettük azokat az eseteket, amelyeknél a mTOR aktivitás mellett még legalább két másik metabolikus enzim H-score értéke magasnak bizonyult. Ezek alapján nem szignifikánsan, de jelentős mértékben (trend) összefügg a jó metabolikus alkalmazkodási képesség, a vizsgált daganatok metabolikus plaszticitása a rossz prognózissal, a rövidebb távoli metasztázismentes és teljes túléléssel. Eredményeink szerint a magas p-S6 H-score és még két további enzim magas H-score értéke (LDHA, GLS, FASN vagy CPT1A), még jó prognózisú HR+ szubtypusok esetében is felhívhatja a figyelmet a rossz prognózisra, a beteg szoros követésére, míg fordított esetben pl. TN emlődaganatokban az alacsony mTOR aktivitás, a metabolikus plaszticitás hiánya biztató, jó prognózisra utaló jel lehet. További statisztikai elemzésekkel a tényezők rizikó meghatározó szerepét vizsgáltuk. COX regresszió és multivariancia analízis (életkor, szubtypus, HR státusz, grade és stage figyelembe vétele) szerint magas p-S6 H-score és a meghatározható metabolikus alkalmazkodó képesség alkalmas rizikó becslésre (p-S6 – RR=2,528; 95% CI 1,278-5,00; p=0,008, plaszticitási score – RR=2,48; 95% CI 1,021-6,021; p=0,045) (70. ábra).



**70. ábra** Kaplan-Meier elemzések eredményei, egyes metabolikus enzimek expresszió különbségeinek, illetve a metabolikus plaszticitás (magas mTOR aktivitás és minimum még két magas metabolikus enzim expresszió értékelés) metasztázismentes, illetve teljes túléléssel kimutatható összefüggései. A medián H-score-ok figyelembevételével 150-es H-score cut-off érték mellett a p-S6, GLS, míg 200-as H-score cut-off érték mellett a FASN és CPT1A expresszió alapján alacsony (zöld) és magas (fekete) expresszióval jellemezhető csoportokat vizsgáltunk a bal oldali analízisekben, illetve zöld színnel az alacsony, míg fekete színnel a magas metabolikus plaszticitású csoportokat jelöltük a jobb oldali két ábrán.

#### IV.5.2. A metabolikus targetek felhasználásának lehetőségei: rapamycin+doxycycline kezelések daganatnövekedést gátló hatása *in vitro* és *in vivo*

A metabolikus targetek kombinált felhasználásának jelentőségét a legújabb eredményeink mutatják be legszemléletesebben. A gliomák esetében tesztelt *in vitro* kombinációs kezelések közül a várhatóan kevésbé súlyos mellékhatásokkal járó rapamycin és doxycycline kezelés *in vitro* hatásait egy többféle sejtvonalat magába foglaló vizsgálatban tanulmányoztuk. Eredményeink szerint a sejtvonalak jelentős részében additív vagy szinergista proliferáció gátló hatásokat figyelhetünk meg, sőt a sejtvonalak 2/3-ában a proliferációgátlás mértéke 50%-nál is magasabb már 72 órát követően. A vizsgált sejtvonalak között a 10 emlőcarcinoma sejtvonal is szerepelt. Mindezek *in vivo* jelentőségének megerősítése érdekében további xenograft vizsgálatokat is kezdtünk a HER2+ és HR+ ZR75.1 illetve a tripla negatív MDA-MB231 esetében. Ebben a vizsgálatsorozatban összehasonlítottuk a kezelések eredményeit a doxorubicin hatásaival is. A rapamycin+doxycycline, rapamycin+doxorubicin, illetve a doxycycline+doxorubicin kombinációk is szignifikánsan jelentős tumornövekedés gátló hatásokat mutattak. A sokféle szolid daganat, illetve egyes lymphomák esetében a rapamycin+doxycycline kombináció vagy más metabolikus szerekekkel kombinált kezelések (pl. metformin vagy glutaminolízis gátlók) tumortípustól független, de az adott sejtek metabolikus tulajdonságától függő hatásainak kiaknázása így talán újabb lehetőségeket teremt a rezisztencia áttörésében (71. ábra).



#### 71. ábra Rapamycin és doxycycline metabolikus hatásainak tumornövekedés gátló hatásai *in vitro* és *in vivo*.

A legkülönbözőbb humán sejtvonalak esetében a rapamycin+doxycycline kezelés proliferáció gátló hatásainak összefoglalása (pirossal jelöltük azokat a sejtvonalakat, ahol a kombináció több mint 50%-kal csökkentette a sejtek növekedését *in vitro*, illetve a diagram mutatja, hogy a vizsgált sejtvonalak 2/3-a esetében a kezelés additív vagy szinergista hatású volt (a.); 10 emlőcarcinoma sejtvonal *in vitro* rapamycin+doxycycline kezelésének *in vitro* proliferációs eredményei a kontroll tenyészetek proliferációjának %-ában \* $p < 0,05$  (b.); két humán emlőcarcinoma

sejtvonal xenograftjainak kezelése Rapamune, doxycycline és doxorubicin kombinációkkal (Rapamune 3 mg/kg, doxorubicin 2 mg/kg és doxycycline 200 mg/kg) tumortérfogat  $\pi/6 \times (2 \times (\text{kisebb átmérő} + \text{nagyobb átmérő})/3)^3$

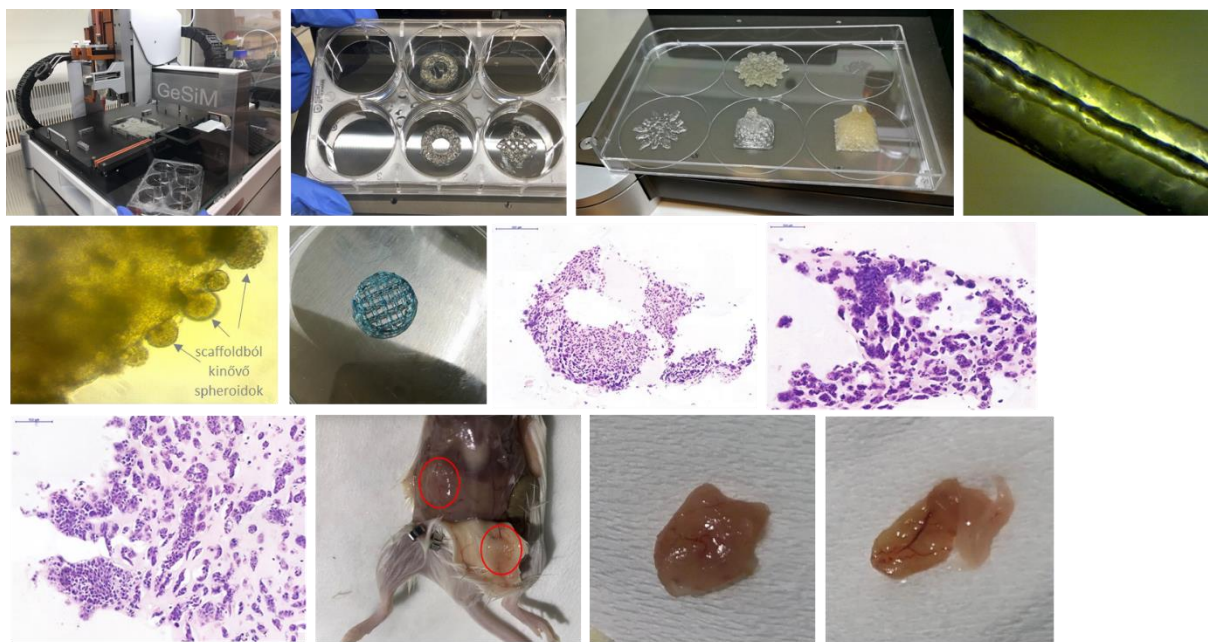
A bemutatott eredményeink, illetve a munkacsoportunk egyéb megkezdett vizsgálatait is azt támasztják alá, hogy mind a hagyományos kemoterápiás, mind a célzott kezelések esetében a metabolikus változásoknak is szerepe van a daganatsejtek túlélésében, a későbbi relapszusok és terápia rezisztencia kialakulásában. Ezeknek a folyamatoknak a megismerése és terápiai célzása pedig javíthatja a jelenlegi kezelések eredményeit a jövőben.

#### **IV.6. Modellrendszerek metabolikus állapotot befolyásoló hatásának szerepe daganatbiológiai kísérletekben**

A legújabb munkáinkból csak néhány érdekes újdonságot mutatnék be, egyrészt, mert igen fontos szerepük lehet a jövőben, másrészt mert jelentőségük szorosan kapcsolódik a jelenleg általam vezetett munkacsoport, a Tumormetabolizmus munkacsoport fejlesztéséhez, kutatásaihoz, a tumorok metabolikus viselkedésének tanulmányozásához. Ebben a munkánkban különböző *in vitro* és *in vivo* tumormodellek növekedési, rezisztencia és metabolikus tulajdonságait hasonlítjuk össze annak érdekében, hogy megtalálhassunk olyan eddig fel nem ismert vagy elhanyagolt metabolikus különbségeket és mechanizmusokat, amelyek *in vivo*, háromdimenziós tumorszövetekben járulnak hozzá a daganatok alkalmazkodásához, progressziójához, terápia rezisztenciájához.

##### **IV.6.1. 3D Bionyomtási laboregység létrehozása, a technológia beállítása, humán emlőcarcinoma biotinták létrehozása és 3D „szövetek” nyomtatása, xenotranszplantálása**

Az elmúlt évben sikerült megvalósítani egy új 3D Bionyomtási egység létrehozását az általam vezetett sejt- és szövettenyésztő laboratóriumban, az eszközök beszerzéséhez szükséges anyagi forrást pályázat útján nyertük a Semmelweis Egyetem és Pázmány Péter Katolikus Egyetem Bionika Kar közös Nemzeti Bionika pályázatában (ED\_17-1-2017-0009 NKFI Nemzeti Bionika Program). Ennek segítségével biotinta recepteket optimalizáltunk – elsősorban emlőcarcinoma sejtekből – szövetszerű struktúrák nyomtatásához. 3 sejtvonal esetében már optimalizált biotinta receptekkel és az első nyomtatott raftok növekedésének jellemzésével, adott kezelések, pl. a rapamycin kezelés hatásvizsgálatával is rendelkezünk. Össze tudtuk hasonlítani a 2D tenyészetek, 3D spheroidok és a nyomtatott raftok növekedését, ezek segítségével meg tudjuk kezdeni adott, korábban már monitorozott metabolikus tényezők, enzimek expresszió különbségeinek vizsgálatát is. Eredményeink szerint a 3D spheroid kultúrában tartott sejtvonalak metabolikus és proliferációs, illetve *in vivo* raftképző tulajdonságai is megváltoznak, ami adott kezelésekkel szembeni válaszreakciókban is különbségeket eredményezhet. Fontos eredményünk, hogy olyan nyomtatható raftokat hoztunk létre amelyek *in vivo* xenotranszplantálhatók SCID egerekbe, ez a kidolgozott technológia alkalmas lehet műtéti tumorminták esetében *patient-derived* xenograftok létrehozására és tesztelésére is. Ilyen technológiák tesztelése és fejlesztése zajlik jelenleg munkatársaim segítségével, de természetesen utóbbi vizsgálatainkat előbb egér tumormodellel, majd ezt követően etikai engedélyek beszerzése után kezdhetjük meg humán tumorok esetében (72. ábra).



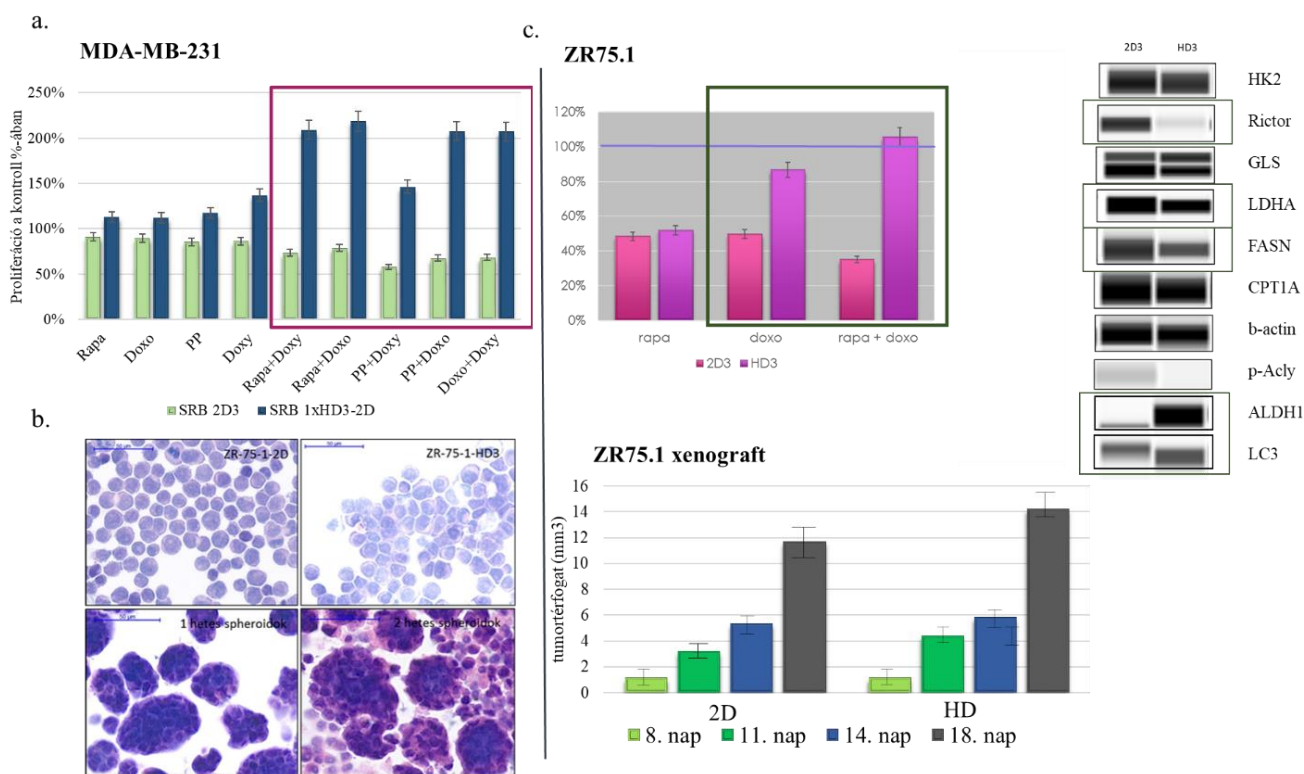
72. ábra Az intézetbe telepített 3D bionyomató, az első nyomtatott vázak (felső sor), *in vitro* növekvő nyomtatott szövetszerű struktúrák (HE festett metszetek), csővázak szerkezetek, *in vitro* és *in vivo* növekedésnek indult raftok képei.

#### IV.6.2. 2D, 3D spheroid, illetve 3D bionyomatott szövetek, különböző xenograftok növekedésének és egyes metabolikus tulajdonságainak jellemzése

Az előbbi 3D tenyésztési lehetőség mellett 3D spheroid tenyészetek és 2D tenyészetek eddig elvégzett összehasonlító elemzéseai alátámasztják, hogy 3D tenyésztési körülmények között metabolikus eltérések jellemzik a sejteket. Ezek az eltérések pedig nemcsak a terápiás válasz eltérésekhez vezetnek, hanem a rezisztencia kialakulása mellett tumorössejszerű sejtek szelekcióját eredményezhetik szöveti környezetben. Eddigi eredményeink emlőcarcinoma sejtekben alátámasztják a metabolikus, proliferáció gátló és egyes terápiás szerekekkel szembeni eltérő érzékenységet a vizsgált modellekben. Mind az MDA-MD231 tripla negatív, mind a ZR75.1 sejtekben kimutatható a 3D spheroid tenyészetekben a terápiás érzékenység változás. Az MDA-MB231 sejtek esetében 2D tenyészetekben igen hatásos kombinált kezelések hatása, míg a ZR75.1 sejtekben a doxorubicin érzékenység is csökkent 3D spheroid tenyészetekben. A ZR75.1 sejtekben a metabolikus változásokat enzim expresszió és metabolit szinten is kimutattuk, a Warburg versus OXPHOS fentípus megjelenésével párhuzamosan a laktát mennyisége és LDHA és mTORC2 komplex expressziója is csökkent, míg a citrátköri metabolitok mennyisége emelkedett. Előbbi változásokkal párhuzamosan az LC3, ALDH, GLS expresszió fokozódott, a CPT1A expresszió pedig nem csökkent. Mindezek a változások magyarázhatják a sejtek állapotának megváltozását, ami a kialakuló doxorubicin és doxorubicin+rapamycin rezisztencia magyarázata is lehet. Ugyanezzel összefügghet, hogy a 2D tenyészetekből indított xenograftok növekedési üteme lassabb *in vivo* a xenotranszplantáció első 18 napjában, mint a 3D spheroid tenyészetekből indított xenograftok esetében (73. ábra).

Ezeket a vizsgálatunkat 3D bionyomatott szövetszerű struktúrák, egyéb xenograft és humán tumorszövet minták hasonló jellemzéseivel egészítjük ki a jövőben, amelynek végén

olyan komplex összehasonlításokat tehetünk, amik segítenek megtalálni azokat a metabolikus tényezőket, amelyek megértése elvezethet ahhoz, hogy: a. megérthessük a hiányosságait az eddigi 2D-s sejtenyészetekben végzett terápiás és célpont validálási, tumorevolúciós kísérleteknek; illetve b. segíthetnek, hogy ezeket a metabolikus tényezőket figyelembe véve jobb célpontokat keressünk és jobb prediktív modelleket dolgozhassunk ki a jövőben.



**73. ábra Emlőcarcinoma sejtvonalak metabolikus és terápiás érzékenység változásai 3D spheroid tenyésztés mellett.** Az MDA-MB231 sejtek 3 napos spheroid tenyésztéseiben szelektált új 2D sejtenyészet (1xHD3-2D) jelentős rezisztencia változást mutatott a különböző kombinált kezelésekkel szemben (SRB teszt vizsgálatok 72 h mTOR inhibitor – Rapa, rapamycin 50 ng/ml; PP242, 1  $\mu$ M; Doxo - doxorubicin 50 nM; Doxy - doxycycline 50 nM és ezek kombinációi esetében) (a.), A ZR75.1 sejtvonal különböző tenyésztéseinek hematoxilin eosin festett sejtjei – 2D, háromnapos 3D tenyészet (HD3) citospinjei a felső sorban, kompakt spheroid citospin festése az alsó sorban (b.); A ZR75.1 sejtvonal érzékenység változása 3D spheroid tenyésztetben (HD3), a sejtek doxorubicin és doxorubicin+rapamycin kezeléssel szembeni érzékenysége szignifikánsan csökkent 1 hetes 3D spheroid kulturákban, míg párhuzamosan raftképző képességük felgyorsult (gyorsabb növekedés *in vivo*) és egyes metabolikus enzimek expresszió változása (WES Simple eredmények) is alátámasztotta a bekövetkezett metabolikus eltolódásokat (c.)

## V. Megbeszélés

### V.1. Nem onkoterápiás kezelések daganat ellenes off-target hatásai

Napjainkban számos nem onkológiai kezelés esetében tárjuk fel azok potenciális anti-tumorális hatását. Abban az esetben, ha ezeknek megismerjük daganatos célpontjait, illetve a szabályozó hálózatokban okozott hatásait, akkor olyan lehetőségek nyílhatnak meg a kezelési stratégiák kidolgozásában, amelyek javíthatják a hatékonyságot, enyhíthetik a mellékhatásokat, jobb életminőséget biztosíthatnak a személyreszabott kezelésekben.

Az elmúlt évtized hasonlóan jelentős eredményeinek sorát nyitottuk meg saját, a mevastatin és egyes immunszuppresszív szerek hatásait érintő munkáink adataival még a kétezres évek elején.

Jellemezve a mevastatin myeloma sejtek proliferációját gátló és apoptózist indukáló hatásait elsők között hívtuk fel a figyelmet a koleszterincsökkentők pleiotróp hatásai mellett a tumornövekedést is gátló hatásaikra. Azóta a statinok számos antitumorális hatását jellemezték további daganatok, pl. melanomák, emlőcarcinomák, hasnyálmirigy daganatok, fibrosarcomák, gliomák, neuroblastomák és más lymphomák esetében is (382). Az is egyre nyilvánvalóbb, hogy a statinok a kemoterápiás kezelések hatékonyságát sok esetben fokozni képesek. Retrospektív vizsgálatok sora igazolta, hogy a statinok csökkentik a daganatok kialakulásának rizikóját vagy akár a daganatos halálozást (305, 383-386). A legújabb adatok szerint a daganatok mTOR hiperaktivitásával is összefüggő, SREBP aktivitás, lipid szintetikus változások emelkedése eredményezi a mevalonát útvonal és szterol metabolizmus gének beleértve a HMG-CoA reductáz (HMGCR) és az LDL illetve receptorának (LDLR) expresszió fokozódását. Előbbi enzimek funkciói támogatják a daganatsejtek keletkezéséhez szükséges lipidszintézist, többek között ennek megzavarásával fejtik ki a statinok antitumorális hatásait. Emlődaganatok esetében egyre több klinikai fázisvizsgálat támasztja alá pl., hogy az ER negativitás vagy magasabb vimentin, alacsonyabb E-cadherin expresszió (epitheliális-mesenchymális transzformáció) mellett az emlődaganatok szenzitívek a fluvastatinnal szemben (387-389). Számos további adat sugallja, hogy a jelátviteli útvonalak szabályozási zavarával összefüggő metabolikus változások pl. a mevalonát útvonalon a farnesyl pyrophosphate – mint poszttranszlációs preniláció szubsztrát – és a RAS onkogén funkciózavar vagy akár a P53 mutáció is fontos tényező lehet a statin-szenzitivitásban. Világos sejtes vesedaganatokban a *VHL* gén funkcióvesztő mutációja, illetve az RHO kináz (ROCK) szignál változások szintén összefügghetnek a statin szenzitivitással. Míg egyes myeloma szubtypusok esetében a t(4,14) transzlokáció lehet a statin szenzitivitás markere. Ugyan mindezen potenciális szenzitivitási markerek validálása még klinikai vizsgálatokban szükséges (390-393), azt azonban mindenképpen alátámasztják az elmúlt évtized eredményei, hogy a statinok alkalmazása egyes daganatok, így az általunk is vizsgált myelomák esetében is, potenciális, addicionális alternatív terápiás készítmény lehet.

Az az érdekes kettősség, hogy az immunszuppresszív állapotok a daganat incidenciát növelik, de egyes immunszuppresszív kezelések köztük a mycophenolát mofetil (mycophenolsav), illetve az mTOR gátló rapamycin lymphoma és egyéb daganatnövekedés gátló hatású, napjainkban már szintén megkérdőjelezhetetlen (394-397). Saját eredményeinkben lymphoma sejtekben igazoltuk a mycophenolsav és a rapamycin származékok lymphoma növekedést csökkentő hatásait *in vitro* és *in vivo*. A mycophenolát mofetil esetében az elmúlt időszakban közzismertté vált a kezelés hatékonysága nemcsak

lymphoid, hanem számos egyéb malignitás esetében is (epitheloid daganatok, colon-, tüdőcarcinomák vagy akár gliomák, osteosarcomák - 398-402). Az elmúlt években igazolódott, hogy a mycophenolsav általunk is jellemzett sejtciklus blokkoló hatásai sokrétűek, a CyclinA/CDK2, az Aurora kinázokon, illetve a P53, valamint a p27 és a p21 ciklin dependens kináz inhibitorokon keresztül érvényesülnek a sejtciklus gátlásában (403-405).

A rapalógok nemcsak antitumorális, hanem poszttranszplantációs immunszuppressziós felhasználását támogatják azok az eredményeink, amelyek egyrészt bemutatták a magyarországi vesetranszplantációk után kialakult különböző daganatok incidenciáját és típus szerinti megoszlását; másrészt egyértelműen igazolták az ischaemiás vesében a sejtek tacrolimus mediált mTOR aktivitás fokozódását. Ugyanebben a munkánkban a transzplantáció talaján kialakuló vesedaganatok egyértelmű mTORC2 hiperaktivitásának igazolásával megerősítettük azokat az eredményeinket, amely szerint a hagyományos calcineurin alapú immunszuppresszióknak a daganatos rizikóban direkt mTOR aktivitást emelő szerepe lehet. Mindez hangsúlyozza azoknak a jelenlegi transzplantációs immunszuppressziós trendeknek a jelentőségét is, amelyekben a rapalóg konverzió, illetve a tacrolimus mellé, majd helyett mielőbb mTOR gátló adása javasolt (397).

A rapalógok daganatnövekedést gátló hatásait fázisvizsgálatok sora teszteli. Bár monoterápiában a kezelés nem elég hatásos, de egyes kombinációs kezelések vitathatatlanul sikeresek lehetnek. Igaz a betegek egyéni metabolikus jellegzetességei nagyban befolyásolhatják a terápia mellékhatásainak tolerálhatóságát, így a klinikusok részéről ezek csillapítása, menedzselése fontos része a kezelésnek. Nem véletlen, hogy a temsirolimus és az everolimus több daganattípus törzskönyvezett gyógyszereként is megjelenik, és egyéni engedélyeztetéssel számos esetben alkalmazható terápiaerezisztens relapszusok esetében (pl. AML, előrehaladott vesecarcinoma, neuroendokrin tumorok, hasnyálmirigy-, emésztőrendszeri-, tüdődaganatok, visszatérő HR+ emlődaganatok, sarcomák - 264).

A dolgozatban bemutatott eredmények, és azok a vizsgálatok, amelyek a metabolikus támodáspontú kezelések potenciális tumorelles hatásaira mutattak példákat jól szemléltetik azt a nézetet, amely szerint a daganatok heterogenitását, a nem daganatos és daganatos sejtek sokszintű szimbiózisát és szabályozott rendszerét megzavarva hogyan támogatható a jelenlegi kezelések sikere.

## **V.2. Daganatok mTOR hiperaktivitása mint potenciális terápiai target, szenitizáló hatások**

Azt, hogy az mTOR hiperaktivitás fontos és számos tumortípus esetében jól targetálható változás több daganat esetében írtuk le (13. Táblázat). Számos esetben elsők között szolgáltatunk adatokat munkáinkban a két komplex aktivitásáról, így az mTORC2 komplex hiperaktivitás jellemzéséről és annak prognosztikai összefüggéseiről.

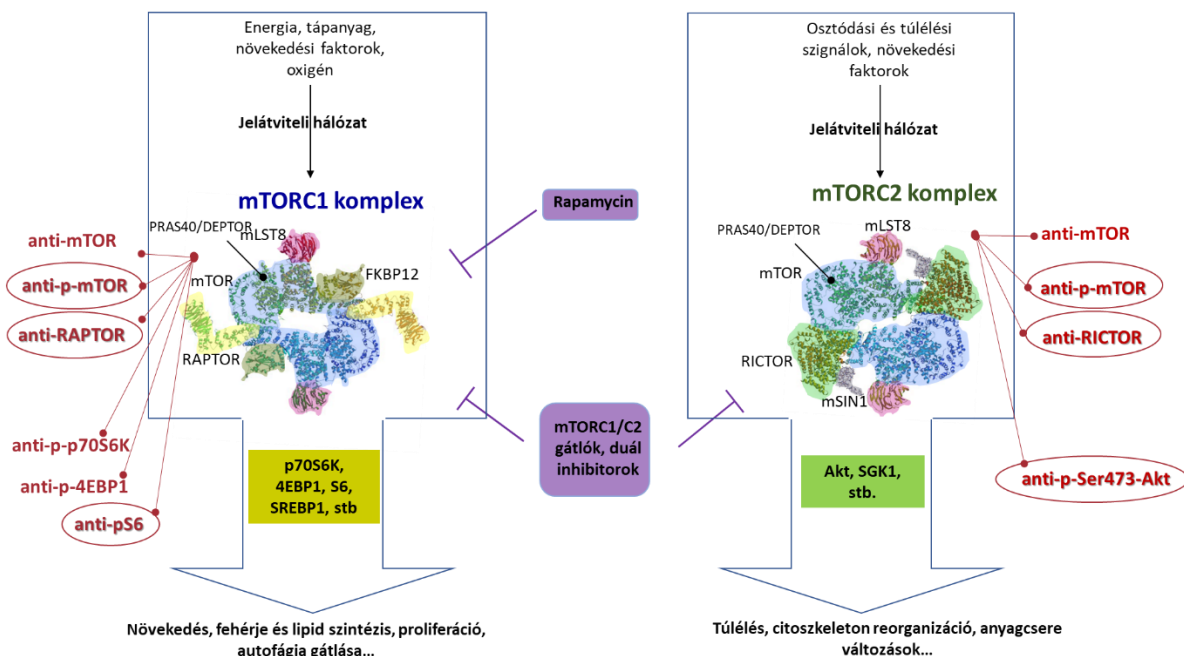
Saját eredményeink alátámasztották, nemcsak a magas mTOR aktivitás, hanem ezen belül az mTORC2 komplex hiperaktivitás prognosztikai jelentőségét. Szinte valamennyi daganattípus esetében megfigyeltük és kimutattuk az mTORC2 aktivitás megjelenésének prognosztikai kockázatát. Egyértelműen igazoltuk lymphomák, DLBCL-ek, coloncarcinomák, különböző tüdődaganatok vagy egyes ritka daganatok mint a rhabdomyosarcomák esetében is az mTORC2 aktivitás és a rossz prognózis összefüggéseit.



### 13. Táblázat Munkacsoportunk közreműködésével jellemzett mTOR aktivitás különbségek a különböző daganattípusokban

daganattípus	mTOR hiperaktivitási adat	közlemény
emlőcarcinoma	p-S6 (mTORC1 hiperaktivitás) szignifikánsan összefügg a rosszabb prognózissal	Petővári Cancers 2020
rhabdomyosarcoma	az esetek 80%-ban magas mTORC2 aktivitás	Felkai Cancers 2020
kissejtes tüdődaganatok	Rictor amplifikáció és mTORC2 aktivitás összefüggése	Krencz Human Pathol 2019.
lymphangiioleiomyomatosis	mTORC1 és mTORC2 komplex hiperaktivitás	Krencz Human Pathol 2018.
tüdő adenocarcinoma	mTORC2 aktivitás emelkedés és az agyi metasztázisok összefüggése	Krencz Human Pathol 2017.
glioma	vad IDH, jelentősebb mTORC2 aktivitás	Petővári Cancer Cell Int 2018.
fibrosarcoma	mTORC1 aktivitás szerepe az onkometabolittermelésben	Hujber Exp Clin Cancer Res 2017
coloncarcinoma	mTORC2 hiperaktivitás – rossz prognózis, mTOR-gátlás EGFR1 és ciszplatin szenzitizáló hatásai	Sticz J Clin Pathol 2017.; Pathol Onco Res 2019
primer központi idegrendszeri lymphoma	mTOR aktivitás független és PASK függő p-S6 expresszió	Marosvári J Neuropathol Exp Neurol 2018
akut lymphoid leukémia	mTOR hiperaktivitás prognosztikai jelző értéke	Nemes PLOSOne 2013
lymphomák, HL	mTOR aktivitás, mTORC1 aktivitás	Márk BMC Cancer 2013
GIST	mTOR hiperaktivitás	Sápi Diagn Mol Pathol 2011
medulloblastoma	mTOR hiperaktivitás	Pócza Pathol Oncol Res 2014
DLBCL	mTORC2 hiperaktivitás	Sebestyén Modern Pathol 2012; Rajnai Virchows 2014

Mindezen munkáink közben egy olyan immunhisztokémia vizsgálati marker panelt és megfelelő H-score értékelést állítottunk be, amelyek segítségével az mTOR aktivitás *in situ* szöveti jellegzetességei meghatározhatók biopsziás mintákban. Ennek segítségével az mTOR kináz targetáláshoz az inhibitorok kiválasztásához is segítséget tudunk nyújtani adott betegnek esetében (74. ábra).

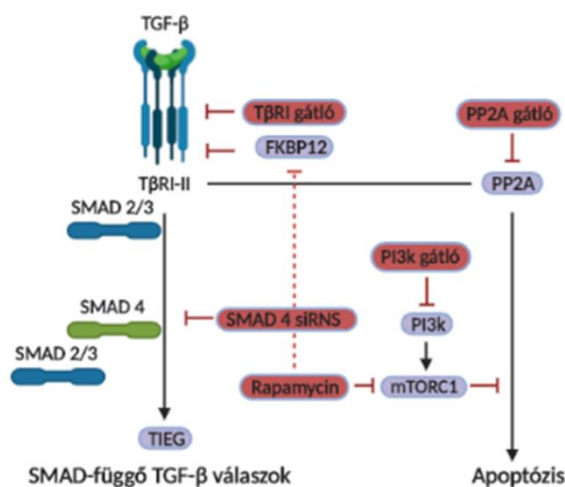


**74. ábra** Vizsgálataink alapján az mTOR aktivitás karakterizálására alkalmas immunhisztokémiai marker panel. Az ábrán bordó betűvel, illetve kerettel jelölt ellenanyagok javasolhatók mTOR aktivitás vizsgálat *in situ* karakterizálásakor. Amennyiben csak korlátozott számú festés végezhető el, akkor tumorszövet függően a p-mTOR antitest festés mellé, az mTORC1 aktivitás monitorozásához leggyakrabban a p-S6 (ez a legmegbízhatóbb paraffinos metszeteken) az mTORC2 esetében pedig a Rictor és lehetőség szerint a p-Ser473-Akt festés javasolható elsősorban.

Többször segítettük az előbbieik alkalmazásával adott betegek tumorszövetének mTOR aktivitás meghatározását, majd ezek alapján rapalóg terápiák megkezdésének engedélyezése történt pl. Hodgkin lymphomás, illetve egyéb ritka gyermekkori daganatos betegek recidív terápiaerezisztens tumorainak kezelésében (406-407).

Felhívtuk a figyelmet arra, hogy ilyen esetekben akár dual mTOR inhibitor vagy újgenerációs mTOR inhibitor kezelések segíthetnek a terápiaerezisztencia áttörésében. Számos esetben *in vitro* és *in vivo* kísérletünkben igazoltuk az mTOR gátlás várható terápiás jelentőségét. Kimutattuk az mTOR inhibitor kezelések *in vitro* és *in vivo* TGF $\beta$ , gamma-szekretáz inhibitor szenitizáló hatásait lymphomákban. Eredményeinknek jelentőségét egyre több vizsgálat erősíti meg. Nem meglepő, hogy több mTOR inhibitor fejlesztése és tesztelése zajlik jelenleg is a legkülönbözőbb daganattípusokban (214, 408-411).

Lymphomák széleskörű vizsgálataiban a normál szabályozókkal, így a TGF $\beta$  apoptotikus hatásaival szemben kialakuló rezisztencia molekuláris mechanizmusait feltárva egyértelműen kimutattuk, hogy az mTOR hiperaktivitásnak fontosabb szerepe van a rezisztencia mechanizmusban, mint a TGF $\beta$  receptor Smad útvonal elemek egyes daganatok esetében bekövetkező kiesésének (Smad silencing kísérletek), illetve, hogy mTOR gátló kezeléssel számos rezisztencia mechanizmus függeszthető fel különböző lymphoma vagy leukémia sejtekben. Saját vizsgálatainkban feltártuk a TGF $\beta$  indukált apoptózisban a foszfatázok szerepét, illetve egyértelműen igazoltuk a TGF $\beta$  indukált apoptózis rezisztenciában az alternatív jelátviteli útvonal és mTOR hiperaktivitás jelentőségét (75. ábra).



**75. ábra TGF $\beta$  indukált apoptózis lymphomákban.** A TGF $\beta$  receptor aktivációja után Smad útvonaltól független PP2A aktivitás függő módon jön létre apoptózis lymphoma sejtekben. Párhuzamosan a PI3K vagy mTORC1 gátló hatások segítik az apoptózis kialakulását. Ennek megfelelően a TGF $\beta$  rezisztencia mechanizmusban, a PI3K/Akt/mTOR-hiperaktivációnak van jelentősége.

Ezekkel összefüggésben tudtuk kimutatni a rapamycin TGF $\beta$  érzékenyítő hatásait, illetve más szabályozó hatások pl. egyes daganatok esetében szintén fontos onkogén hatású Notch hiperaktiváció mTOR gátlással felfüggeszthetőségét. A TGF $\beta$  daganatbiológiai hatásainak értékelésében azonban fontos szem előtt tartanunk, hogy a legújabb adatok szerint a TGF $\beta$  mediált EMT folyamatai egyes daganatokban, így pl. az emlődaganatok progressziójában is nagy szerepet kaphatnak. Így az mTOR aktivitás változások és azok targetálása, illetve ennek szerepe a TGF $\beta$  daganatbiológiai hatásainak megváltozásában egyre nagyobb jelentőséget kaphat (412). Mindezek és saját eredményeink egyértelműen kiemelik, hogy a TGF $\beta$  kétarcú daganatbiológiai szerepének egyik kulcseleme lehet a TGF $\beta$  hatásával párhuzamosan megfigyelhető mTOR aktivitás változásnak (413-416).

A rapalógok többféle szenzitizáló hatását nemcsak lymphomákban, hanem más pl. colon-, tüdő- és emlőcarcinomák vagy akár gliomák EGFR inhibitor, illetve kemoterápia szenzitizálásában is jellemeztük. Ezen eredmények jelentőségét ma már az egyre több esetben megismert epigenetikai szabályozási zavarok (417, 418) is megerősítik, amelyek közül mi az mTOR aktivitással kapcsolatosan néhány miR expresszió változását írtuk le ALL-ekben. Eredményünk jelentőségét mások vizsgálatai is alátámasztották. Az Nrf2 transzkripciós faktor kemorezisztenciában játszott szerepét és ezzel összefüggésben az adott miRNS-ek expresszió emelkedését és mTOR hiperaktivációt figyeltek meg. Utóbbit az adott miR-ek csendesítésével felfüggesztették és a tumorsejtekben a spontán apoptózis ráta emelkedést írtak le (419).

Az mTOR hiperaktivitással összefüggésben több esetben vizsgáltuk különböző mTOR inhibitorok hatásait. Megerősítettük, hogy Rictor (mTORC2 komplex vázfehérje) expresszió esetén, rapamycin rezisztencia léphet fel. mTORC1 gátlás mellett (potenciális negatív visszacsatolás esetében) mTORC2 aktivitás emelkedés, valamint a p-Ser473-Akt mennyiségének növekedése is igazolható. Előbbiek esetében az ATP kompetitív mTOR kináz gátlók vagy más duál inhibitorok jóval hatékonyabbak lehetnek. Ezek alapján a jelenleg zajló újgenerációs inhibitorok vagy a vistusertib alkalmazása pl. az általunk is vizsgált Rictor amplifikált mTORC2 pozitív tüdődaganatok, mTORC2 hiperaktivitást mutató LAM és ER+ terápia rezisztens emlődaganatok esetében is hatásosabb lehet (420-422). Kimutattuk az mTOR gátló kezelések esetében a ciszplatin vagy EGFR inhibitor, illetve a temozolomide érzékenyítő hatásait. Ezek az eredményeink és mások hasonló vizsgálatai is hozzájárultak, ahhoz, hogy jelenleg több esetben (pl. colon-, tüdőcarcinomák és gliomák) zajlanak mTOR inhibitor kombinációs fázis vizsgálatok az előbbi kemoterápiás szerekekkel, kisebb-nagyobb sikerekkel (423-427).

Az mTOR aktivitás változásokkal összefüggésben egyre több eredmény, köztük saját eredményeink is mutatták, hogy a metabolikus jellegzetességekkel, azok változásaival összefüggő a tumorok mTOR aktivitás emelkedése. Ebben az évtizedben egyre több közleményben jelent meg, hogy nemcsak a jelátviteli szabályozási zavarok, hanem a tápanyag és mikrokörnyezeti stresszhatások kivédésében, a metabolikus adaptációban is szerepe lehet az mTOR aktivitásnak. Az mTOR – mint egy kulcsszabályozó elem a jelátviteli hálózatban – a sejt aktuális állapotának megfelelően segíti a metabolikus átrendeződéseket, a lebontó és felépítő folyamatok egyensúlyát a sejt túlélése érdekében (428-431). Vizsgálataink legújabb eredményei ezen hatásokkal és jelentőségükkel vannak összefüggésben.

### **V. 3. Az mTOR hiperaktivitás és a metabolikus szabályozási változások, a metabolikus plaszticitás összefüggései**

Metabolikus vizsgálataink kezdetén nagyon sok új módszert állítottunk be: többek között Jeney professzor tapasztalatai, Tretter professzor munkacsoportjának és az ELTE-MTA TTK Műszercentrumából Szoboszlai Norbert, Ozohanics Olivér és Drahos László, majd Mészáros Katalin segítségével. Az újonnan beállított különböző módszerek segítik: a. adott tumorsejtek tápanyag és szubsztrát preferenciáinak meghatározását (<sup>14</sup>C izotóp jelzett cukor vagy acetát hozzáadása után mérhető a kilégzett CO<sub>2</sub> izotóp tartalma akár sejtvonalak, akár tumoros állatok esetében is); b. adott szubsztrátok mellett a daganatsejtek oxigénfogyasztásának illetve az extracelluláris pH változásának mérését (Seahorse módszerrel); c. a legfontosabb Warburg-fenotípust jellemző laktát mellett, számos citrátköri metabolit és onkometabolit mennyiségének

meghatározását LC-MS mérésekkel a sejtekből, azok felülúszójából, extracelluláris vezikuláiból, szérumból, szövetekből vagy pl. *C. elegans* modellkísérleteknél egyes egyedekből is; d. stabil izotóp jelzett szubsztrátok (glükóz, glutamin és acetát) és speciális, definiált tápanyagtartalmú médiumok felhasználásával a sejtek metabolikus folyamatainak jellemzését (a beépülő izotóp jelzett szénatomok adott metabolitokban megjelenő mennyiségének követése, jelzett metabolitok arányának meghatározása); e. a legkülönbözőbb metabolikus enzimek expresszió változásának követését fehérjeszinten többféle technika segítségével (Western blot, WES Simple – jelenleg már több mint 40 metabolikus enzim vizsgálata); f. az *in situ* metabolikus heterogenitás jellemzését az előbbi enzimek immunhisztokémiai vizsgálataival. Mindezeknek a módszereknek a legújabb metabolikus jellemzésekben egyre nagyobb szerep jut, egyes vizsgálatok az intracelluláris metabolit-koncentrációk változásának *in situ* térképezését is elképzelhetőnek tartják a közeljövőben MALDI imaging technikával (432-435). Saját vizsgálatainkat *in situ* egyelőre fehérje expressziós mintázat jellemzésekkel végezzük. A metabolitok kimutatását *in situ* szöveti metszetekben nem tudtuk még megkezdni, egyes külföldi csoportok azonban már ilyen vizsgálatokkal is próbálkoznak. Természetesen ezekben az esetekben inkább olyan metabolitok vagy fehérjék vizsgálata elképzelhető, amelyek nagyobb mennyiségben fordulnak elő adott daganatszövetekben. Az onkometabolitok lesznek erre alkalmasak például a jövőben, gliomák esetében a 2-HG lokális kimutatása az egyik ilyen már jelenleg is tesztelés alatt álló lehetőség (435-437).

Vizsgálataink legérdekesebb eredményeit azokkal a metabolikus mérésekkel mutattuk ki, amelyekben adott tumorsejtek tápanyaghasznosítási különbségeit elemeztük. IDH mutáns gliomák esetében a 2-HG termelés forrásait azonosítva kimutattuk, hogy glutamin mellett az acetát, illetve a lipidanyagcsere változások mint források is hozzájárulhatnak a gliomák bioenergetikai egyensúlyának megteremtéséhez. Ennek kapcsán figyeltünk fel elsőként a gliomák esetében az emelkedett GABA oxidáció glioma sejtek proliferációját támogató szerepére, illetve ezzel összefüggésben a humán gliomák jellegzetes SSADH overexpressziójára. Utóbbiak adataink szerint akár potenciális metabolikus targetek is lehetnek ebben az igen rossz prognózisú daganattípusban. Ezeknek az eredményeinknek a felhasználása, illetve a glioma sejtek metabolikus alkalmazkodásában a különböző szubsztrátok szerepének vizsgálata a jövőbeni terápiás próbálkozások esetében új lehetőségeket jelentenek és egyre nagyobb érdeklődésre számíthatnak (438-440).

Az onkometabolitok LC-MS mérésének beállításával jelenleg nemcsak a laktát, de a 2-HG, illetve akár a fumarát-, szukcinátszint emelkedését is ki tudjuk mutatni humán szérum mintákban vagy akár liquorban is, ami segíthet az onkometabolit termeléssel összefüggő mutáns tumorsejtek mennyiségének követésében, valamint a recidív tumorok megjelenésének kimutatásában is (pl. IDH mutáns AML, glioma, SDH mutáns paragangliomák) (440-444). Az onkometabolitok termelése kapcsán elsőként igazoltuk az mTOR aktivitás szerepét a laktát és a 2-HG termelésben, amiben elsősorban az mTOR aktivitásfüggő GLS és LDHA termelésnek van jelentősége. Azóta nemcsak a laktát és 2-HG, hanem más onkometabolitok termelésében is igazolták az mTOR aktivitás jelentőségét, illetve több közleményben beszámolnak a mi eredményeiket megerősítő, az mTOR gátlók onkometabolit termelést csökkentő direkt hatásairól is. Mindez az mTOR gátlók egyéb terápiás hatásai között, a metabolikus adaptáció mechanizmusok összehangoló szerepét sugallja, így mTOR gátló kezelések esetében előbbi folyamatok felborulásának lehet terápiás szerepe a jövőben (445-446).

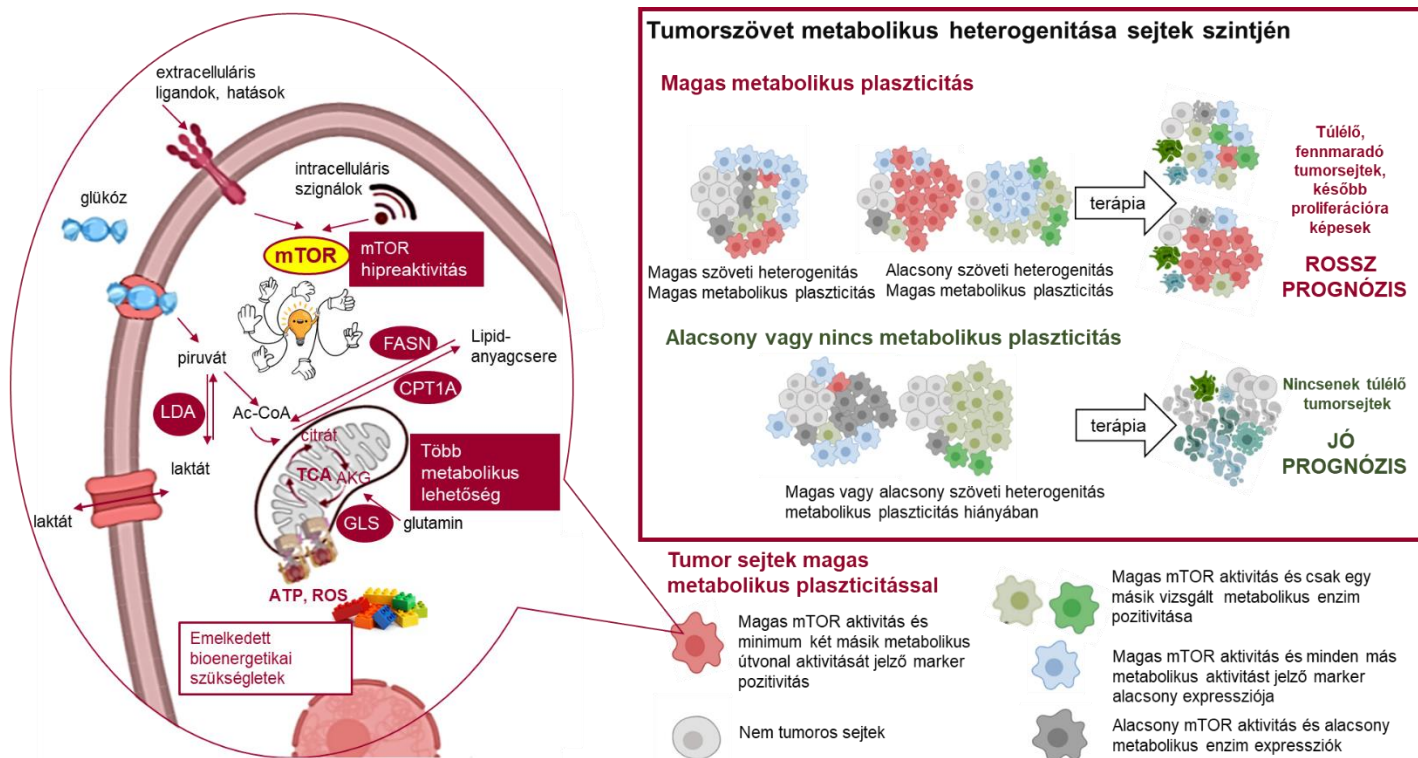
Azt, hogy az mTOR hiperaktivitással összefüggésben szöveti szinten a legkülönbözőbb metabolikus útvonalak elérhetőek lehetnek adott tumorszövetekben, többféle daganat esetében is sikerült igazolnunk (elsőként a ritka LAM-ban, majd gliomák, rhabdomyosarcomák és emlődaganatok esetében is). Ezekben az esetekben az mTOR aktivitás *in situ* vizsgálatával párhuzamosan alapvető metabolikus folyamatok enzimeinek expresszió vizsgálatát végeztük el, és természetesen a markerek kiválasztásánál igyekeztünk *in vitro* vizsgálataink eredményeit is felhasználva minél többféle metabolikus folyamat markereit kiválasztani és elemezni. IHC vizsgálataink során több mint 30 enzim expresszió vizsgálata után elemeztük azok szöveti megoszlását, *in situ* expressziós mintázatát. Végül általában adott folyamatonként legalább 2-3 marker tesztelése után 10-nél kevesebb markert választottunk ki. Adott tumortípusok elemzését ezek segítségével végeztük el, a legmegfelelőbb mTOR aktivitás (pl. p-mTOR, p-S6, Rictor és p-Ser473-Akt), glikolízis (GLUT1, HK2, PFK, valamint az LDHA, ami a Warburg-glikolízis markere) és glutaminolízis markert (GLS), illetve egyéb, szubsztrát felhasználás támogatóként az MCT1-et, az ACSS2-t, az SSADH-t, vagy a lipidanyagcsere jellemzésére a CPT1A-t, a FASN-t, a p-Acly-t, az oxidációs kapacitás markereként pedig a  $\beta$ -F1-ATP-át vizsgáljuk rendszeresen.

A rhabdomyosarcomás esetek metabolikus jellemzésekor az mTOR aktivitás karakterizálását elvégezve a primer mintáink több mint 50%-ában magas p-mTOR expressziót, ezenfelül a Rictor fokozott expresszióját detektáltuk a vizsgált primer minták 82 %-ában elsősorban a fúzió pozitív mintákban. Előbbinek jelentősége lehet az mTOR inhibitor kezelés megválasztásában: a rapalógokkal szemben inkább duál vagy mTORC1 és C2 gátlók javasolható alkalmazásában. Mindezt összevetve a szövetek további metabolikus jellemzőivel és az érintett enzimek festődési mintázatával, a recidív mintákban a fokozott mTORC2 aktivitás lehet az egyik oka annak, hogy a preklinikum ígéretes eredményei ellenére az mTORC1 gátlók a betegek kezelésében még nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket (447-450). Bár a legújabb adatok a temsirolimus kombinált kezeléseket esetében az eseménymentes túlélésben mutattak némi javulást, ugyanakkor a teljes túlélésben egyelőre nem (381). Eredményeink jelentőségét megerősíti egy rhabdomyosarcomás gyermek esete is. Ahol a legújabb vizsgálatainkban kimutatott Rictor overexpresszió, mTORC2 komplex emelkedett mennyisége magyarázatot adhat a Rapamune kezelés sikertelenségére. Klinikopatológiai vizsgálataink tapasztalatait figyelembe véve mindenképpen hangsúlyoznunk kell, hogy az mTOR státusz részletes vizsgálatát javasoljuk minden mTOR inhibitor kezelés megkezdése előtt. Az intenzív szöveti Rictor IHC festődés jelezheti a rapalóg kezeléssel szembeni rezisztenciát, duál inhibitor szükségességét. Előbbiekén túl eredményeink az mTORC2 komplex aktivitásával összefüggésben, a metabolikus adaptációban fontos egyéb enzimek mennyiségének változásait és jelentőségét is kiemelik. A glükózhasznosítást RMS sejtekben a PFK gyenge festődése, míg az LDHA jelentős expressziója jellemezte, sőt utóbbi a recidív mintákban még fokozódott is. Egyértelmű korreláció igazolódott az mTOR kináz aktivitás fokozódása és az LDHA expresszió között. Ezzel fordított összefüggést mutatva viszont a  $\beta$ -F1-ATPáz alacsony mennyisége az oxidatív foszforiláció elhanyagolható szerepét mutatta RMS sejtek anyagcseréjében. Eredményeink azt is igazolták, hogy az mTOR aktivitás támogatja a glutaminolízis gének transzkripcióját, aminek fontos szerepe lehet az intenzív proliferáció mellett megjelenő reaktív oxigén gyökök semlegesítésében is. Nem véletlen, hogy más vizsgálatok is mutattak glutaminfüggőséget RMS sejtvonalak esetében (451, 452).

Mindezeknek az adatoknak klinikai jelentősége lehet új terápiás célpontok azonosításában. Glikolízis gátlók (WZB117, silibin, 2-deoxiglukóz, 3-bromopiruvátsav, PFK158, TLN-232, ionidamine), illetve LDHA gátlók (FX11, GNE-140, FX11, galloflavin), pentóz-foszfát útvonal gátlók (PGMI-004A), GLS és glutamin transzporter gátlók (BPTEs, a Telaglenastat (CB-839) és a compound 968 L- $\gamma$ -glutamil-p-nitroanilide, AOA transzamináz inhibitor) preklinikai vizsgálata zajlik (452, 453) egyes rhabdomyosarcomák vagy más sarcomák esetében. Telaglenastatnak a szarkómák proliferációjára kifejlesztett gátló hatását igazolták már *in vivo* is (454). Ezek a terápiás fejlesztésekkel kapcsolatos eredmények a vizsgálatainkban leírt enzimexpresszió változások fényében, valóban új terápiás célpontokat nyújthatnak a RMS-ban a jövőben.

A legérdekesebb, a tumorok metabolikus szimbiózisát és a progresszióban a metabolikus plaszticitás jelentőségét igazoló eredményeinket egyik utolsó vizsgálatunkban írtuk le. Az emlődaganatok szubtípus független, igen magas mTOR aktivitását és ezzel párhuzamosan egyes metabolikus útvonalak potenciális elérhetőségét jellemeztük a betegek progressziójával összefüggésben. Immunhisztokémiai elemzésünk eredményei megerősítették például a Warburg-effektus prognosztikai szerepét (magasabb LDHA H-score összefüggést mutatott a HR státusszal és a szubtípuseloszlással is). Sajnos ennek ellenére az elmúlt évtizedben a Warburg-effektus, glikolízis, monokarboxilát-transzporterek gátlása a vizsgált szerek hatástalansága (feltételezhető metabolikus alkalmazkodás miatt) vagy mellékhatás/toxicitás miatt nem hoztak igazán átütő eredményeket (455). Emlődaganatok esetében is vannak kisebb-nagyobb ellentmondások az mTOR, a p-mTOR és más mTOR aktivitási markerek értékelésében és prognosztikai jelentőségében (456). Ezért fontosak azok az adataink, amelyben a magas mTORC1 aktivitás (p-S6) és a rosszabb prognózis, a rövidebb túlélés között mutattunk ki összefüggéseket. Hangsúlyozni kell, hogy hasonlóan a szarkómákhoz, az emlődaganatok esetében is megfelelő biomarkerek kiválasztása lenne szükséges az mTOR gátlók alkalmazásában (195). A rapalógok különféle metabolikus hatásait, az *in vitro* vizsgálatainkban is megfigyelt mTOR aktivitás metabolikus adaptációban játszott szerepét, más metabolikus gátlószer kombinált alkalmazását érdemes megfontolni a jövőben. Ezt a lehetőséget alátámasztják azok az eredmények, amelyek más rosszindulatú daganatokban, gliomákban és hepatocelluláris daganatokban az OXPHOS/mitokondriális biogenezis vagy glikolitikus gátlók fokozott daganatellenes hatását mutatták a rapalógokkal kombinációban (457). Ezeket a megfigyeléseket egészítik ki az autofágia, a lipidanyagcsere vagy más OXPHOS gátlók kezeléseinek *in vitro* sikerei is a legújabb célzott terápiákkal kombinációban (458). Előbbiek mellett a glutamin kétirányú bioenergetikai felhasználásának folyamata (oxidáció vagy redukív karboxiláció) is fontos tényező lehet a metabolikus alkalmazkodás megteremtésében (459). A lipid metabolizmus adaptációs mechanizmusainak szerepét hangsúlyozzák azok a saját eredményeink is, amelyekben a vizsgált emlődaganatos esetek 2/3-ban szimultán mutattuk ki a CPT1A és a FASN fehérjék nagy mennyiségét ugyanazokban a sejtekben, ugyanazon tumor területeken (mintázat egyezés). Ezek az új eredményeink és a festések kombinált értékelése, az úgynevezett magas metabolikus plaszticitás megállapítását segítették a szövetek metabolikus és mTOR aktivitásának átfogó szöveti vizsgálata alapján. Eredményeink egyértelműen alátámasztották, hogy a metabolikus plaszticitás, a metabolikus hibrid fenotípus jelenléte kulcsszerepet játszhat a terápia rezisztencia kialakulásában (460). Ennek a munkánkban a legnagyobb újdonsága, hogy több anyagcsere folyamatot és ezek

szöveti heterogenitását egyszerre elemeztük. Összefoglalva a kapott statisztikai elemzéseket: emlődaganatokban a metabolikus átrendeződés lehetősége mTOR hiperaktivitással társulva a rossz prognózis rizikóját jelenti. Mindezek alapján, az mTOR hiperaktivitás és más metabolikus tényezők komplex jellemzése segíthet az emlődaganatok vagy akár más daganattípusok várható rossz progressziójának előrejelzésében, ezek együttes gátlása pedig a daganatok kezelésében (76. ábra).



**76. ábra Metabolikus plaszticitás értékelése és potenciális prognosztikai szerepe.** Elsősorban emlődaganatok esetében végzett vizsgálataink alapján a magas metabolikus plaszticitás (ami magas mTOR aktivitást és a vizsgált metabolikus enzimek közül legalább két független tényező szintén magas expresszióját jelenti) nagyfokú alkalmazkodást tesz lehetővé a legkülönbözőbb stressz hatásokkal, akár a terápiás kezelésekkal szemben, így biztosítja egyes tumorsejtek túlélését majd a későbbi recidívák, metasztázisok kialakulását, ami a betegek rosszabb prognózisával függ össze.

#### V.4. A metabolikus plaszticitás mint terápiás target (mTOR inhibitorok és metabolikus inhibitor kombinációs kezelések várható jelentősége)

Az elmúlt évtizedek daganatbiológiai és klinikai kutatásai a régi és új eredmények átgondolására készítetnek minden a tumorok kialakulásával, progressziójával foglalkozó kutatót. A tumorokat és onkogéneket érintő, már egyre jobban célozhatóvá vált genetikai változások megismerését követően napjainkban a daganatok heterogenitásának, a tumor dinamikus változásának megértése jelenti a legnagyobb kihívást. Ez az, ami a legagresszívebb, legötletesebb, legmegalapozottabb kezelések esetében is azt eredményezheti, hogy kiszelektálódik egy olyan rendkívül malignus sejtpopuláció, amivel már sem a szervezet, sem a jelenlegi orvostudományi lehetőségek nem birkóznak meg. Ennek háttérében fel kellett ismernünk a szabályozási folyamatok hálózatának összefüggéseit, a kialakuló szabályozási zavarokat, a tumorszövetek tumoros és nem tumoros elemeinek szimbiózisát, a különböző

alkalmazkodási mechanizmusokat, mindazokat a lehetőségeket, amelyek a daganatsejtek túlélésében, szervezeten belüli migrációjában, reaktivációjában játszanak szerepet. A folyamatok és a szövetek komplexitását pedig sok esetben a kísérleti modelljeink sem reprezentálják megfelelően, így számos ideális target és gyógyszerfejlesztés bukik meg. Szinte semmit sem javult a helyzet pl. az agydaganatok vagy az agyi metasztatizis megjelenését követően; a betegek túlélési esélyei gyakorlatilag megegyeznek a 30 évvel ezelőttiekkel, és ez így van a molekuláris, célzott kezelések óriási sikerei és az elköltött dollár milliárdok, a megszekvenált gének és tumorsejtek tízezreinek adatai és azok feldolgozása ellenére.

Ennek hátterében csak sejtjük azokat az okokat, amelyeket, ha jobban megismerünk és egyre jobban feltárunk akkor talán van remény egy komplexebb, a betegek személyre szabott és egyre sikeresebb kezelésére. Ehhez járulhatunk hozzá saját eredményeinkkel is, amelyekben közös, hogy a rezisztencia mechanizmusok hátterében vizsgáltuk azokat a mechanizmusokat, alkalmazkodási lehetőségeket, amelyek az mTOR-hiperaktivitással és a metabolikus adaptációs mechanizmusokkal vannak összefüggésben. Ezek a változások mind érintik a sejt proliferációját, túlélési mechanizmusait, azok egyensúlyát, illetve a migráció közben bekövetkező metabolikus változásokat is. Saját munkánkban számos *in vitro* és *in vivo* kísérleti bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy az mTOR kombinált gátlása nemcsak a hagyományos vagy célzott kezelésekkal, hanem akár más metabolikus kezelésekkal kombinációban meggátolhatja a daganatok növekedését. Ezekben a kezelésekből külön érdekesek azok a kombinációk, amelyek egymást kiegészítő metabolikus hatásokkal gyakorlatilag elvágják az alkalmazkodás útvonalait, így metabolikus katasztrófát indíthatnak el a tumorsejtekben (461). Az egyik leghatékonyabb metabolikus kombinációs kezelés során pl. az mTOR gátlókkal anti-mitochondriális hatású antibiotikum kombinációk hatásait vizsgáltuk (462-464). A doxycycline ilyen hatásait más munkacsoportok is tanulmányozták az elmúlt időszakban, egyes adatok szerint alkalmazása a tumorok esetében pont metabolikus hatásai miatt gátolhatja a „dormant” vagy nyugvó őssejtszerű metabolikus fenotípusú tumorsejtek túlélését (257). Emlőcarcinomás betegek esetében egyre több adat áll rendelkezésre ezekről a hatásokról, illetve más metabolikus kezelések a terápia hatékonyságát segítő alkalmazásáról (465). Külön érdekes az előbbi folyamatok kombinálásának lehetősége a jelenleg legnagyobb érdeklődésre számot tartó immune-checkpoint inhibitor terápiák esetében (466).

Saját munkánk is azt mutatják azonban, hogy ezeknek a metabolikus folyamatoknak a jelenlegi kísérleti modellekben az eredményei korlátozottan értékelhetők, hiszen a 2D sejtvonalak vagy a jelenlegi xenograft modellek is számos metabolikus mechanizmusokat is érintő korláttal rendelkezhetnek. Kísérleteinkben megkezdtük azokat a vizsgálatainkat, amelyekben a legkülönbözőbb metabolikus katasztrófák indukcióját 3D modellekben, illetve 3D bionyomatott daganatszövetszerű struktúrákban tesztelhetjük. Ezekben vizsgáljuk a jövőben azokat a doxycycline+rapamycin, illetve rapamycin+egyéb metabolikus inhibitor kombinációkat, amelyek vizsgálataink szerint a vizsgált sejtvonalak 2/3-ában igen sikeresek. Természetesen más metabolikus útvonalak gátlása is elképzelhető, mivel ezek kombinációi az alternatív metabolikus alkalmazkodás lehetőségét gátolhatják meg. Ezek alkalmazásához azonban az adott kezelések metabolikus váltó mechanizmusainak megismerésére is szükségünk lesz. Ezek a típusú vizsgálatok zajlanak, így előbb-utóbb remélhetően pozitív eredményekről számolhatunk be saját vagy mások hasonló vizsgálatainak esetében.



## **VI. A tézisek, eredeti megfigyelések összefoglalása és az eredmények újdonságtartalmának, hasznosításának bemutatása**

### **1. Apoptózis indukció lymphoma és leukémia sejtvonalakban, mevastatin és immunszuppresszív kezelések (mycophenosav és rapalógok)**

- *Elsőként igazoltuk a mevastatin myeloma sejtek proliferációját gátló és apoptózis indukáló hatásait. Jellemeztük a kiváltott apoptózis folyamatait (Bcl-2 expresszióváltozás, mitokondrium depolarizáció és kaszpázok szerepe, a folyamat halál-receptor függetlensége).*
- *Az immunszuppresszív kezelések közül a mycophenolsav (mycophenolát mofetil) dózis- és időfüggő proliferáció gátló és apoptózis indukáló hatását elsőként jellemeztük a lymphomák növekedés gátlásában.*
- *A rapalógok hatásait tesztelve a legszélesebb körben, a legkülönbözőbb daganatsejtvonalakban jellemeztük a rapalógok, mTOR kináz gátlók pozitív, terápiás érzékenyítő hatásait (pl. EGRF inhibitor, ciszplatin vagy temozolomide érzékenyítő hatások), ami a jövőbeni kombinációs kezelésekre irányítja a figyelmet.*

Ezeknek a munkáknak a jelentőségét számos egyéb daganat esetében később leírt hasonló hatások támasztották alá. A *rapalógok* alkalmazása egyre szélesebb körben zajlott, zajlik és több daganattípusban a recidív, terápiaerezisztens esetekben törzskönyvezett lehetőségként is sok esetben megjelenhet. A *statinok* esetében is több tanulmány igazolta vizsgálataink óta azok daganatellenes alkalmazásának előnyeit. Egy 2016-os nagy betegszámú myelomás betegek klinikai adatait elemző tanulmány egyértelműen alátámasztotta, hogy a statinok alkalmazása jelentősen (több mint 20%-kal) csökkentette a halálozást a betegek között. A *mycophenolát mofetil*-ről is bizonyítottá vált az elmúlt években, hogy nemcsak az általunk jellemzett lymphoid, hanem számos egyéb malignitás esetében is hatásos tumornövekedés gátló szerepe lehet.

A transzlációs vizsgálatok jelenleg is zajlanak mindhárom hatóanyag típussal és azok újabb származékaival, illetve kombinált alkalmazásaival számos daganattípus esetében.

### **2. Az immunszuppresszió tumorigenikus hatásainak igazolása vizsgálataink segítségével**

- *A hazai vesetranszplantáció első 35 évének budapesti tapasztalatait, a betegek klinikai utánkövetését elemezve bemutattuk a vesetranszplantációkat követően kialakult különböző tumorok megoszlását és incidenciáját, ami csak kis mértékben mutatott eltéréseket a nemzetközi tapasztalatokhoz képest.*
- *A későbbiekben ezek közül az esetek közül a leggyakoribb vesedaganatok mTOR aktivitásának elemzésével igazoltuk az mTORC2 hiperaktivitás emelkedését és szignifikánsan magasabb mértékét poszttranszplantációs vesedaganatokban.*
- *A tacrolimus mTOR és mTORC2 aktivitás fokozó hatásait igazoltuk in vitro és in vivo ischaemiás modellekben, illetve ennek egyes vesecarcinoma sejtek potenciális proliferáció fokozó hatásait támasztottuk alá.*

A hazai poszttranszplantációs beavatkozásokkal összefüggésben megjelenő tumorok ilyen típusú jellemzését elsőként végeztük el. Adataink és az elvégzett elemzés fontosságát mutatja, hogy nemzetközi folyóiratban megjelent összefoglalásunknak citációja is rendkívül magas. A

transzplantációt követő immunszuppresszió mTOR aktivitást befolyásoló hatásait, vesedaganatokban összehasonlító vizsgálatát a *de novo* daganatokkal szintén elsőként végeztük el. Az mTORC2 hiperaktivitásának igazolásával megerősíthetjük azokat az eredményeket, amely szerint a hagyományos calcineurin alapú immunszuppresszióknak a daganat kialakulásának rizikójában direkt mTOR aktivitást emelő szerepe lehet. Mindez hangsúlyozza jelentőségét azoknak a jelenlegi transzplantációs immunszuppressziós trendeknek, hogy a transzplantáció után mielőbbi rapalog konverzió javasolt.

### **3. A Notch expresszió és aktivitás változás jelentősége leukémia és lymphoma sejtek proliferációjában, túlélésében**

*- Míg a NHL sejtvonalakban és humán CLL sejtekben nem, addig Hodgkin lymphomákban jelentős konstitutív NOTCH1 szignál aktivitást igazoltunk, mint potenciális rapamycin+gamma-szekretáz inhibitor célpont.*

Habár több közlemény felhívta a figyelmet a Notch szignál hiperaktivitás jelentőségére egyes lymphomákban, sőt még bizonyos szolid daganatokban is; illetve különböző Notch szignál gátló lehetőségek (elsősorban gamma-szekretáz inhibitorok) tesztelése is újra és újra felmerül malignitásokban, ezek csak néhány ritka esetben hatásosak (T-ALL- fázisvizsgálatokban sem váltották be az előzetes reményeket). Mindezek az adatok inkább a mi eredményeinket igazolják vissza. Eszerint megfelelő biomarkerekre lenne szükség, de a NOTCH szignálok és ligandok aktivitásának térképezése nem könnyű feladat, figyelembe véve a mikrokörnyezet és a sejtek jelátviteli hálózat módosító hatásait. Előbbiek mellett hatásosabb, specifikusabb gátlószerek fejlesztésére is szükség van, olyan hatóanyagokra, amelyek a már aktivált NOTCH útvonal gátlását és nem a szignál aktivációját gátolják meg a konstitutívan aktivált Notch szignálokat mutató daganatokban.

### **4. TGF $\beta$ indukált apoptózis, TGF $\beta$ rezisztencia háttere és TGF $\beta$ érzékenyítés lehetőségének vizsgálata leukémia és lymphoma sejtekben**

*- A TGF $\beta$  indukált apoptózis mechanizmusában elsőként igazoltuk az alternatív, Smad független jelátviteli útvonal, azon belül a PP2A aktiváció és ezzel összefüggésben a MAPK kináz útvonal, illetve a PI3K/Akt/mTOR útvonal gátlásának szerepét.*

*- Jellemeztük az mTOR aktivitás gátlás, valamint a rapamycin TGF $\beta$  szenzitizáló hatását lymphomákban; utóbbi a rapamycin lymphomák növekedését negatívan befolyásoló hatásaira, a normál negatív szabályozó hatások helyreállításának lehetőségére hívta fel a figyelmet.*

Mindezek az eredmények első között mutattak rá lymphomákban az alternatív TGF $\beta$  jelátviteli útvonalak, illetve a jelátviteli hálózat összefüggéseinek jelentőségére a legkülönbözőbb negatív szabályozó faktorok hatásainak kiesésében. A TGF $\beta$  daganatbiológiai hatásainak kettőssége azóta már teljesen nyilvánvaló. Így abban az esetben, ha ezeket a hatásokat szeretnék felhasználni a daganatok kezelésében, akkor mindenképpen érdemes megkülönböztetnünk, ahogy saját vizsgálatainkban is kimutattuk, a Smad függő és független TGF $\beta$  hatásokat, illetve a direkt a tumorsejteket vagy a mikrokörnyezet egyéb sejtjeinek működését érintő hatásokat.

## 5. Az mTOR aktivitás változások tumornövekedést segítő daganatbiológiai szerepének igazolása

- *Lymphomák és leukémiák mTOR aktivitásának jellemzésében egyértelműen igazoltuk, hogy:*
  - *Mitotikus sejtekben a riboszómális S6 kináz aktivitása jelentősen megemelkedik és ennek következményeként a riboszómális S6 fehérje foszfoprotein szintje is megnő*
  - *Különböző lymphoma típusok és a gyermekkori akut lymphoid leukémiák mTOR aktivitásában a magasabb mTOR aktivitás, illetve mTORC2 aktivitás rossz prognózissal függ össze*
  - *Előbbinek megfelelően a nem centrum germinatívum (non-GC) diffúz nagy B sejtés lymphomák esetében magas mTORC2 aktivitást, míg a jobb prognózisú HL-ák esetében mTORC1 aktivitást igazoltunk, ami a sejtek mTOR inhibitor érzékenységevel is összefüggést mutatott*
  - *A diagnóziskor várható progresszió megítélésében gyermekkori akut lymphoid leukémiákban az mTOR aktivitás mértéke, illetve azzal összefüggésben egyes miRNS-ek expressziós különbségei (pl. miR128b) is felhasználhatók*
- *Számos szolid daganattípusban a Rictor (mTORC2 komplex vázfehérje), illetve a p-Ser473-Akt fehérje emelkedett mennyisége (mTORC1 target fehérje) összefüggést mutatott a rossz prognózissal, metasztázisok vagy akár agyi metasztázisok megjelenésével a tumorok típusától függően:*
  - *mTORC2 komplex aktivitás, Rictor overexpresszió szignifikáns összefüggését igazoltuk a rossz prognózissal humán coloncarcinomákban*
  - *Kimutattuk, hogy primer tüdő adenocarcinomák és agyi metasztázisaik esetében az magas p-mTOR H-score, illetve magas Rictor H-score (azaz mTORC2 aktivitás) az agyi metasztázisokra jellemzőbb, illetve a később metasztázist adó primer daganatokban szignifikánsan magasabb*
  - *A Rictor amplifikáció kissejtés tüdődaganatokban jó összefüggést mutatott az esetek magas mTORC2 aktivitását jelző, in situ emelkedett Rictor és p-Ser473-Akt expresszióval*
  - *A ritka malignus tüdő elváltozásokban, lymphangioliomyomatosisokban az esetek közel felében igazoltuk az mTORC2 aktivitás megjelenését, ez összefüggő a betegség progressziójával, a rapalóg kezelés alacsony hatékonyságával*
  - *További daganatokban (emlődaganatok, sarcomák, gliomák, medulloblastomák, GIST-ek, stb.) is kimutattuk, igazoltuk az mTOR aktivitás változások, így az emelkedett mTORC2 aktivitás progressziós jelentőségét*
- *mTOR aktivitás változásokkal összefüggésben számos daganattípusban írtunk le jellegzetes metabolikus változásokat, amelyek felhívják a figyelmet a bioenergetikai szubsztráthasznosítás és metabolikus változások progressziós jelentőségére:*
  - *Kimutattuk a LAM sejtek mTORC2 aktivitással összefüggő potenciális glutamin- és acetáthasznosítását*
  - *Az IDH mutáció metabolikus következményeinek vizsgálata közben igazoltuk az mTOR aktivitás szerepét nemcsak a laktát, hanem a 2-HG onkometabolit termelésben is*

- *Elsőként jellemeztük a gliomák speciális glutamin és GABA oxidációs képességeit és ezzel összefüggő emelkedett SSADH expresszióját, illetve a GABA hasznosítás proliferáció fokozó hatásait*

Ezekkel a vizsgálatainkkal mindenképpen úttörő munkát végeztünk. Számos daganattípusban nemcsak itthon, hanem a világon elsőként írtunk le egyes mTOR aktivitással összefüggő metabolikus jellegzetességeket. Munkánk eredményeként az mTOR komplexek aktivitásának illetve daganatszövetek *in situ* metabolikus jellemzéséhez állítottunk be immunhisztokémiai vizsgálatokat vagy intracelluláris metabolit koncentrációméréseket. Ezek segítségével ma már lehetőségünk van pl. egyedi gyógyszer engedélyeztetésekhez mTOR aktivitás profil meghatározásokra a műtéti biopsziás mintákban, vagy akár metabolikus targetek validálására, onkometabolit termelés igazolására, adott mutációk esetén a daganatsejtek megjelenésével összefüggő onkometabolitok szérumszintjének követésére (pl. IDH mutáció 2HG, SDH mutáció szukcinát, FH mutáció fumarát) is. Mindezekkel a vizsgálatainkkal elsők között kezdtük meg az országban a tumormetabolizmussal, a daganatok bioenergetikai vizsgálataival kapcsolatos mérések, módszerek beállítását, illetve kísérleti munka végzését nemcsak *in vitro* és *in vivo* kísérleteinkben, hanem humán szövetekben.

## **6. Az mTOR aktivitás és a szöveti metabolikus adaptáció *in situ* térképezése gliomákban és emlődaganatokban, illetve más tumorszövetekben (LAM, rhabdomyosarcoma)**

- *Humán gliomák metabolikus plaszticitásának vizsgálatában*
  - *a temozolomide rezisztencia, egyes metabolikus gátlószerek, így pl. mTOR gátlók jellegzetes metabolikus változásait jellemeztük glioma sejtvonalakban*
  - *többféle metabolikus gátlószert+temozolomide és/vagy rapamycin kombinációk proliferáció gátló hatásait tesztelve kimutattuk, hogy a metabolikus alkalmazkodás gátlása hatásos tumornövekedés gátlást eredményez glioma sejtekben in vitro*
- *Gyermekkori rhabdomyosarcomák esetében igazoltuk az in situ magas mTORC2 aktivitást és ezzel párhuzamosan a Warburg-effektus, illetve alternatív metabolikus szubsztráthasznosítás elemeként a potenciális glutaminhasznosítás szerepét*
- *Emlőcarcinomákban meghatároztuk azokat a szöveti markereket, amelyekkel nemcsak a szövetek in situ mTOR aktivitása, hanem a metabolikus adaptációban szerephez jutó metabolikus folyamatok elérhetősége, az in situ metabolikus heterogenitás jellemezhető*
  - *A jellemzéshez felhasználható festések: p-S6, Rictor, p-mTOR, LDHA, GLS, CPT1A, FASN – ezek a festések a szubsztrát hasznosítási lehetőségek mellett a lipidanyagcsere folyamatok elérhetőségének vizsgálatára is lehetőséget teremtenek*
  - *Előbbiekkel jellemezve az emlődaganatokat egyértelműen igazoltuk, hogy:*
    - *A Warburg-fenotípus a HR- daganatok, illetve a legrosszabb prognózisú Her2+ és TN daganatok jellemzője*
    - *A lipidanyagcsere CPT1A és FASN enzimeit gyakran párhuzamosan magasán expresszálódnak a daganatsejtekben, ami gyors adaptációra ad lehetőséget a lipoxidáció és a zsírsavszintézis váltásában*
    - *A magas p-S6 expresszió, mTORC1 aktivitás rossz prognózissal függ össze*
    - *A magas metabolikus plaszticitás (magas mTOR aktivitás mellett még további metabolikus markerek expressziójának emelkedése) összefügg a rosszabb prognózissal*

Mindezek az eredményeink egyértelműen igazolják, hogy az mTOR aktivitás összefügg a magas metabolikus plaszticitással, aminek a daganatos betegségek progressziója, a terápiarezisztencia kialakulása szempontjából van jelentősége. A metabolikus plaszticitás *in situ* meghatározását patológiai mintákban ezekben a munkáinkban elsőként végeztük el. Ennek kapcsán megerősítettük azokat a korábbi saját és mások által is felvetett lehetőségeket, hogy nem onkológiai kezelőszerek, metabolikus hatású gyógyszerek kombinált kezelésével a jelenlegi terápiás beavatkozásoknál akár hatásosabb kombinációkat kereshetünk a jövőben. Ezeknek a kombinációknak pedig nemcsak a terápiarezisztencia áttörésében lehet jelentősége, hiszen egyes metabolikus gátlószerek kombinációk enyhébb, kevésbé súlyos mellékhatásokat is jelenthetnek.

### **7. Több sejtvonal, gliómák, emlőcarcinoma sejtek esetében a bioenergetikai alkalmazkodás gátlásának igazolása mTOR gátló és doxycycline kezelésekben**

- *Adataink alapján a rapamycin+doxycycline kezelés a vizsgált közel 30 különböző tumorsejtvonal 2/3-ában legalább 50%-kal csökkentette a tumornövekedést*
- *Glioma sejtvonalakban igazoltuk az mTOR inhibitorok, illetve egyéb metabolikus gátlók közöttük a doxycycline temozolimide érzékenyítő hatásait; elsőként mutattuk ki, hogy a rapamycin+doxycycline, illetve a doxycycline+temozolomide szignifikánsan csökkenti a sejtek túlélését, gátolja a proliferációt*
- *Doxorubicinnel összehasonlítva, a rapamycin és doxycycline kombinációk rendkívül hatásosnak bizonyultak különböző emlőcarcinoma sejtvonal modellekben in vitro és in vivo*

Ezekben a vizsgálatainkban elsőként jellemeztük a fent említett különböző metabolikus támadáspontú kezelések tumornövekedést gátló hatásait, illetve igazoltuk a rapamycin+doxycycline legkülönbözőbb daganatok esetében kimutatható tumornövekedést gátló hatásait, ami a metabolikus alkalmazkodás felfüggesztésének potenciális terápiás jelentőségére hívja fel a figyelmet.

### **8. Élő sejtek nyomtatására alkalmas megfelelő infrastruktúra és szövettenyésztési körülmények kialakítása**

- *Hagyományos 2D és 3D spheroid tenyészetek metabolikus összehasonlító vizsgálatainak kiegészítése nyomtatott szövetszerű tumormodellek és xenograft modellek vizsgálatával*
- *Emlőcarcinoma biotinta receptek, 3D bionyomtatási és tenyésztési protokollok kidolgozása, első nyomtatott struktúrák in vivo tumorképző képességének igazolása*

Vizsgálataink, fejlesztéseink Magyarországon mindenképpen úttörőek, illetve utóbbiak egy új xenotranszplantálási technológiai kidolgozásának alapjait teremtik meg. Mindezek új lehetőségeket nyitnak modellrendszereink tökéletesítésében, új metabolikus targetek felismerésében.



## VII. A tézisek rövid összefoglalása

A legkülönbözőbb daganatokban jelent problémát a terápia sikertelensége, a rezisztencia megjelenése, amelynek fontos tényezője a jelátviteli hálózatok folyamataiban bekövetkező aktivitás változások sorozata. A legtöbb daganat esetében kimutatható, hogy jelátviteli zavarok, driver mutációk következményeként PI3K/Akt/mTOR hiperaktivitás jelenik meg.

Munkacsoportunk a két elemeiben és inhibitor érzékenységében is különböző mTOR komplex aktivitás különbségeinek karakterizálásában végzett úttörő munkát; az általunk beállított immunhisztokémiai festésekkel végzik ezt a karakterizálást mára a legtöbb helyen. Az mTOR-hiperaktivitás különbségek nemcsak az mTOR inhibitor érzékenység, hanem a daganatok progressziója szempontjából is fontosak. Adott tumorokban az esetek között megfigyelhető magasabb mTOR aktivitás, illetve az mTORC2 komplex jelenléte és aktivitása a rosszabb prognózis jele. Ezeket az összefüggéseket lymphomák, leukémiák, coloncarcinómák, egyes tüdődaganatok, emlőcarcinómák, gliomák, vesedaganatok és rhabdomyosarcomák esetében is elsők között igazoltuk. Felhívtuk a figyelmet arra is, hogy az mTOR aktivitás gátlása a normál negatív szabályozók hatásaival szemben újra érzékennyé teheti a daganatsejteket (TGF $\beta$  és Notch inhibitor érzékenyítés). Kombinált mTOR inhibitorok alkalmazásával pedig felfüggeszthetővé válhatnak a rezisztencia mechanizmusok célzott (pl. az EGFR inhibitor) vagy kemoterápiás kezeléseknél (pl. ciszplatin, temozolomide). Az inhibitorok megválasztásában azonban figyelembe kell venni az adott daganattípus mTOR aktivitás profilját, mivel a rapalógok mTORC2 hiperaktivitás mellett hatástalanok lehetnek.

Az mTOR kináz szabályozó szerepének metabolikus hatásait vizsgálva, a daganatszövetek mTOR hiperaktivitásával összefüggésben olyan metabolikus jellegzetességek megjelenését is igazoltuk szöveti szinten, amelyek a daganatsejtek túlélését, kezelésekkal szembeni rezisztenciájának kialakulását segítik. Ezek között számos bioenergetikai, szubsztráthasznosítással, alternatív metabolikus útvonalak aktiválódásával kapcsolatos folyamatot azonosítottunk (mTOR függő onkometabolit termelés; gliomák esetében a GABA hasznosítás és az SSADH overexpresszió; a glutaminhasznosítás, a lipidanyagcsere folyamatok újrendeződésének lehetősége). Eredményeink szerint a különböző metabolikus fenotípusú daganatsejtek nemcsak gliomák, hanem pl. LAM-ok, rhabdomyosarcomák és emlőcarcinómák esetében is fontos metabolikus alkalmazkodási lehetőséget teremtenek a daganatprogresszió során. A legkülönbözőbb daganatokat érintő vizsgálatainkban igazoltuk, hogy a. jellemezhető a metabolikus plaszticitás, a tumorszövet metabolikus heterogenitása; b. a magas mTOR aktivitás, illetve amellett a metabolikus plaszticitás is rossz prognózissal függ össze (pl. emlődaganatokban); c. egyes nem onkológiai készítmények, pl. metabolikus hatású gátlószerke (statinok, etomoxir, antibiotikumok, metformin, stb.), illetve a rapamycin származékok vagy akár más immunszuppresszív kezelések mint mycophenolát mofetil daganatnövekedés gátló hatásúak is lehetnek. Eredményeink között az egyik legérdekesebb terápiás jelentőségű vizsgálatsorozatunk azt is alátámasztotta, hogy eltérő hatású anti-metabolikus kezelések kombinációja (pl. a rapamycin+doxycycline) a legkülönbözőbb daganatok esetében, metabolikus katasztrófát előidézve hatásos tumornövekedést gátló kezelés lehet.

Mindezek alapján az mTOR aktivitások és a metabolikus plaszticitás meghatározása, a metabolikus adaptáció folyamatainak megismerése az adott betegek tumora esetében egyénre szabott kezelési lehetőségeket vethet fel a kialakuló rezisztencia problémák függvényében.





## VIII. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom *Matolcsy András, Kopper László, Szende Béla és Lapis Károly* intézetvezető professzoroknak, akik mindig támogatták, hogy a Patológia Intézetben kutatómunkát folytathassunk és megteremtették az ideális feltételeket és légkört mindehhez.

Legtöbbet korábbi témavezetőmtől és mentoromtól, *Kopper László* professzortól tanultam, aki végtelen türelemmel és atyai gondoskodással követi jelenleg is munkámat. Hálásan köszönöm, hogy jó tanácsaival sokáig terelgette érdeklődésemet és mindig külön figyelmet fordított új ötleteinkre. Ha őt meg tudtam győzni arról, hogy valamilyen kutatási projekt érdekes, akkor már olyan alaposan körbejártunk egy témát, hogy onnan gyerekjáték volt minden. Az ő kritikus, előremutató gondolkodását igyekszünk követni munkáinkban.

Köszönöm *Kovalszky Ilona* professzor asszonynak, hogy a molekuláris biológiai módszerek és az extracelluláris mátrix biológia rejtelseibe bevezetett, illetve, hogy mindig számíthatok támogatására és hozzáértő tanácsaira, segítségére. Hálával tartozom *Jeney András* professzor úrnak, aki támogatta útkeresésünket a tumormetabolizmus biokémiai útvesztőjében, és rengeteg ötletével, tájékozottságával jelenleg is ösztönzően hat mindennapi kutatási kérdéseinkben.

Külön köszönettel tartozom *Buzás Edit, Kulka Janina, Tretter László, Drahos László és Patócs Attila* professzoroknak, illetve *Vellai-Takács Krisztina és Csóka Monika* tanárnőknek, hogy nemcsak adott projektekben, hanem számos tudományos kérdésben nyújtottak hozzáértő szakmai segítséget és inspiráló megbeszéléseken járultak hozzá ötleteikkel terveinkhez.

Hálás vagyok az utóbbi években nyújtott együttműködésért, közös együtt gondolkodás elindulásáért a tumormetabolizmussal kapcsolatos vizsgálatainkban *Michael P. Lisanti és Federica Sotgia* professzoroknak, illetve *Ozsvári Bélának* Manchesterben a Salford Egyetemen.

Köszönöm mindazoknak a kollégáknak - *Sápi Zoltán, Berczi Lajos, Krenács Tibor, Pápay Judit, Barna Gábor, Tőkés Anna-Mária, Fekete Andrea, Arató Gabriella, Tímár Botond, Rajnai Hajnalka, Micsik Tamás, Bödör Csaba, Paku Sándor, Mihalik Rudolf* -, akik a különböző daganatok vizsgálataiban, hogy segítettek, megteremtve a professzionális patodiagnosztikai, kutatási hátteret.

Sosem tudom eléggé megköszönni a mindennapi munkában kapott segítséget és azt a légkört, amit közvetlen kollégáim és a velünk dolgozó PhD és TDK hallgatók teremtettek, teremtenek. Külön hálával gondolok a mindennapokban nyújtott támogatására *Bagi Györgyinek és Csorba Gézáné Maricának*, nekik rengeteget köszönhetek. Köszönöm *Tamási Annának, Paulusz Mónikának, Kaminszky Zsuzsának, Oláh Júliának, Kurucz Csillának és Sztodola Andrásnak*, hogy mindig segítették munkájukkal, hogy a kísérleteinkhez szükséges mintafeldolgozás vagy állatkísérleti munka megvalósuljon. Köszönöm azoknak a kollégáknak is – *Laczik Ceciliának* és intézet további munkatársainak, akik egyes vizsgálatokban, adminisztratív, vagy akár egyéb pályázati ügyekben segítenek, segítettek. Kiemelném azokat a hallgatókat, kollégákat akikkel nap mint nap dolgoztunk, dolgozunk fáradhatatlanul azon, hogy a tumormetabolizmus munkacsoport sikeres legyen, és akiknek nagyon sok odaadó munkát köszönhetek: *Hajdu Melinda, Dankó Titanilla, Petővári Gábor, Krencz Ildikó, Raffay Regina, Felkai Luca, Vetlényi Enikő, Sztankovics Dániel, Moldvai Dorottya, illetve Márk Ágnes, Nagy Noémi, Sticz Tamás, Hujber Zoltán, Nemes Karolina, Kiss Lilla, Egervári Gábor, Molnár Anna, Tóth Fanni, Sipos Krisztina, Kis Dorottya.*

Végül, de egyáltalán nem utolsósorban hálával és köszönettel tartozom *férjemnek, édesanyámnak, apósomnak és négy gyermekemnek*, hogy ők is áldozatokat hoztak, támogattak a mindennapi küzdelmekben és biztosították a nyüzsgő, de biztos családi hátteret vagy épp elviselték, hogy nálunk egy kicsit másképp történik minden...

A munkához nyújtott anyagi támogatásért köszönettel tartozom a Magyar Tudományos Akadémia pályázatainak, támogatásainak; az NKFIH-nak és a Semmelweis Egyetemnek.

**IX. irodalomjegyzék**

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
3. Cantor JR, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov*. 2012;2(10):881-98.
4. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-33.
5. Inman JL, Robertson C, Mott JD, Bissell MJ. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development*. 2015;142(6):1028-42.
6. Legrand AJ, Konstantinou M, Goode EF, Meier P. The Diversification of Cell Death and Immunity: Memento Mori. *Mol Cell*. 2019;76(2):232-242.
7. Grunt TW. Interacting Cancer Machineries: Cell Signaling, Lipid Metabolism, and Epigenetics. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29(2):86-98.
8. Bashyam MD, Animireddy S, Bala P, Naz A, George SA. The Yin and Yang of cancer genes. *Gene*. 2019;704:121-133.
9. Moses HL, Yang EY, Pietenpol JA. TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell*. 1990;63(2):245-7.
10. Lin SY, Morrison JR, Phillips DJ, de Kretser DM. Regulation of ovarian function by the TGF-beta superfamily and follistatin. *Reproduction*. 2003;126(2):133-48.
11. Colak S, Ten Dijke P. Targeting TGF- $\beta$  Signaling in Cancer. *Trends Cancer*. 2017;3(1):56-71.
12. Li H, Liu JP. Mechanisms of action of TGF-beta in cancer: evidence for Smad3 as a repressor of the hTERT gene. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1114:56-68.
13. Findlay JK, Drummond AE, Dyson ML, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;191(1):35-43.
14. Li H, Pinto AR, Duan W, Li J, Toh BH, Liu JP. Telomerase down-regulation does not mediate PC12 pheochromocytoma cell differentiation induced by NGF, but requires MAP kinase signalling. *J Neurochem*. 2005;95(3):891-901.
15. Li H, Xu D, Li J, Berndt MC, Liu JP. Transforming growth factor beta suppresses human telomerase reverse transcriptase (hTERT) by Smad3 interactions with c-Myc and the hTERT gene. *J Biol Chem*. 2006;281(35):25588-600.
16. Liu L, Berletch JB, Green JG, Pate MS, Andrews LG, Tollefsbol TO. Telomerase inhibition by retinoids precedes cytodifferentiation of leukemia cells and may contribute to terminal differentiation. *Mol Cancer Ther*. 2004;3(8):1003-9.
17. Huynh LK, Hipolito CJ, Ten Dijke P. A Perspective on the Development of TGF- $\beta$  Inhibitors for Cancer Treatment. *Biomolecules*. 2019;9(11):743.
18. Akhurst RJ. Targeting TGF- $\beta$  Signaling for Therapeutic Gain. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(10):a022301.
19. Sebestyén A, Hajdu M, Kopper L., TGFb- a Janus arcú citokin: a TGFb tumorszupresszor szerepének kettőssége. *Orvosképzés*. 2006;3:169-183

20. Hao Y, Baker D, Ten Dijke P. TGF- $\beta$ -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(11):2767.
21. Miyazawa K, Miyazono K. Regulation of TGF- $\beta$  Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(3):a022095.
22. Chen CR, Kang Y, Siegel PM, Massagué J. E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. *Cell.* 2002;110(1):19-32.
23. Azar R, Alard A, Susini C, Bousquet C, Pyronnet S. 4E-BP1 is a target of Smad4 essential for TGFbeta-mediated inhibition of cell proliferation. *EMBO J.* 2009;28(22):3514-22.
24. Iavarone A, Massagué J. Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature.* 1997;387(6631):417-22.
25. Chakravarthy A, Khan L, Bensler NP, Bose P, De Carvalho DD. TGF- $\beta$ -associated extracellular matrix genes link cancer-associated fibroblasts to immune evasion and immunotherapy failure. *Nat Commun.* 2018;9(1):4692.
26. Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 2000;19(8):1745-54.
27. Mehra A, Wrana JL. TGF-beta and the Smad signal transduction pathway. *Biochem Cell Biol.* 2002;80(5):605-22.
28. Hill CS. Transcriptional Control by the SMADs. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8(10):a022079.
29. Yao D, Doré JJ Jr, Leof EB. FKBP12 is a negative regulator of transforming growth factor-beta receptor internalization. *J Biol Chem.* 2000;275(17):13149-54.
30. Choy L, Derynck R. The type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor-interacting protein TRIP-1 acts as a modulator of the TGF-beta response. *J Biol Chem.* 1998;273(47):31455-62.
31. Wrana JL. Signaling by the TGF $\beta$  superfamily. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(10):a011197.
32. Yamashita M, Fatyol K, Jin C, Wang X, Liu Z, Zhang YE. TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Mol Cell.* 2008;31(6):918-24.
33. Sorrentino A, Thakur N, Grimsby S, Marcusson A, von Bulow V, Schuster N, Zhang S, Heldin CH, Landström M. The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat Cell Biol.* 2008;10(10):1199-207.
34. Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y, Wrana JL. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science.* 2005;307(5715):1603-9.
35. Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem.* 2000;275(47):36803-10.
36. Wakefield LM, Hill CS. Beyond TGF $\beta$ : roles of other TGF $\beta$  superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(5):328-41.
37. Meulmeester E, Ten Dijke P. The dynamic roles of TGF- $\beta$  in cancer. *J Pathol.* 2011;223(2):205-218.
38. Akhurst RJ, Derynck R. TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol.* 2001;11(11):S44-S51.

39. Yan F, Wang Y, Wu X, Peshavariya HM, Disting GJ, Zhang M, Jiang F. Nox4 and redox signaling mediate TGF- $\beta$ -induced endothelial cell apoptosis and phenotypic switch. *Cell Death Dis.* 2014;5(1):e1010.
40. Cassar L, Nicholls C, Pinto AR, Chen R, Wang L, Li H, Liu JP. TGF- $\beta$  receptor mediated telomerase inhibition, telomere shortening and breast cancer cell senescence. *Protein Cell.* 2017; 8, 39–54.
41. Kiyono K, Suzuki HI, Matsuyama H, Morishita Y, Komuro A, Kano MR, Sugimoto K, Miyazono K. Autophagy is activated by TGF- $\beta$  and potentiates TGF- $\beta$ -mediated growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* 2009; 69, 8844–8852.
42. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell.* 2016;166(1):21-45.
43. van Staalduinen J, Baker D, Ten Dijke P, van Dam H. Epithelial-mesenchymal-transition-inducing transcription factors: new targets for tackling chemoresistance in cancer? *Oncogene.* 2018;37(48):6195-6211.
44. Pastushenko I, Brisebarre A, Sifrim A, et al. Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature.* 2018;556(7702):463-468.
45. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci. Signal.* 2014; 7, re8.
46. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging biological principles of metastasis. *Cell.* 2017; 168, 670–691.
47. Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, Massague J, Mundy GR, Guise TA. TGF- $\beta$  signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J. Clin. Investig.* 1999; 103, 197–206.
48. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C, Guise TA, Massague J. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell.* 2003; 3, 537–549.
49. Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, Wu CC, LeBleu VS, Kalluri R. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature.* 2015; 527, 525–530.
50. Maccalli C, Parmiani G, Ferrone S. Immunomodulating and Immunoresistance Properties of Cancer-Initiating Cells: Implications for the Clinical Success of Immunotherapy. *Immunol Invest.* 2017;46(3):221-238.
51. Jolly MK, Ware KE, Gilja S, Somarelli JA, Levine H. EMT and MET: Necessary or permissive for metastasis? *Mol. Oncol.* 2017; 11, 755–769.
52. Levy L, Hill CS. Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17(1-2):41-58.
53. Imai Y, Kurokawa M, Izutsu K, Hangaishi A, Maki K, Ogawa S, Chiba S, Mitani K, Hirai H. Mutations of the Smad4 gene in acute myelogenous leukemia and their functional implications in leukemogenesis. *Oncogene.* 2001;20(1):88-96.
54. Myeroff LL, He H, Fink SP, Markowitz S. Mutation detection in the TGF-beta receptors and smad genes: RT-PCR and sequencing. *Methods Mol Biol.* 2000;142:139-47.
55. Lutz M, Knaus P. Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal.* 2002;14(12):977-88.
56. Krebs LT, Xue Y, Norton CR, Shutter JR, Maguire M, Sundberg JP, Gallahan D, Closson V, Kitajewski J, Callahan R, Smith GH, Stark KL, Gridley T. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev.* 2000;14(11):1343-52.

57. Hamada Y, Kadokawa Y, Okabe M, Ikawa M, Coleman JR, Tsujimoto Y. Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality. *Development*. 1999;126(15):3415-24.
58. Domenga V, Fardoux P, Lacombe P, Monet M, Maciazek J, Krebs LT, Klonjowski B, Berrou E, Mericskay M, Li Z, Tournier-Lasserre E, Gridley T, Joutel A. Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes Dev*. 2004;18(22):2730-5.
59. Aster JC, Pear WS, Blacklow SC. The Varied Roles of Notch in Cancer. *Annu Rev Pathol*. 2017;12:245-275.
60. Logeat F, Bessia C, Brou C, LeBail O, Jarriault S, Seidah NG, Israël A. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(14):8108-12.
61. Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israël A. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell*. 2000;5(2):207-16.
62. Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian X, Pan DJ, Ray WJ, Kopan R. A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell*. 2000;5(2):197-206.
63. Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R. Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature*. 1998;393(6683):382-6.
64. Struhl G, Greenwald I. Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature*. 1999;398(6727):522-5.
65. Wu L, Aster JC, Blacklow SC, Lake R, Artavanis-Tsakonas S, Griffin JD. MAML1, a human homologue of *Drosophila* mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nat Genet*. 2000;26(4):484-9.
66. Wang H, Zang C, Taing L, Arnett KL, Wong YJ, Pear WS, Blacklow SC, Liu XS, Aster JC. NOTCH1-RBPJ complexes drive target gene expression through dynamic interactions with superenhancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(2):705-10.
67. Castel D, Mourikis P, Bartels SJ, Brinkman AB, Tajbakhsh S, Stunnenberg HG. Dynamic binding of RBPJ is determined by Notch signaling status. *Genes Dev*. 2013;27(9):1059-71.
68. O'Neil J, Grim J, Strack P, Rao S, Tibbitts D, Winter C, Hardwick J, Welcker M, Meijerink JP, Pieters R, Draetta G, Sears R, Clurman BE, Look AT. FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *J Exp Med*. 2007;204(8):1813-24.
69. Thompson BJ, Buonamici S, Sulis ML, Palomero T, Vilimas T, Basso G, Ferrando A, Aifantis I. The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. *J Exp Med*. 2007;204(8):1825-35.
70. Jin YH, Kim H, Ki H, Yang I, Yang N, Lee KY, Kim N, Park HS, Kim K. Beta-catenin modulates the level and transcriptional activity of Notch1/NICD through its direct interaction. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793(2):290-9.
71. Blokzijl A, Dahlqvist C, Reissmann E, Falk A, Moliner A, Lendahl U, Ibáñez CF. Cross-talk between the Notch and TGF-beta signaling pathways mediated by interaction of the Notch intracellular domain with Smad3. *J Cell Biol*. 2003;163(4):723-8.
72. Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, Ruas JL, Poellinger L, Lendahl U, Bondesson M. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell*. 2005;9(5):617-28.

73. Stoeck A, Lejnine S, Truong A, et al. Discovery of biomarkers predictive of GSI response in triple-negative breast cancer and adenoid cystic carcinoma. *Cancer Discov.* 2014;4(10):1154-67.
74. Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell.* 1991;66(4):649-61.
75. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP 4th, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science.* 2004;306(5694):269-71.
76. Sarmiento LM, Barata JT. Therapeutic potential of Notch inhibition in T-cell acute lymphoblastic leukemia: rationale, caveats and promises. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2011;11(9):1403-15.
77. Wang K, Zhang Q, Li D, Ching K, Zhang C, Zheng X, Ozeck M, Shi S, Li X, Wang H, Rejto P, Christensen J, Olson P. PEST domain mutations in Notch receptors comprise an oncogenic driver segment in triple-negative breast cancer sensitive to a  $\gamma$ -secretase inhibitor. *Clin Cancer Res.* 2015;21(6):1487-96.
78. Stephens PJ, Davies HR, Mitani Y, et al. Whole exome sequencing of adenoid cystic carcinoma. *J Clin Invest.* 2013;123(7):2965-8.
79. Di Ianni M, Baldoni S, Rosati E, Ciurnelli R, Cavalli L, Martelli MF, Marconi P, Screpanti I, Falzetti F. A new genetic lesion in B-CLL: a NOTCH1 PEST domain mutation. *Br J Haematol.* 2009;146(6):689-91.
80. Puente XS, Pinyol M, Quesada et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature.* 2011;475(7354):101-5.
81. Kridel R, Meissner B, Rogic S, Boyle M, Telenius A, Woolcock B, Gunawardana J, Jenkins C, Cochran C, Ben-Neriah S, Tan K, Morin RD, Opat S, Sehn LH, Connors JM, Marra MA, Weng AP, Steidl C, Gascoyne RD. Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma. *Blood.* 2012;119(9):1963-71.
82. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(10):3879-84.
83. Leonetti A, Facchinetti F, Minari R, et al. Notch pathway in small-cell lung cancer: from preclinical evidence to therapeutic challenges. *Cell Oncol (Dordr).* 2019;42(3):261-273.
84. George J, Lim JS, Jang SJ, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature.* 2015;524(7563):47-53.
85. Ardeshir-Larijani F, Wildey G, Fu P, Bhateja P, Dowlati A. Frequency of NOTCH pathway mutation in primary tumor of SCLC compared to metastatic biopsies and association with better survival. *Journal of Clinical Oncology.* 2018; 36:15\_suppl, e20574-e20574.
86. South AP, Purdie KJ, Watt SA, Haldenby S, den Breems N, Dimon M, Arron ST, Kluk MJ, Aster JC, McHugh A, Xue DJ, Dayal JH, Robinson KS, Rizvi SH, Proby CM, Harwood CA, Leigh IM. NOTCH1 mutations occur early during cutaneous squamous cell carcinogenesis. *J Invest Dermatol.* 2014;134(10):2630-2638.
87. Cancer Genome Atlas Research Network, Brat DJ, Verhaak RG, Aldape KD, et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2481-98.
88. Palomero T, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A, Barnes KC, O'Neil J, Neuberg D, Weng AP, Aster JC, Sigaux F, Soulier J, Look AT, Young RA, Califano A, Ferrando AA. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(48):18261-6.

89. Sharma VM, Calvo JA, Draheim KM, Cunningham LA, Hermance N, Beverly L, Krishnamoorthy V, Bhasin M, Capobianco AJ, Kelliher MA. Notch1 contributes to mouse T-cell leukemia by directly inducing the expression of c-myc. *Mol Cell Biol.* 2006;26(21):8022-31.
90. Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, Arcangeli ML, Lau A, Wai C, Del Bianco C, Rodriguez CG, Sai H, Tobias J, Li Y, Wolfe MS, Shachaf C, Felsher D, Blacklow SC, Pear WS, Aster JC. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev.* 2006 Aug 1;20(15):2096-109. doi: 10.1101/gad.1450406. Epub 2006 Jul 17. Erratum in: *Genes Dev.* 2007;21(5):625.
91. Dang CV, Le A, Gao P. MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res.* 2009;15(21):6479-83.
92. Felsher DW, Bishop JM. Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol Cell.* 1999;4(2):199-207.
93. Palomero T, Sulis ML, Cortina M, Real PJ, Barnes K, Ciofani M, Caparros E, Buteau J, Brown K, Perkins SL, Bhagat G, Agarwal AM, Basso G, Castillo M, Nagase S, Cordon-Cardo C, Parsons R, Zúñiga-Pflücker JC, Dominguez M, Ferrando AA. Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat Med.* 2007;13(10):1203-10.
94. Soares R, Balogh G, Guo S, Gärtner F, Russo J, Schmitt F. Evidence for the notch signaling pathway on the role of estrogen in angiogenesis. *Mol Endocrinol.* 2004;18(9):2333-2343.
95. Rizzo P, Miao H, D'Souza G, et al. Cross-talk between notch and the estrogen receptor in breast cancer suggests novel therapeutic approaches [published correction appears in *Cancer Res.* 2008 Sep 1;68(17):7246. Song, Lynda L [added]]. *Cancer Res.* 2008;68(13):5226-5235.
96. Dontu G, Jackson KW, McNicholas E, Kawamura MJ, Abdallah WM, Wicha MS. Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res.* 2004;6(6):R605-15.
97. D'Angelo RC, Ouzounova M, Davis A, Choi D, Tchuenkam SM, Kim G, Luther T, Quraishi AA, Senbabaoglu Y, Conley SJ, Clouthier SG, Hassan KA, Wicha MS, Korkaya H. Notch reporter activity in breast cancer cell lines identifies a subset of cells with stem cell activity. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(3):779-787.
98. Fan X, Khaki L, Zhu TS, Soules ME, Talsma CE, Gul N, Koh C, Zhang J, Li YM, Maciaczyk J, Nikkhah G, Dimeco F, Piccirillo S, Vescovi AL, Eberhart CG. NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells.* 2010;28(1):5-16.
99. Zhu TS, Costello MA, Talsma CE, Flack CG, Crowley JG, Hamm LL, He X, Hervey-Jumper SL, Heth JA, Muraszko KM, DiMeco F, Vescovi AL, Fan X. Endothelial cells create a stem cell niche in glioblastoma by providing NOTCH ligands that nurture self-renewal of cancer stem-like cells. *Cancer Res.* 2011;71(18):6061-72.
100. Xing F, Kobayashi A, Okuda H, Watabe M, Pai SK, Pandey PR, Hirota S, Wilber A, Mo YY, Moore BE, Liu W, Fukuda K, Iizumi M, Sharma S, Liu Y, Wu K, Peralta E, Watabe K. Reactive astrocytes promote the metastatic growth of breast cancer stem-like cells by activating Notch signalling in brain. *EMBO Mol Med.* 2013;5(3):384-96.
101. Venkatesh V, Nataraj R, Thangaraj GS, Karthikeyan M, Gnanasekaran A, Kaginelli SB, Kuppana G, Kallappa CG, Basalingappa KM. Targeting Notch signalling pathway of cancer stem cells. *Stem Cell Investig.* 2018;5:5.
102. Krishna BM, Jana S, Singhal J, Horne D, Awasthi S, Salgia R, Singhal SS. Notch signaling in breast cancer: From pathway analysis to therapy. *Cancer Lett.* 2019;461:123-131.

103. Takebe N, Nguyen D, Yang SX. Targeting notch signaling pathway in cancer: clinical development advances and challenges. *Pharmacol Ther.* 2014;141(2):140-9.
104. Wu Y, Cain-Hom C, Choy L, et al. Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature.* 2010;464(7291):1052-7.
105. Purow B. Notch inhibition as a promising new approach to cancer therapy. *Adv Exp Med Biol.* 2012;727:305-19.
106. Schott AF, Landis MD, Dontu G, Griffith KA, Layman RM, Krop I, Paskett LA, Wong H, Dobrolecki LE, Lewis MT, Froehlich AM, Paranilam J, Hayes DF, Wicha MS, Chang JC. Preclinical and clinical studies of gamma secretase inhibitors with docetaxel on human breast tumors. *Clin Cancer Res.* 2013;19(6):1512-24.
107. Kim J, Guan KL. mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth. *Nat Cell Biol.* 2019;21(1):63-71.
108. Jhanwar-Uniyal M, Wainwright JV, Mohan AL, Tobias ME, Murali R, Gandhi CD, Schmidt MH. Diverse signaling mechanisms of mTOR complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship. *Adv Biol Regul.* 2019;72:51-62.
109. Morita M, Gravel SP, Hulea L, Larsson O, Pollak M, St-Pierre J, Topisirovic I. mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell Cycle.* 2015;14(4):473-80.
110. Liu GY, Sabatini DM. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(4):183-203.
111. Tafur L, Kefauver J, Loewith R. Structural Insights into TOR Signaling. *Genes (Basel).* 2020;11(8):885.
112. Yang H, Rudge DG, Koos JD, Vaidialingam B, Yang HJ, Pavletich NP. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature.* 2013;497(7448):217-23.
113. Yuan HX, Guan KL. Structural insights of mTOR complex 1. *Cell Res.* 2016;26(3):267-8.
114. Yip CK, Murata K, Walz T, Sabatini DM, Kang SA. Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Mol Cell.* 2010;38(5):768-74.
115. Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J.* 2012;441(1):1-21.
116. Dibble CC, Cantley LC. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol.* 2015;25(9):545-55.
117. Ebner M, Sinkovics B, Szczygieł M, Ribeiro DW, Yudushkin I. Localization of mTORC2 activity inside cells. *J Cell Biol.* 2017;216(2):343-353.
118. Alvarenga AW, Machado LE, Rodrigues BR, Lupinacci FC, Sanemastu P, Matta E, Roffé M, Torres LF, da Cunha IW, Martins VR, Hajj GN. Evaluation of Akt and RICTOR Expression Levels in Astrocytomas of All Grades. *J Histochem Cytochem.* 2017;65(2):93-103.
119. Knudsen JR, Fritzen AM, James DE, Jensen TE, Kleinert M, Richter EA. Growth Factor-Dependent and -Independent Activation of mTORC2. *Trends Endocrinol Metab.* 2020;31(1):13-24.
120. Betz C, Hall MN. Where is mTOR and what is it doing there?. *J Cell Biol.* 2013;203(4):563-574.
121. Aylett CH, Sauer E, Imseng S, Boehringer D, Hall MN, Ban N, Maier T. Architecture of human mTOR complex 1. *Science.* 2016;351(6268):48-52.
122. Luo Y, Xu W, Li G, Cui W. Weighing In on mTOR Complex 2 Signaling: The Expanding Role in Cell Metabolism. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:7838647.



123. Sabatini DM. Twenty-five years of mTOR: Uncovering the link from nutrients to growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(45):11818-11825.
124. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(1):21-35.
125. Zhou H, Huang S. The complexes of mammalian target of rapamycin. *Curr Protein Pept Sci*. 2010;11(6):409-24.
126. Blenis J. TOR, the Gateway to Cellular Metabolism, Cell Growth, and Disease. *Cell*. 2017;171(1):10-13.
127. Ben-Sahra I, Manning BD. mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol*. 2017;45:72-82.
128. Gleason CE, Oses-Prieto JA, Li KH, Saha B, Situ G, Burlingame AL, Pearce D. Phosphorylation at distinct subcellular locations underlies specificity in mTORC2-mediated activation of SGK1 and Akt. *J Cell Sci*. 2019;132(7):jcs224931.
129. Vadlakonda L, Dash A, Pasupuleti M, Anil Kumar K, Reddanna P. The Paradox of Akt-mTOR Interactions. *Front Oncol*. 2013;3:165.
130. Mossmann D, Park S, Hall MN. mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(12):744-757.
131. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017;169(2):361-371.
132. Weichhart T. mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. *Gerontology*. 2018;64(2):127-134.
133. Menon S, Dibble CC, Talbott G, Hoxhaj G, Valvezan AJ, Takahashi H, Cantley LC, Manning BD. Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome. *Cell*. 2014;156(4):771-85.
134. Demetriades C, Doumpas N, Teleman AA. Regulation of TORC1 in response to amino acid starvation via lysosomal recruitment of TSC2. *Cell*. 2014;156(4):786-99.
135. Yeh CH, Bellon M, Nicot C. FBXW7: a critical tumor suppressor of human cancers. *Mol Cancer*. 2018;17(1):115.
136. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*. 2003;115(5):577-90.
137. Feng Z, Hu W, de Stanchina E, Teresky AK, Jin S, Lowe S, Levine AJ. The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res*. 2007;67(7):3043-53.
138. Goberdhan DC, Wilson C, Harris AL. Amino Acid Sensing by mTORC1: Intracellular Transporters Mark the Spot. *Cell Metab*. 2016;23(4):580-9.
139. Takahara T, Amemiya Y, Sugiyama R, Maki M, Shibata H. Amino acid-dependent control of mTORC1 signaling: a variety of regulatory modes. *J Biomed Sci*. 2020;27(1):87.
140. Thoreen CC. The molecular basis of mTORC1-regulated translation. *Biochem Soc Trans*. 2017;45(1):213-221.
141. Nandagopal N, Roux PP. Regulation of global and specific mRNA translation by the mTOR signaling pathway. *Translation (Austin)*. 2015;3(1):e983402.
142. Ben-Sahra I, Hoxhaj G, Ricoult SJH, Asara JM, Manning BD. mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science*. 2016;351(6274):728-733.

143. Rabanal-Ruiz Y, Otten EG, Korolchuk VI. mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays Biochem.* 2017;61(6):565-584.
144. Han J, Wang Y. mTORC1 signaling in hepatic lipid metabolism. *Protein Cell.* 2018;9(2):145-151.
145. Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leever S, Griffiths JR, Chung YL, Schulze A. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab.* 2008;8(3):224-36.
146. Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 $\alpha$  transcriptional complex. *Nature.* 2007;450(7170):736-40.
147. Mao Z, Zhang W. Role of mTOR in Glucose and Lipid Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7):2043.
148. Nagao A, Kobayashi M, Koyasu S, Chow CCT, Harada H. HIF-1-Dependent Reprogramming of Glucose Metabolic Pathway of Cancer Cells and Its Therapeutic Significance. *Int J Mol Sci.* 2019;20(2):238.
149. Kong H, Chandel NS. To Claim Growth Turf, mTOR Says SOD Off. *Mol Cell.* 2018;70(3):383-384.
150. Mutvei AP, Nagiec MJ, Hamann JC, Kim SG, Vincent CT, Blenis J. Rap1-GTPases control mTORC1 activity by coordinating lysosome organization with amino acid availability. *Nat Commun.* 2020;11(1):1416.
151. Yao Y, Jones E, Inoki K. Lysosomal Regulation of mTORC1 by Amino Acids in Mammalian Cells. *Biomolecules.* 2017;7(3):51.
152. Moloughney JG, Kim PK, Vega-Cotto NM, Wu CC, Zhang S, Adlam M, Lynch T, Chou PC, Rabinowitz JD, Werlen G, Jacinto E. mTORC2 Responds to Glutamine Catabolite Levels to Modulate the Hexosamine Biosynthesis Enzyme GFAT1. *Mol Cell.* 2016;63(5):811-26.
153. Durán RV, Hall MN. Glutaminolysis feeds mTORC1. *Cell Cycle.* 2012;11(22):4107-8.
154. García-Martínez JM, Alessi DR. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J.* 2008;416(3):375-85.
155. Yang G, Murashige DS, Humphrey SJ, James DE. A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Rep.* 2015;12(6):937-43.
156. Huang J, Manning BD. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans.* 2009;37(Pt 1):217-22.
157. Ricoult SJ, Manning BD. The multifaceted role of mTORC1 in the control of lipid metabolism. *EMBO Rep.* 2013;14(3):242-251.
158. Bar-Tana J. Type 2 diabetes - unmet need, unresolved pathogenesis, mTORC1-centric paradigm. *Rev Endocr Metab Disord.* 2020;10.1007/s11154-020-09545-w.
159. Sciarretta S, Forte M, Frati G, Sadoshima J. New Insights Into the Role of mTOR Signaling in the Cardiovascular System. *Circ Res.* 2018;122(3):489-505.
160. Kurdi A, De Meyer GR, Martinet W. Potential therapeutic effects of mTOR inhibition in atherosclerosis. *Br J Clin Pharmacol.* 2016;82(5):1267-1279.
161. Wang P, Zhang Q, Tan L, Xu Y, Xie X, Zhao Y. The Regulatory Effects of mTOR Complexes in the Differentiation and Function of CD4<sup>+</sup> T Cell Subsets. *J Immunol Res.* 2020;2020:3406032.

162. Huang H, Long L, Zhou P, Chapman NM, Chi H. mTOR signaling at the crossroads of environmental signals and T-cell fate decisions. *Immunol Rev.* 2020;295(1):15-38.
163. Zeng H, Chi H. mTOR and lymphocyte metabolism. *Curr Opin Immunol.* 2013;25(3):347-55.
164. Weichhart T, Hengstschläger M, Linke M. Regulation of innate immune cell function by mTOR. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(10):599-614.
165. Hoeffler CA, Klann E. mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci.* 2010;33(2):67-75.
166. Graber TE, McCamphill PK, Sossin WS. A recollection of mTOR signaling in learning and memory. *Learn Mem.* 2013;20(10):518-530.
167. Neasta J, Barak S, Hamida SB, Ron D. mTOR complex 1: a key player in neuroadaptations induced by drugs of abuse. *J Neurochem.* 2014;130(2):172-184.
168. Dayas CV, Smith DW, Dunkley PR. An emerging role for the Mammalian target of rapamycin in "pathological" protein translation: relevance to cocaine addiction. *Front Pharmacol.* 2012;3:13.
169. Hanim A, Mohamed IN, Mohamed RMP, Das S, Nor NSM, Harun RA, Kumar J. mTORC and PKCε in Regulation of Alcohol Use Disorder. *Mini Rev Med Chem.* 2020
170. Russo E, Citraro R, Constanti A, De Sarro G. The mTOR signaling pathway in the brain: focus on epilepsy and epileptogenesis. *Mol Neurobiol.* 2012;46(3):662-681.
171. Heras-Sandoval D, Pérez-Rojas JM, Pedraza-Chaverri J. Novel compounds for the modulation of mTOR and autophagy to treat neurodegenerative diseases. *Cell Signal.* 2020;65:109442.
172. Maiese K, Chong ZZ, Shang YC, Wang S. mTOR: on target for novel therapeutic strategies in the nervous system. *Trends Mol Med.* 2013;19(1):51-60.
173. McCubrey JA, Lertpiriyapong K, Steelman LS, Abrams SL, Cocco L, Ratti S, Martelli AM, Candido S, Libra M, Montalto G, Cervello M, Gizak A, Rakus D. Regulation of GSK-3 activity by curcumin, berberine and resveratrol: Potential effects on multiple diseases. *Adv Biol Regul.* 2017;65:77-88.
174. Hoshino S, Kobayashi M, Higami Y. Mechanisms of the anti-aging and longevity effects of caloric restriction: evidence from studies of genetically modified animals. *Aging (Albany NY).* 2018;10(9):2243-2251.
175. Arriola Apelo SI, Lamming DW. Rapamycin: An Inhibitor of Aging Emerges From the Soil of Easter Island. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2016;71(7):841-849.
176. Grabiner BC, Nardi V, Birsoy K, Possemato R, Shen K, Sinha S, Jordan A, Beck AH, Sabatini DM. A diverse array of cancer-associated MTOR mutations are hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity. *Cancer Discov.* 2014;4(5):554-63.
177. Polivka J Jr, Janku F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacol Ther.* 2014;142(2):164-175.
178. Tian T, Li X, Zhang J. mTOR Signaling in Cancer and mTOR Inhibitors in Solid Tumor Targeting Therapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3):755.
179. Cheng H, Zou Y, Ross JS, et al. RICTOR Amplification Defines a Novel Subset of Patients with Lung Cancer Who May Benefit from Treatment with mTORC1/2 Inhibitors. *Cancer Discov.* 2015;5(12):1262-70.
180. Morrison Joly M, Hicks DJ, Jones B, Sanchez V, Estrada MV, Young C, Williams M, Rexer BN, Sarbassov dos D, Muller WJ, Brantley-Sieders D, Cook RS. Rictor/mTORC2 Drives Progression and Therapeutic Resistance of HER2-Amplified Breast Cancers. *Cancer Res.* 2016;76(16):4752-64.

181. Balko JM, Giltnane JM, Wang K, et al. Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer Discov.* 2014;4(2):232-45.
182. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* 2014;513(7517):202-9.
183. Trotman LC, Niki M, Dotan ZA, Koutcher JA, Di Cristofano A, Xiao A, Khoo AS, Roy-Burman P, Greenberg NM, Van Dyke T, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten dose dictates cancer progression in the prostate. *PLoS Biol.* 2003;1(3):E59.
184. Ogita S, Lorusso P. Targeting phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)-Akt beyond rapalogs. *Target Oncol.* 2011;6(2):103-17.
185. Carpten JD, Faber AL, Horn C, et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature.* 2007;448(7152):439-44.
186. Davies MA, Stemke-Hale K, Tellez C, Calderone TL, Deng W, Prieto VG, Lazar AJ, Gershenwald JE, Mills GB. A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *Br J Cancer.* 2008;99(8):1265-8.
187. Philp AJ, Campbell IG, Leet C, Vincan E, Rockman SP, Whitehead RH, Thomas RJ, Phillips WA. The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res.* 2001;61(20):7426-9.
188. Sebestyén A, Kopper L. A mammalian target of rapamycin (mTOR) és gátlóinak szabályozó szerepe, mellékhatásai. *ORVOSTOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE.* 2014; 21 pp. 5-13., 9 p.
189. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Konishi H, Karakas B, Blair BG, Lin C, Peters BA, Velculescu VE, Park BH. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther.* 2004;3(8):772-5.
190. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012;149(2):274-293.
191. Lu ZH, Shvartsman MB, Lee AY, Shao JM, Murray MM, Kladney RD, Fan D, Krajewski S, Chiang GG, Mills GB, Arbeit JM. Mammalian target of rapamycin activator RHEB is frequently overexpressed in human carcinomas and is critical and sufficient for skin epithelial carcinogenesis. *Cancer Res.* 2010;70(8):3287-98.
192. Zou Z, Tao T, Li H, Zhu X. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. *Cell Biosci.* 2020;10:31.
193. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, Linn SC, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Hauptmann M, Beijersbergen RL, Mills GB, van de Vijver MJ, Bernards R. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell.* 2007;12(4):395-402.
194. Eichhorn PJ, Gili M, Scaltriti M, Serra V, Guzman M, Nijkamp W, Beijersbergen RL, Valero V, Seoane J, Bernards R, Baselga J. Phosphatidylinositol 3-kinase hyperactivation results in lapatinib resistance that is reversed by the mTOR/phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BEZ235. *Cancer Res.* 2008;68(22):9221-30.
195. Sobhani N, Generali D, Zanconati F, Bortul M, Scaggiante B. Current status of PI3K-mTOR inhibition in hormone-receptor positive, HER2-negative breast cancer. *World J Clin Oncol.* 2018;9(8):172-179.
196. McAlister VC, Gao Z, Peltekian K, Domingues J, Mahalati K, MacDonald AS. Sirolimus-tacrolimus combination immunosuppression. *Lancet.* 2000;355(9201):376-7.

197. Arriola Apelo SI, Lamming DW. Rapamycin: An InhibiTOR of Aging Emerges From the Soil of Easter Island. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2016;71(7):841-9.
198. Hipp S, Ringshausen I, Oelsner M, Bogner C, Peschel C, Decker T. Inhibition of the mammalian target of rapamycin and the induction of cell cycle arrest in mantle cell lymphoma cells. *Haematologica*. 2005;90(10):1433-4.
199. Khokhar NZ, Altman JK, Plataniias LC. Emerging roles for mammalian target of rapamycin inhibitors in the treatment of solid tumors and hematological malignancies. *Curr Opin Oncol*. 2011;23(6):578-86.
200. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2015;373(19):1803-13.
201. Baselga J, Campone M, Piccart M, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(6):520-9.
202. Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevila J, de Vries EG, Tomassetti P, Pavel ME, Hoosen S, Haas T, Lincy J, Lebwohl D, Öberg K; RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumors, Third Trial (RADIANT-3) Study Group. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*. 2011;364(6):514-23.
203. Teng QX, Ashar YV, Gupta P, Gadee E, Fan YF, Reznik SE, Wurlpel JND, Chen ZS. Revisiting mTOR inhibitors as anticancer agents. *Drug Discov Today*. 2019;24(10):2086-2095.
204. Ballou LM, Lin RZ. Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *J Chem Biol*. 2008;1(1-4):27-36.
205. Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol*. 2005;16(4):525-537.
206. Zheng Y, Jiang Y. mTOR Inhibitors at a Glance. *Mol Cell Pharmacol*. 2015;7(2):15-20.
207. Seto B. Rapamycin and mTOR: a serendipitous discovery and implications for breast cancer. *Clin Transl Med*. 2012;1(1):29.
208. Martelli AM, Buontempo F, McCubrey JA. Drug discovery targeting the mTOR pathway. *Clin Sci (Lond)*. 2018;132(5):543-568.
209. Zhang YJ, Duan Y, Zheng XF. Targeting the mTOR kinase domain: the second generation of mTOR inhibitors. *Drug Discov Today*. 2011;16(7-8):325-331.
210. Zhou HY, Huang SL. Current development of the second generation of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Chin J Cancer*. 2012;31(1):8-18.
211. Xie J, Wang X, Proud CG. mTOR inhibitors in cancer therapy. *F1000Res*. 2016;5:F1000 Faculty Rev-2078.
212. Faes S, Demartines N, Dormond O. Resistance to mTORC1 Inhibitors in Cancer Therapy: From Kinase Mutations to Intratumoral Heterogeneity of Kinase Activity. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1726078.
213. Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, Reichling LJ, Sim T, Sabatini DM, Gray NS. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem*. 2009 ;284(12):8023-32.
214. Rodrik-Outmezguine VS, Okaniwa M, Yao Z, Novotny CJ, McWhirter C, Banaji A, Won H, Wong W, Berger M, de Stanchina E, Barratt DG, Cosulich S, Klinowska T, Rosen N, Shokat KM. Overcoming mTOR resistance mutations with a new-generation mTOR inhibitor. *Nature*. 2016;534(7606):272-6.

215. Raynaud FI, Eccles SA, Patel S, et al. Biological properties of potent inhibitors of class I phosphatidylinositide 3-kinases: from PI-103 through PI-540, PI-620 to the oral agent GDC-0941. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(7):1725-38.
216. Easwaran V, Lee SH, Inge L, Guo L, Goldbeck C, Garrett E, Wiesmann M, Garcia PD, Fuller JH, Chan V, Randazzo F, Gundel R, Warren RS, Escobedo J, Aukerman SL, Taylor RN, Fantl WJ. beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer Res.* 2003;63(12):3145-53.
217. Gao F, Huang C, Zhang Y, Sun R, Zhang Y, Wang H, Zhang S. Combination targeted therapy of VEGFR inhibitor, sorafenib, with an mTOR inhibitor, sirolimus induced a remarkable response of rapid progressive Uterine PEComa. *Cancer Biol Ther.* 2016;17(6):595-8.
218. Vilar E, Perez-Garcia J, Tabernero J. Pushing the envelope in the mTOR pathway: the second generation of inhibitors. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(3):395-403.
219. Li J, Wang X, Xie Y, Ying Z, Liu W, Ping L, Zhang C, Pan Z, Ding N, Song Y, Zhu J. The mTOR kinase inhibitor everolimus synergistically enhances the anti-tumor effect of the Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor PLS-123 on Mantle cell lymphoma. *Int J Cancer.* 2018;142(1):202-213.
220. Nathan MR, Schmid P. A Review of Fulvestrant in Breast Cancer. *Oncol Ther.* 2017;5(1):17-29.
221. Miyata H, Ashizawa T, Iizuka A, Kondou R, Nonomura C, Sugino T, Urakami K, Asai A, Hayashi N, Mitsuya K, Nakasu Y, Yamaguchi K, Akiyama Y. Combination of a STAT3 Inhibitor and an mTOR Inhibitor Against a Temozolomide-resistant Glioblastoma Cell Line. *Cancer Genomics Proteomics.* 2017;14(1):83-91.
222. Chresta CM, Davies BR, Hickson I, et al. AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Res.* 2010;70(1):288-98.
223. Kranz B, Wingen AM, Vester U, König J, Hoyer PF. Long-term side effects of treatment with mTOR inhibitors in children after renal transplantation. *Pediatr Nephrol.* 2013 Aug;28(8):1293-8.
224. Magaway C, Kim E, Jacinto E. Targeting mTOR and Metabolism in Cancer: Lessons and Innovations. *Cells.* 2019;8(12):1584.
225. Salaün H, Thariat J, Vignot M, Merrouche Y, Vignot S. Obésité et cancer [Obesity and cancer]. *Bull Cancer.* 2017;104(1):30-41. French.
226. Katt WP, Cerione RA. Inhibition of cancer metabolism: a patent landscape. *Pharm Pat Anal.* 2019;8(4):117-138.
227. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell.* 2008;13(6):472-482.
228. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(2):85-95.
229. Hsieh AL, Walton ZE, Altman BJ, Stine ZE, Dang CV. MYC and metabolism on the path to cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;43:11-21.
230. Crabtree HG. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J.* 1929;23(3):536-45.
231. Diaz-Ruiz R, Rigoulet M, Devin A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1807(6):568-76.
232. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL, Cantley LC. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature.* 2008;452(7184):230-3.

233. Sebestyén A, Hujber Z, Jeney A, Kopper L. Tumormetabolizmus. *Klinikai Onkológia*. 2016;3(1):51–58
234. Sahinbegovic H, Jelinek T, Hrdinka M, Bago JR, Turi M, Sevcikova T, Kurtovic-Kozaric A, Hajek R, Simicek M. Intercellular Mitochondrial Transfer in the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2020;12(7):1787.
235. Ashton TM, McKenna WG, Kunz-Schughart LA, Higgins GS. Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res*. 2018;24(11):2482-2490.
236. Seyfried TN, Flores RE, Poff AM, D'Agostino DP. Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis*. 2014;35(3):515-527.
237. DeBerardinis RJ, Thompson CB. Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers teach us?. *Cell*. 2012;148(6):1132-1144.
238. Waterfall JJ, Killian JK, Meltzer PS. The role of mutation of metabolism-related genes in genomic hypermethylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;455(1-2):16-23.
239. Wang YP, Lei QY. Metabolic recoding of epigenetics in cancer. *Cancer Commun (Lond)*. 2018;38(1):25.
240. Courtney R, Ngo DC, Malik N, Ververis K, Tortorella SM, Karagiannis TC. Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Mol Biol Rep*. 2015;42(4):841-851.
241. Cucchi D, Camacho-Muñoz D, Certo M, Pucino V, Nicolaou A, Mauro C. Fatty acids - from energy substrates to key regulators of cell survival, proliferation and effector function. *Cell Stress*. 2019; 4(1):9-23.
242. Collier HA. Is cancer a metabolic disease?. *Am J Pathol*. 2014;184(1):4-17.
243. Jiang X, Overholtzer M, Thompson CB. Autophagy in cellular metabolism and cancer. *J Clin Invest*. 2015;125(1):47-54.
244. Huang K, Fingar DC. Growing knowledge of the mTOR signaling network. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;36:79-90.
245. Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018; 19(2):121-135.
246. McGuirk S, Audet-Delage Y, St-Pierre J. Metabolic Fitness and Plasticity in Cancer Progression. *Trends Cancer*. 2020; 6(1):49-61.
247. Nowicki S, Gottlieb E. Oncometabolites: tailoring our genes. *FEBS J*. 2015;282(15):2796-2805.
248. Morin A, Letouzé E, Gimenez-Roqueplo AP, Favier J. Oncometabolites-driven tumorigenesis: From genetics to targeted therapy. *Int J Cancer*. 2014; 135(10):2237-48.
249. Clark O, Yen K, Mellinghoff IK. Molecular Pathways: Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Cancer. *Clin Cancer Res*. 2016;22(8):1837-1842.
250. Khatami F, Payab M, Sarvari M, Gilany K, Larijani B, Arjmand B, Tavangar SM. Oncometabolites as biomarkers in thyroid cancer: a systematic review. *Cancer Manag Res*. 2019;11:1829-1841.
251. Frezza C. The role of mitochondria in the oncogenic signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014; 48:11-7.
252. Leather T, Jenkinson MD, Das K, Poptani H. Magnetic Resonance Spectroscopy for Detection of 2-Hydroxyglutarate as a Biomarker for IDH Mutation in Gliomas. *Metabolites*. 2017; 7(2):29.
253. Stein EM, DiNardo CD, Fathi AT, et al. Molecular remission and response patterns in patients with mutant-IDH2 acute myeloid leukemia treated with enasidenib. *Blood*. 2019;133(7):676-687.

254. Liu Y, Cao Y, Zhang W, Bergmeier S, Qian Y, Akbar H, Colvin R, Ding J, Tong L, Wu S, Hines J, Chen X. A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1 downregulates glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cancer cell growth in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*. 2012;11(8):1672-82.
255. Fan T, Sun G, Sun X, Zhao L, Zhong R, Peng Y. Tumor Energy Metabolism and Potential of 3-Bromopyruvate as an Inhibitor of Aerobic Glycolysis: Implications in Tumor Treatment. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(3):317.
256. Kuntz EM, Baquero P, Michie AM, Dunn K, Tardito S, Holyoake TL, Helgason GV, Gottlieb E. Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation eradicates therapy-resistant chronic myeloid leukemia stem cells. *Nat Med*. 2017;23(10):1234-1240.
257. Scatena C, Roncella M, Di Paolo A, Aretini P, Menicagli M, Fanelli G, Marini C, Mazzanti CM, Ghilli M, Sotgia F, Lisanti MP, Naccarato AG. Doxycycline, an Inhibitor of Mitochondrial Biogenesis, Effectively Reduces Cancer Stem Cells (CSCs) in Early Breast Cancer Patients: A Clinical Pilot Study. *Front Oncol*. 2018;8:452.
258. Pryor R, Cabreiro F. Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. *Biochem J*. 2015; 471(3):307-22.
259. Fiorillo M, Lamb R, Tanowitz HB, Mutti L, Krstic-Demonacos M, Cappello AR, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Repurposing atovaquone: targeting mitochondrial complex III and OXPHOS to eradicate cancer stem cells. *Oncotarget*. 2016;7(23):34084-99.
260. Jacque N, Ronchetti AM, Larrue C, et al. Targeting glutaminolysis has antileukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition. *Blood*. 2015;126(11):1346-56.
261. Matés JM, Di Paola FJ, Campos-Sandoval JA, Mazurek S, Márquez J. Therapeutic targeting of glutaminolysis as an essential strategy to combat cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2020; 98:34-43.
262. Corbet C, Feron O. Emerging roles of lipid metabolism in cancer progression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2017; 20(4):254-260.
263. Abou Dalle I, DiNardo CD. The role of enasidenib in the treatment of mutant IDH2 acute myeloid leukemia. *Ther Adv Hematol*. 2018; 9(7):163-173.
264. Conciatori F, Ciuffreda L, Bazzichetto C, Falcone I, Pilotto S, Bria E, Cognetti F, Milella M. mTOR Cross-Talk in Cancer and Potential for Combination Therapy. *Cancers (Basel)*. 2018;10(1). pii: E23.
265. Khawaja MR, Nick AM, Madhusudanannair V, Fu S, Hong D, McQuinn LM, Ng CS, Piha-Paul SA, Janku F, Subbiah V, Tsimberidou A, Karp D, Meric-Bernstam F, Lu KH, Naing A. Phase I dose escalation study of temsirolimus in combination with metformin in patients with advanced/refractory cancers. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016; 77(5):973-7.
266. Haas NB, Appleman LJ, Stein M, Redlinger M, Wilks M, Xu X, et al. Autophagy Inhibition to Augment mTOR Inhibition: a Phase I/II Trial of Everolimus and Hydroxychloroquine in Patients with Previously Treated Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2019; 25(7):2080-2087.
267. Rai KR, Jain P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then and now. *Am J Hematol*. 2016;91(3):330-40.
268. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol*. 2019;94(11):1266-1287.
269. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J*. 2017 ;7(6):e577.
270. Bhojwani D, Yang JJ, Pui CH. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am*. 2015;62(1):47-60.



271. Matolcsy A, Udvardy M, Kopper L. Érett B-sejtes non-Hodgkin lymphomák – Diffúz nagy B-sejtes lymphoma. *Hematológiai betegségek atlasza*. 2006: 274-280.
272. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. Mature B-cell neoplasms. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 2008: 179-267.
273. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-11.
274. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, Ott G, Rosenwald A, Braziel RM, Campo E, Vose JM, Lenz G, Staudt LM, Chan WC, Weisenburger DD. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*. 2011;29(2):200-7.
275. Mathas S, Hartmann S, Küppers R. Hodgkin lymphoma: Pathology and biology. *Semin Hematol*. 2016;53(3):139-47.
276. Shanbhag S, Ambinder RF. Hodgkin lymphoma: A review and update on recent progress. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(2):116-132.
277. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019;144(8):1941-1953.
278. Nasim F, Sabath BF, Eapen GA. Lung Cancer. *Med Clin North Am*. 2019;103(3):463-473.
279. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ Jr, Wu YL, Paz-Ares L. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet*. 2017;389(10066):299-311.
280. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet*. 2019;394(10207):1467-1480.
281. Lech G, Słotwiński R, Słodkowski M, Krasnodębski IW. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World J Gastroenterol*. 2016;22(5):1745-55.
282. Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;151:1-32.
283. Merino Bonilla JA, Torres Tabanera M, Ros Mendoza LH. Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies. *Radiologia*. 2017;59(5):368-379.
284. Wang YA, Jian JW, Hung CF, Peng HP, Yang CF, Cheng HS, Yang AS. Germline breast cancer susceptibility gene mutations and breast cancer outcomes. *BMC Cancer*. 2018;18(1):315.
285. Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet*. 2017;389(10074):1134-1150.
286. El-Chemaly S, Henske EP. Towards personalised therapy for lymphangioliomyomatosis: lessons from cancer. *Eur Respir Rev*. 2014;23(131):30-5.
287. Harari S, Torre O, Cassandro R, Moss J. The changing face of a rare disease: lymphangioliomyomatosis. *Eur Respir J*. 2015;46(5):1471-85.
288. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131(6):803-20.
289. Gussyatiner O, Hegi ME. Glioma epigenetics: From subclassification to novel treatment options. *Semin Cancer Biol*. 2018;51:50-58.
290. Miller JJ, Shih HA, Andronesi OC, Cahill DP. Isocitrate dehydrogenase-mutant glioma: Evolving clinical and therapeutic implications. *Cancer*. 2017;123(23):4535-4546.

291. Rudzinski ER, Anderson JR, Chi YY, Gastier-Foster JM, Astbury C, Barr FG, Skapek SX, Hawkins DS, Weigel BJ, Pappo A, Meyer WH, Arnold MA, Teot LA, Parham DM. Histology, fusion status, and outcome in metastatic rhabdomyosarcoma: A report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;64(12):10.1002/pbc.26645.
292. Williamson D, Missiaglia E, de Reyniès A, Pierron G, Thuille B, Palenzuela G, Thway K, Orbach D, Laé M, Fréneaux P, Pritchard-Jones K, Oberlin O, Shipley J, Delattre O. Fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma is clinically and molecularly indistinguishable from embryonal rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol*. 2010;28(13):2151-8.
293. Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH, Gelbart WM. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1995;139(3):1347-1358.
294. Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. Notch signaling. *Science*. 1995;268(5208):225-232.
295. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*. 1991;253(5022):905-909.
296. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*. 1994;78(1):35-43.
297. Sabers CJ, Martin MM, Brunn GJ, Williams JM, Dumont FJ, Wiederrecht G, Abraham RT. Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem*. 1995;270(2):815-22.
298. Noshu K, Kawasaki T, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ, Zepf D, Yan L, Longtine JA, Fuchs CS, Ogino S. PIK3CA mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations. *Neoplasia*. 2008;10(6):534-41.
299. Adamo B, Deal AM, Burrows E, Geradts J, Hamilton E, Blackwell KL, Livasy C, Fritchie K, Prat A, Harrell JC, Ewend MG, Carey LA, Miller CR, Anders CK. Phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in breast cancer brain metastases. *Breast Cancer Res*. 2011;13(6):R125.
300. Szoboszlai N, Guo X, Ozohanics O, Oláh J, Gömöry Á, Mihucz VG, Jeney A, Vékey K. Determination of energy metabolites in cancer cells by porous graphitic carbon liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry for the assessment of energy metabolism. *Anal Chim Acta*. 2014;819:108-15.
301. Cox AD, Der CJ. Farnesyltransferase inhibitors and cancer treatment: targeting simply Ras? *Biochim Biophys Acta*. 1997;1333(1):F51-71.
302. Alberts AW. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *Am J Cardiol*. 1988;62(15):10J-15J.
303. Nishimoto N, Shima Y, Yoshizaki K, Kishimoto T. Myeloma biology and therapy. Present status and future developments. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1997;11(1):159-72.
304. Wächtershäuser A, Akoglu B, Stein J. HMG-CoA reductase inhibitor mevastatin enhances the growth inhibitory effect of butyrate in the colorectal carcinoma cell line Caco-2. *Carcinogenesis*. 2001;22(7):1061-7.
305. Park C, Lee I, Kang WK. Lovastatin-induced E2F-1 modulation and its effect on prostate cancer cell death. *Carcinogenesis*. 2001;22(10):1727-31.
306. Sanfilippo KM, Keller J, Gage BF, Luo S, Wang TF, Moskowitz G, Gumbel J, Blue B, O'Brian K, Carson KR. Statins Are Associated With Reduced Mortality in Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*. 2016;34(33):4008-4014.

307. Appel GB, Radhakrishnan J, Ginzler EM. Use of mycophenolate mofetil in autoimmune and renal diseases. *Transplantation*. 2005. 80:S265-271.
308. Franchetti P, Grifantini M. Nucleoside and non-nucleoside IMP dehydrogenase inhibitors as antitumor and antiviral agents. *Curr Med Chem*. 1999. 6:599-614.
309. Allison AC, Eugui EM. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. *Transplantation* 2005. 80:S181- 190.
310. Allison AC, Eugui EM. Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clin Transplant*. 1996. 10:77-84.
311. Eugui EM, Almquist SJ, Muller CD, Allison AC. Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in vitro: role of deoxyguanosin nucleotide depletion. *Scand J Immunol*. 1991. 33:161-173.
312. Eugui EM, Mirkovich A, Allison AC. Lymphocyte-selective antiproliferative and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in mice. *Scand J Immunol*. 1991. 33:175-183.
313. Sollinger HW. From mice to man: the preclinical history of mycophenolate mofetil. *Clin Transplant*. 1996. 10:85-92.
314. De Smedt M, Hoebeke I, Reynvoet K, Leclercq G, Plum J. Different thresholds of Notch signaling bias human precursor cells toward B-, NK-, monocytic/dendritic-, or T-cell lineage in thymus microenvironment. *Blood*. 2005;106(10):3498-506.
315. Zweidler-McKay PA, He Y, Xu L, Rodriguez CG, Karnell FG, Carpenter AC, Aster JC, Allman D, Pear WS. Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies. *Blood*. 2005;106(12):3898-906.
316. Duechler M, Shehata M, Schwarzmeier JD, Hoelbl A, Hilgarth M, Hubmann R. Induction of apoptosis by proteasome inhibitors in B-CLL cells is associated with downregulation of CD23 and inactivation of Notch2. *Leukemia*. 2005;19(2):260-7.
317. Reedijk M, Odorcic S, Chang L, Zhang H, Miller N, McCreedy DR, Lockwood G, Egan SE. High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer Res*. 2005;65(18):8530-7.
318. Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, Di Ianni M, Fettucciari K, Bartoli A, Coaccioli S, Screpanti I, Marconi P. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood*. 2009;113(4):856-65.
319. Blokzijl A, Dahlqvist C, Reissmann E, Falk A, Moliner A, Lendahl U, Ibáñez CF. Cross-talk between the Notch and TGF-beta signaling pathways mediated by interaction of the Notch intracellular domain with Smad3. *J Cell Biol*. 2003;163(4):723-8.
320. Sun Y, Lowther W, Kato K, Bianco C, Kenney N, Strizzi L, Raafat D, Hirota M, Khan NI, Bargo S, Jones B, Salomon D, Callahan R. Notch4 intracellular domain binding to Smad3 and inhibition of the TGF-beta signaling. *Oncogene*. 2005;24(34):5365-74.
321. Masuda S, Kumano K, Shimizu K, Imai Y, Kurokawa M, Ogawa S, Miyagishi M, Taira K, Hirai H, Chiba S. Notch1 oncoprotein antagonizes TGF-beta/Smad-mediated cell growth suppression via sequestration of coactivator p300. *Cancer Sci*. 2005;96(5):274-82.
322. Dong M, Blobel GC. Role of transforming growth factor-beta in hematologic malignancies. *Blood*. 2006;107(12):4589-4596.
323. Kretschmer A, Moepert K, Dames S, Sternberger M, Kaufmann J, Klippel A. Differential regulation of TGF-beta signaling through Smad2, Smad3 and Smad4. *Oncogene*. 2003;22(43):6748-63.

324. Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling MV. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood*. 2012;120(6):1165-74.
325. Pui CH, Campana D, Evans WE. Childhood acute lymphoblastic leukaemia--current status and future perspectives. *Lancet Oncol*. 2001;2(10):597-607.
326. Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1998;339(9):605-15.
327. Chessels JM, Swansbury GJ, Reeves B, Bailey CC, Richards SM. Cytogenetics and prognosis in childhood lymphoblastic leukaemia: results of MRC UKALL X. Medical Research Council Working Party in Childhood Leukaemia. *Br J Haematol*. 1997;99(1):93-100.
328. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):551-65.
329. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, Raetz E, Relling M, Davies S, Downing JR, Willman CL, Reed JC. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003:102-31.
330. van Grotel, M., Meijerink, J. P., van Wering, E. R., Langerak, A. W., Beverloo, H. B., Buijs-Gladdines, J. G., Burger, N. B., Passier, M., van Lieshout, E. M., Kamps, W. A., Veerman, A. J., van Noesel, M. M., and Pieters, R. Prognostic significance of molecular-cytogenetic abnormalities in pediatric T-ALL is not explained by immunophenotypic differences, *Leukemia*. 2008; 22, 124-131.
331. Kebriaei P, Anastasi J, Larson RA. Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2002;15(4):597-621.
332. Nachman JB, Heerema NA, Sather H, Camitta B, Forestier E, Harrison CJ, Dastugue N, Schrappe M, Pui CH, Basso G, Silverman LB, Janka-Schaub GE. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2007;110(4):1112-5.
333. Schultz KR, Bowman WP, Aledo A, et al. Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5175-81.
334. Robison LL. Late effects of acute lymphoblastic leukemia therapy in patients diagnosed at 0-20 years of age. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:238-42.
335. Mertens AC, Liu Q, Neglia JP, Wasilewski K, Leisenring W, Armstrong GT, Robison LL, Yasui Y. Cause-specific late mortality among 5-year survivors of childhood cancer: the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(19):1368-79.
336. Fulbright JM, Raman S, McClellan WS, August KJ. Late effects of childhood leukemia therapy. *Curr Hematol Malig Rep*. 2011;6(3):195-205.
337. Nathan PC, Wasilewski-Masker K, Janzen LA. Long-term outcomes in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009;23(5):1065-82, vi-vii.
338. Lawrie CH. MicroRNAs and haematology: small molecules, big function. *Br J Haematol*. 2007;137(6):503-12.
339. Dong C, Ji M, Ji C. microRNAs and their potential target genes in leukemia pathogenesis. *Cancer Biol Ther*. 2009;8(3):200-5.
340. Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA Jr, Sjoblom T, Barad O, Bentwich Z, Szafranska AE, Labourier E, Raymond CK, Roberts BS, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(10):3687-92.
341. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli

- P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005;65(16):7065-70.
342. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell.* 2006;9(3):189-98.
343. Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, Taccioli C, Volinia S, Liu CG, Alder H, Calin GA, Ménard S, Croce CM. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res.* 2007;67(18):8699-707.
344. Lawrie CH. MicroRNAs in hematological malignancies. *Blood Rev.* 2013;27(3):143-54.
345. Akbari Moqadam F, Boer JM, Lange-Turenhout EA, Pieters R, den Boer ML. Altered expression of miR-24, miR-126 and miR-365 does not affect viability of childhood TCF3-rearranged leukemia cells. *Leukemia.* 2014;28(5):1008-14.
346. Zhang W, Qian JX, Yi HL, Yang ZD, Wang CF, Chen JY, Wei XZ, Fu Q, Ma H. The microRNA-29 plays a central role in osteosarcoma pathogenesis and progression. *Mol Biol (Mosk).* 2012 Jul;46(4):622-7.
347. Garzon R, Heaphy CE, Havelange V, Fabbri M, Volinia S, Tsao T, Zanesi N, Kornblau SM, Marcucci G, Calin GA, Andreeff M, Croce CM. MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2009;114(26):5331-41.
348. Lee JH, Voortman J, Dingemans AM, Voeller DM, Pham T, Wang Y, Giaccone G. MicroRNA expression and clinical outcome of small cell lung cancer. *PLoS One.* 2011;6(6):e21300.
349. Mi S, Lu J, Sun M, Li Z, Zhang H, Neilly MB et al. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007;104(50):19971-19976.
350. Zanette DL, Rivadavia F, Molfetta GA, Barbuzano FG, Proto-Siqueira R, Silva WA Jr, Falcão RP, Zago MA. miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40(11):1435-40.
351. Wang XC, Du LQ, Tian LL, Wu HL, Jiang XY, Zhang H, Li DG, Wang YY, Wu HY, She Y, Liu QF, Fan FY, Meng AM. Expression and function of miRNA in postoperative radiotherapy sensitive and resistant patients of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2011;72(1):92-9.
352. Wang XC, Du LQ, Tian LL, Wu HL, Jiang XY, Zhang H, Li DG, Wang YY, Wu HY, She Y, Liu QF, Fan FY, Meng AM. Expression and function of miRNA in postoperative radiotherapy sensitive and resistant patients of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2011;72(1):92-9.
353. Dahlhaus M, Roelf C, Ruck S, Lange S, Freund M, Junghans C. Expression and prognostic significance of hsa-miR-142-3p in acute leukemias. *Neoplasma.* 2013;60(4):432-8.
354. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(7):2257-61.
355. Marcucci G, Mrózek K, Radmacher MD, Garzon R, Bloomfield CD. The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2011;117(4):1121-9.
356. Fernández C, Bellosillo B, Ferraro M, Seoane A, Sánchez-González B, Pairet S, Pons A, Barranco L, Vela MC, Gimeno E, Colomo L, Besses C, Navarro A, Salar A. MicroRNAs 142-3p, miR-155 and miR-203 Are Deregulated in Gastric MALT Lymphomas Compared to Chronic Gastritis. *Cancer Genomics Proteomics.* 2017;14(1):75-82.

357. Wei Z, Wang Y, Jiang L, Ji N, Wang Y, Chen F, Li T, Li J, Xu H, Zeng X, Chen Q. miR-223 regulates oral squamous cell carcinoma metastasis through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Oral Oncol.* 2020;109:104941.
358. Lu M, Zessin AS, Glover W, Hsu DS. Activation of the mTOR Pathway by Oxaliplatin in the Treatment of Colorectal Cancer Liver Metastasis. *PLoS One.* 2017;12(1):e0169439.
359. Punt CJ, Boni J, Brunsch U, Peters M, Thielert C. Phase I and pharmacokinetic study of CCI-779, a novel cytostatic cell-cycle inhibitor, in combination with 5-fluorouracil and leucovorin in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol.* 2003;14(6):931-7.
360. Bendell JC, Kurkjian C, Infante JR, Bauer TM, Burris HA 3rd, Greco FA, Shih KC, Thompson DS, Lane CM, Finney LH, Jones SF. A phase 1 study of the sachet formulation of the oral dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 given twice daily (BID) in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs.* 2015; 33: 463- 471.
361. Krencz I, Sebestyen A, Khor A. mTOR in Lung Neoplasms. *Pathol Oncol Res.* 2020;26(1):35-48.
362. Janku F, Yap TA, Meric-Bernstam F. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? *Nat Rev Clin Oncol.* 2018; 15(5):273-291.
363. Conde E, Angulo B, Tang M, Morente M, Torres-Lanzas J, Lopez-Encuentra A, Lopez-Rios F, Sanchez-Cespedes M. Molecular context of the EGFR mutations: evidence for the activation of mTOR/S6K signaling. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(3 Pt 1):710-717.
364. Papadimitrakopoulou V. Development of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors and their application in personalized therapy for non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2012; 7(8):1315-1326.
365. Dobashi Y, Watanabe Y, Miwa C, Suzuki S, Koyama S. Mammalian target of rapamycin: a central node of complex signaling cascades. *Int J Clin Exp Pathol.* 2011; 4(5):476-95.
366. Chen B, Tan Z, Gao J, Wu W, Liu L, Jin W, Cao Y, Zhao S, Zhang W, Qiu Z, Liu D, Mo X, Li W. Hyperphosphorylation of ribosomal protein S6 predicts unfavorable clinical survival in non-small cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2015; 34:126.
367. Seki N, Takasu T, Mandai K, Nakata M, Saeki H, Heike Y, Takata I, Segawa Y, Hanafusa T, Eguchi K. Expression of eukaryotic initiation factor 4E in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the human peripheral lung. *Clin Cancer Res.* 2002 8(10):3046-3053.
368. Ekman S, Wynes MW, Hirsch FR. The mTOR pathway in lung cancer and implications for therapy and biomarker analysis. *J Thorac Oncol.* 2012; 7(6):947-953.
369. Facchinetti F, Bluthgen MV, Tergemina-Clain G, Faivre L, Pignon JP, Planchard D, Remon J, Soria JC, Lacroix L, Besse B. LKB1/STK11 mutations in nonsmall cell lung cancer patients: Descriptive analysis and prognostic value. *Lung Cancer.* 2017; 112:62-68.
370. Spoerke JM, O'Brien C, Huw L, Koeppen H, Fridlyand J, Brachmann RK, Haverty PM, Pandita A, Mohan S, Sampath D, Friedman LS, Ross L, Hampton GM, Amler LC, Shames DS, Lackner MR. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway alterations are associated with histologic subtypes and are predictive of sensitivity to PI3K inhibitors in lung cancer preclinical models. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(24):6771- 6783.
371. Hendifar AE, Marchevsky AM, Tuli R. Neuroendocrine Tumors of the Lung: Current Challenges and Advances in the Diagnosis and Management of Well-Differentiated Disease. *J Thorac Oncol.* 2017; 12(3):425-436.
372. Ross JS, Wang K, Elkadi OR, Tarasen A, Foulke L, Sheehan CE, Otto GA, Palmer G, Yelensky R, Lipson D, Chmielecki J, Ali SM, Elvin J, Morosini D, Miller VA, Stephens PJ. Next-generation

- sequencing reveals frequent consistent genomic alterations in small cell undifferentiated lung cancer. *J Clin Pathol*. 2014; 67(9):772-776.
373. Sakre N, Wildey G, Behtaj M, Kresak A, Yang M, Fu P, Dowlati A. RICTOR amplification identifies a subgroup in small cell lung cancer and predicts response to drugs targeting mTOR. *Oncotarget*. 2017; 8(4):5992-6002.
374. Adachi K, Miki Y, Saito R, Hata S, Yamauchi M, Mikami Y, Okada Y, Seyama K, Kondo T, Sasano H. Intracrine steroid production and mammalian target of rapamycin pathways in pulmonary lymphangioliomyomatosis. *Hum Pathol*. 2015; 46(11):1685-1693.
375. Badri KR, Gao L, Hyjek E, Schuger N, Schuger L, Qin W, Chekaluk Y, Kwiatkowski DJ, Zhe X. Exonic mutations of TSC2/TSC1 are common but not seen in all sporadic pulmonary lymphangioliomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013; 187(6):663-665.
376. Hayashi T, Kumasaka T, Mitani K, Okada Y, Kondo T, Date H, Chen F, Oto T, Miyoshi S, Shiraishi T, Iwasaki A, Hara K, Saito T, Ando K, Kobayashi E, GunjiNiitsu Y, Kunogi M, Takahashi KI, Yao T, Seyama K. Bronchial involvement in advanced stage lymphangioliomyomatosis: histopathologic and molecular analyses. *Hum Pathol*. 2016; 50:34-42.
377. Le X, Pugach EK, Hettmer S, Storer NY, Liu J, Wills AA, DiBiase A, Chen EY, Ignatius MS, Poss KD, Wagers AJ, Langenau DM, Zon LI. A novel chemical screening strategy in zebrafish identifies common pathways in embryogenesis and rhabdomyosarcoma development. *Development*. 2013;140(11):2354-64.
378. Renshaw J, Taylor KR, Bishop R, Valenti M, De Haven Brandon A, Gowan S, Eccles SA, Ruddle RR, Johnson LD, Raynaud FI, Selfe JL, Thway K, Pietsch T, Pearson AD, Shipley J. Dual blockade of the PI3K/AKT/mTOR (AZD8055) and RAS/MEK/ERK (AZD6244) pathways synergistically inhibits rhabdomyosarcoma cell growth in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. 2013;19(21):5940-51.
379. Cen L, Hsieh FC, Lin HJ, Chen CS, Qualman SJ, Lin J. PDK-1/AKT pathway as a novel therapeutic target in rhabdomyosarcoma cells using OSU-03012 compound. *Br J Cancer*. 2007; 97, 785-791.
380. Cen L, Arnoczky KJ, Hsieh FC, Lin HJ, Qualman SJ, Yu S, Xiang H, Lin J. Phosphorylation profiles of protein kinases in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Mod Pathol*. 2007; 20, 936-946.
381. Petricoin EF 3rd, Espina V, Araujo RP, Midura B, Yeung C, Wan X, Eichler GS, Johann DJ Jr, Qualman S, Tsokos M, Krishnan K, Helman LJ, Liotta LA. Phosphoprotein pathway mapping: Akt/mammalian target of rapamycin activation is negatively associated with childhood rhabdomyosarcoma survival. *Cancer Res*. 2007;67(7):3431-40.
382. Mascarenhas L, Chi YY, Hingorani P, Anderson JR, Lyden ER, Rodeberg DA, Indelicato DJ, Kao SC, Dasgupta R, Spunt SL, Meyer WH, Hawkins DS. Randomized Phase II Trial of Bevacizumab or Temozolimumab in Combination With Chemotherapy for First Relapse Rhabdomyosarcoma: A Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2019;37(31):2866-2874.
383. Jakobisiak M, Golab J. Potential antitumor effects of statins (Review). *Int J Oncol*. 2003;23(4):1055-69.
384. Kuoppala J, Lamminpää A, Pukkala E. Statins and cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2008;44:2122-32.,
385. Nielsen SF, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Statin use and reduced cancer-related mortality. *N Engl J Med*. 2012;367:1792-802.,
386. Zhong S, Zhang X, Chen L, Ma T, Tang J, Zhao J. Statin use and mortality in cancer patients: Systematic review and meta-analysis of observational studies. *Cancer Treat Rev*. 2015;41:554-67,

387. Longo J, van Leeuwen JE, Elbaz M, Branchard E, Penn LZ. Statins as anti-cancer agents in the era of precision medicine. *Clin Cancer Res*. 2020;clincanres.1967.2020.
388. Goard CA, Chan-Seng-Yue M, Mullen PJ, Quiroga AD, Wasylshen AR, Clendening JW, Sendorek DH, Haider S, Lehner R, Boutros PC, Penn LZ. Identifying molecular features that distinguish fluvastatin-sensitive breast tumor cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;143(2):301-12.
389. Warita K, Warita T, Beckwitt CH, Schurdak ME, Vazquez A, Wells A, Oltvai ZN. Statin-induced mevalonate pathway inhibition attenuates the growth of mesenchymal-like cancer cells that lack functional E-cadherin mediated cell cohesion. *Sci Rep*. 2014;4:7593.
390. Viswanathan VS, Ryan MJ, Dhruv HD, et al. Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway. *Nature*. 2017;547(7664):453-457.
391. Baas JM, Krens LL, Bos MM, Portielje JE, Batman E, van Wezel T, Morreau H, Guchelaar HJ, Gelderblom H. Safety and efficacy of the addition of simvastatin to panitumumab in previously treated KRAS mutant metastatic colorectal cancer patients. *Anticancer Drugs*. 2015;26(8):872-7.
392. Moon SH, Huang CH, Houlihan SL, Regunath K, Freed-Pastor WA, Morris JP 4th, Tschaharganeh DF, Kasthuber ER, Barsotti AM, Culp-Hill R, Xue W, Ho YJ, Baslan T, Li X, Mayle A, de Stanchina E, Zender L, Tong DR, D'Alessandro A, Lowe SW, Prives C. p53 Represses the Mevalonate Pathway to Mediate Tumor Suppression. *Cell*. 2019;176(3):564-580.e19.
393. Thompson JM, Alvarez A, Singha MK, Pavesic MW, Nguyen QH, Nelson LJ, Fruman DA, Razorenova OV. Targeting the Mevalonate Pathway Suppresses VHL-Deficient CC-RCC through an HIF-Dependent Mechanism. *Mol Cancer Ther*. 2018;17(8):1781-1792.
394. Longo J, Smirnov P, Li Z, Branchard E, van Leeuwen JE, Licht JD, Haibe-Kains B, Andrews DW, Keats JJ, Pugh TJ, Trudel S, Penn LZ. The mevalonate pathway is an actionable vulnerability of t(4;14)-positive multiple myeloma. *Leukemia*. 2020:1-13.
395. Engels EA, Pfeiffer RM, Fraumeni JF Jr, et al. Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *JAMA*. 2011;306(17):1891-901.
396. Sexton DJ, O'Kelly P, O'Leary E, Murray S, Deady S, Daly F, Egan J, Houlihan DD, McCormick PA, Morris PG, Ni Raghallaigh S, Moloney FJ, O'Neill JP, Conlon PJ. Variation in Nonmelanoma Skin Cancer Incidence by Treatment Modality Among Patients Receiving Multiple Kidney Transplants. *JAMA Dermatol*. 2019;155(5):594-598.
397. Garrett GL, Blanc PD, Boscardin J, et al. Incidence of and Risk Factors for Skin Cancer in Organ Transplant Recipients in the United States. *JAMA Dermatol*. 2017;153(3):296-303.
398. Murray SL, Daly FE, O'Kelly P, O'Leary E, Deady S, O'Neill JP, Dudley A, Rutledge NR, McCormick A, Houlihan DD, Williams Y, Morris PG, Ni Raghallaigh S, Moloney FJ, Sexton DJ, Conlon PJ. The impact of switching to mTOR inhibitor-based immunosuppression on long-term non-melanoma skin cancer incidence and renal function in kidney and liver transplant recipients. *Ren Fail*. 2020;42(1):607-612.
399. Benjanuwattra J, Chaiyawat P, Pruksakorn D, Koonrungsesomboon N. Therapeutic potential and molecular mechanisms of mycophenolic acid as an anticancer agent. *Eur J Pharmacol*. 2020:173580.
400. Koehl GE, Wagner F, Stoeltzing O, Lang SA, Steinbauer M, Schlitt HJ, Geissler EK. Mycophenolate mofetil inhibits tumor growth and angiogenesis in vitro but has variable antitumor effects in vivo, possibly related to bioavailability. *Transplantation*. 2007;83(5):607-14.



401. Domhan S, Muschal S, Schwager C, Morath C, Wirkner U, Ansorge W, Maercker C, Zeier M, Huber PE, Abdollahi A. Molecular mechanisms of the antiangiogenic and antitumor effects of mycophenolic acid. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(6):1656-68.
402. Chen K, Sheng J, Ma B, Cao W, Hernanda PY, Liu J, Boor PPC, Tjon ASW, Felczak K, Sprengers D, Pankiewicz KW, Metselaar HJ, Ma Z, Kwekkeboom J, Peppelenbosch MP, Pan Q. Suppression of Hepatocellular Carcinoma by Mycophenolic Acid in Experimental Models and in Patients. *Transplantation.* 2019;103(5):929-937.
403. Klangjorhor J, Chaiyawat P, Teeyakasem P, Sirikaew N, Phanphaisarn A, Settakorn J, Lirdprapamongkol K, Yama S, Svasti J, Pruksakorn D. Mycophenolic acid is a drug with the potential to be repurposed for suppressing tumor growth and metastasis in osteosarcoma treatment. *Int J Cancer.* 2020;146(12):3397-3409.
404. Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(2):93-115.
405. Dun B, Sharma A, Xu H, Liu H, Bai S, Zeng L, She JX. Transcriptomic changes induced by mycophenolic acid in gastric cancer cells. *Am J Transl Res.* 2013;6(1):28-42.
406. Dun B, Xu H, Sharma A, Liu H, Yu H, Yi B, Liu X, He M, Zeng L, She JX. Delineation of biological and molecular mechanisms underlying the diverse anticancer activities of mycophenolic acid. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(12):2880-6.
407. Bots B, Eipel O, Terkovics L, Felkai L, Csóka M. Lágyrészszarkómás gyermekek kezelési eredményei a Semmelweis Egyetem II. Sz. Gyermekgyógyászati Klinikáján [Treatment results of pediatric soft tissue sarcomas at the 2nd Department of Pediatrics, Semmelweis University]. *Magy Onkol.* 2018;62(4):222-229.
408. Felkai L, Bánusz R, Kovalszky I, Sápi Z, Garami M, Papp G, Karászi K, Varga E, Csóka M. The Presence of ALK Alterations and Clinical Relevance of Crizotinib Treatment in Pediatric Solid Tumors. *Pathol Oncol Res.* 2019;25(1):217-224.
409. Yoon MS. Nanotechnology-Based Targeting of mTOR Signaling in Cancer. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:5767-5781.
410. O'Donnell JS, Massi D, Teng MWL, Mandala M. PI3K-AKTmTOR inhibition in cancer immunotherapy, redux. *Semin Cancer Biol.* 2018;48:91–103.
411. Lunova M, Smolková B, Lynnyk A, Uzhytchak M, Jirsa M, Kubinová Š, Dejneka A, Lunov O. Targeting the mTOR Signaling Pathway Utilizing Nanoparticles: A Critical Overview. *Cancers (Basel).* 2019;11(1):82.
412. Escalona-Rayó O, Fuentes-Vázquez P, Jardón-Xicotencatl S, García-Tovar CG, Mendoza-Elvira S, Quintanar-Guerrero D. Rapamycin-loaded polysorbate 80-coated PLGA nanoparticles: optimization of formulation variables and in vitro anti-glioma assessment. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2019;52:488–499.
413. Katsuno Y, Meyer DS, Zhang Z, Shokat KM, Akhurst RJ, Miyazono K, Derynck R. Chronic TGF- $\beta$  exposure drives stabilized EMT, tumor stemness, and cancer drug resistance with vulnerability to bitopic mTOR inhibition. *Sci Signal.* 2019;12(570):eaau8544.
414. Shao F, Sun H, Deng CX. Potential therapeutic targets of triple-negative breast cancer based on its intrinsic subtype. *Oncotarget.* 2017;8(42):73329-73344.
415. Chan XY, Singh A, Osman N, Piva TJ. Role Played by Signalling Pathways in Overcoming BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1527.

416. Kurimoto R, Iwasawa S, Ebata T, Ishiwata T, Sekine I, Tada Y, Tatsumi K, Koide S, Iwama A, Takiguchi Y. Drug resistance originating from a TGF- $\beta$ /FGF-2-driven epithelial-to-mesenchymal transition and its reversion in human lung adenocarcinoma cell lines harboring an EGFR mutation. *Int J Oncol.* 2016;48(5):1825-36.
417. Luo K. Signaling Cross Talk between TGF- $\beta$ /Smad and Other Signaling Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(1):a022137.
418. Chiarini F, Evangelisti C, Lattanzi G, McCubrey JA, Martelli AM. Advances in understanding the mechanisms of evasive and innate resistance to mTOR inhibition in cancer cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019;1866(8):1322-1337.
419. Mateo F, Arenas EJ, Aguilar H, et al. Stem cell-like transcriptional reprogramming mediates metastatic resistance to mTOR inhibition. *Oncogene.* 2017;36(19):2737-2749.
420. Sun W, Yi Y, Xia G, Zhao Y, Yu Y, Li L, Hua C, He B, Yang B, Yu C, Ye C, Tu F, Chen C, Xu X, Zheng Z, Wang W, Shen X. Nrf2-miR-128-3p-mTOR Axis Controls an miRNA Regulatory Network Involved in HDACi-Induced Autophagy. *Mol Ther.* 2019;27(5):1039-1050.
421. Miller S, Stewart ID, Clements D, Soomro I, Babaei-Jadidi R, Johnson SR. Evolution of lung pathology in lymphangioleiomyomatosis: associations with disease course and treatment response. *J Pathol Clin Res.* 2020;6(3):215-226.
422. Gao N, Zhang T, Ji J, Xu KF, Tian X. The efficacy and adverse events of mTOR inhibitors in lymphangioleiomyomatosis: systematic review and meta-analysis. *Orphanet J Rare Dis.* 2018;13(1):134.
423. Pancholi S, Leal MF, Ribas R, Simigdala N, Schuster E, Chateau-Joubert S, Zabaglo L, Hills M, Dodson A, Gao Q, Johnston SR, Dowsett M, Cosulich SC, Maragoni E, Martin LA. Combination of mTORC1/2 inhibitor vistusertib plus fulvestrant in vitro and in vivo targets oestrogen receptor-positive endocrine-resistant breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2019;21(1):135.
424. Lu R, Zhao G, Yang Y, Jiang Z, Cai J, Hu H. Inhibition of CD133 Overcomes Cisplatin Resistance Through Inhibiting PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway and Autophagy in CD133-Positive Gastric Cancer Cells. *Technol Cancer Res Treat.* 2019;18:1533033819864311.
425. Gong T, Cui L, Wang H, Wang H, Han N. Knockdown of KLF5 suppresses hypoxia-induced resistance to cisplatin in NSCLC cells by regulating HIF-1 $\alpha$ -dependent glycolysis through inactivation of the PI3K/Akt/mTOR pathway. *J Transl Med.* 2018;16(1):164.
426. Gohr K, Hamacher A, Engelke LH, Kassack MU. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR overcomes cisplatin resistance in the triple negative breast cancer cell line HCC38. *BMC Cancer.* 2017;17(1):711.
427. Kern JA, Kim J, Foster DG, Mishra R, Gardner EE, Poirier JT, Rivard C, Yu H, Finigan JH, Dowlati A, Rudin CM, Tan AC. Role of mTOR As an Essential Kinase in SCLC. *J Thorac Oncol.* 2020;15(9):1522-1534.
428. Graham-Gurysh EG, Murthy AB, Moore KM, Hingtgen SD, Bachelder EM, Ainslie KM. Synergistic drug combinations for a precision medicine approach to interstitial glioblastoma therapy. *J Control Release.* 2020;323:282-292.
429. Cipponi A, Goode DL, Bedo J, et al. MTOR signaling orchestrates stress-induced mutagenesis, facilitating adaptive evolution in cancer. *Science.* 2020;368(6495):1127-1131.
430. Leprivier G, Rotblat B. How does mTOR sense glucose starvation? AMPK is the usual suspect. *Cell Death Discov.* 2020;6:27.

431. Masui K, Onizuka H, Cavenee WK, Mischel PS, Shibata N. Metabolic reprogramming in the pathogenesis of glioma: Update. *Neuropathology*. 2019;39(1):3-13.
432. Zhao Y, Hu X, Liu Y, Dong S, Wen Z, He W, Zhang S, Huang Q, Shi M. ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway. *Mol Cancer*. 2017;16(1):79.
433. Buck A, Aichler M, Huber K, Walch A. In Situ Metabolomics in Cancer by Mass Spectrometry Imaging. *Adv Cancer Res*. 2017;134:117-132.
434. Arentz G, Mittal P, Zhang C, Ho YY, Briggs M, Winderbaum L, Hoffmann MK, Hoffmann P. Applications of Mass Spectrometry Imaging to Cancer. *Adv Cancer Res*. 2017;134:27-66.
435. McDonnell LA, Angel PM, Lou S, Drake RR. Mass Spectrometry Imaging in Cancer Research: Future Perspectives. *Adv Cancer Res*. 2017;134:283-290.
436. Sun C, Wang F, Zhang Y, Yu J, Wang X. Mass spectrometry imaging-based metabolomics to visualize the spatially resolved reprogramming of carnitine metabolism in breast cancer. *Theranostics*. 2020;10(16):7070-7082.
437. Pope WB, Prins RM, Albert Thomas M, et al. Non-invasive detection of 2-hydroxyglutarate and other metabolites in IDH1 mutant glioma patients using magnetic resonance spectroscopy. *J Neurooncol*. 2012;107(1):197-205.
438. Kampa JM, Kellner U, Marsching C, Ramallo Guevara C, Knappe UJ, Sahin M, Giampà M, Niehaus K, Bednarz H. Glioblastoma multiforme: Metabolic differences to peritumoral tissue and IDH-mutated gliomas revealed by mass spectrometry imaging. *Neuropathology*. 2020.
439. Lin GL, Wilson KM, Ceribelli M, et al. Therapeutic strategies for diffuse midline glioma from high-throughput combination drug screening. *Sci Transl Med*. 2019;11(519)
440. Jiang SH, Hu LP, Wang X, Li J, Zhang ZG. Neurotransmitters: emerging targets in cancer. *Oncogene*. 2020;39(3):503-515.
441. Lenting K, Khurshed M, Peeters TH, van den Heuvel CNAM, van Lith SAM, de Bitter T, Hendriks W, Span PN, Molenaar RJ, Botman D, Verrijp K, Heerschap A, Ter Laan M, Kusters B, van Ewijk A, Huynen MA, van Noorden CJF, Leenders WPJ. Isocitrate dehydrogenase 1-mutated human gliomas depend on lactate and glutamate to alleviate metabolic stress. *FASEB J*. 2019;33(1):557-571.
442. Brunner AM, Neuberg DS, Wander SA, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations, 2-hydroxyglutarate levels, and response to standard chemotherapy for patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2019;125(4):541-549.
443. Molenaar RJ, Coelen RJS, Khurshed M, Roos E, Caan MWA, van Linde ME, Kouwenhoven M, Bramer JAM, Bovée JVMG, Mathôt RA, Klümper HJ, van Laarhoven HWM, van Noorden CJF, Vandertop WP, Gelderblom H, van Gulik TM, Wilmink JW. Study protocol of a phase IB/II clinical trial of metformin and chloroquine in patients with IDH1-mutated or IDH2-mutated solid tumours. *BMJ Open*. 2017;7(6):e014961.
444. Björkblom B, Jonsson P, Tabatabaei P, Bergström P, Johansson M, Askund T, Bergenheim AT, Antti H. Metabolic response patterns in brain microdialysis fluids and serum during interstitial cisplatin treatment of high-grade glioma. *Br J Cancer*. 2020;122(2):221-232.
445. Forkasiewicz A, Dorociak M, Stach K, Szelachowski P, Tabola R, Augoff K. The usefulness of lactate dehydrogenase measurements in current oncological practice. *Cell Mol Biol Lett*. 2020;25:35.

446. Batsios G, Viswanath P, Subramani E, Najac C, Gillespie AM, Santos RD, Molloy AR, Pieper RO, Ronen SM. PI3K/mTOR inhibition of IDH1 mutant glioma leads to reduced 2HG production that is associated with increased survival. *Sci Rep.* 2019;9(1):10521.
447. Drusian L, Boletta A. mTORC1-driven accumulation of the oncometabolite fumarate as a potential critical step in renal cancer progression. *Mol Cell Oncol.* 2018;6(1):1537709.
448. Kaylani SZ, Xu J, Srivastava RK, Kopelovich L, Pressey JG, Athar M. Rapamycin targeting mTOR and hedgehog signaling pathways blocks human rhabdomyosarcoma growth in xenograft murine model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;435(4):557-61.
449. Houghton PJ, Morton CL, Kolb EA, Gorlick R, Lock R, Carol H, Reynolds CP, Maris JM, Keir ST, Billups CA, Smith MA. Initial testing (stage 1) of the mTOR inhibitor rapamycin by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer.* 2008;50(4):799-805.
450. Geoerger B, Kieran MW, Grupp S, Perek D, Clancy J, Krygowski M, Ananthakrishnan R, Boni JP, Berkenblit A, Spunt SL. Phase II trial of temsirolimus in children with high-grade glioma, neuroblastoma and rhabdomyosarcoma. *Eur J Cancer.* 2012;48(2):253-62.
451. Wagner LM, Fouladi M, Ahmed A, Krailo MD, Weigel B, DuBois SG, Doyle LA, Chen H, Blaney SM. Phase II study of cixutumumab in combination with temsirolimus in pediatric patients and young adults with recurrent or refractory sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2015;62(3):440-4.
452. Yang L, Venneti S, Nagrath D. Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annu Rev Biomed Eng.* 2017;19:163-194.
453. Issaq SH, Mendoza A, Fox SD, Helman LJ. Glutamine synthetase is necessary for sarcoma adaptation to glutamine deprivation and tumor growth. *Oncogenesis.* 2019;8(3):20.
454. Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pagés M, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(1):11-31.
455. Lee P, Malik D, Perkons N, Huangyang P, Khare S, Rhoades S, Gong YY, Burrows M, Finan JM, Nissim I, Gade TPF, Weljie AM, Simon MC. Targeting glutamine metabolism slows soft tissue sarcoma growth. *Nat Commun.* 2020;11(1):498.
456. Reckzeh ES, Waldmann H. Small-Molecule Inhibition of Glucose Transporters GLUT-1-4. *Chembiochem.* 2020;21(1-2):45-52.
457. Sonnenblick A, Venet D, Brohée S, Pondé N, Sotiriou C. pAKT pathway activation is associated with PIK3CA mutations and good prognosis in luminal breast cancer in contrast to p-mTOR pathway activation. *NPJ Breast Cancer.* 2019;5:7.
458. Veiga SR, Ge X, Mercer CA, Hernández-Álvarez MI, Thomas HE, Hernandez-Losa J, Ramón Y Cajal S, Zorzano A, Thomas G, Kozma SC. Phenformin-Induced Mitochondrial Dysfunction Sensitizes Hepatocellular Carcinoma for Dual Inhibition of mTOR. *Clin Cancer Res.* 2018;24(15):3767-3780.
459. Corbet C, Feron O. Cancer cell metabolism and mitochondria: Nutrient plasticity for TCA cycle fueling. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2017;1868(1):7-15.
460. Altman BJ, Stine ZE, Dang CV. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(10):619-34.
461. Paudel BB, Quaranta V. Metabolic plasticity meets gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(9):3370-3372.

462. Allen E, Miéville P, Warren CM, Saghafinia S, Li L, Peng MW, Hanahan D. Metabolic Symbiosis Enables Adaptive Resistance to Anti-angiogenic Therapy that Is Dependent on mTOR Signaling. *Cell Rep.* 2016;15(6):1144-60.
463. Luo G, Liu N. An integrative theory for cancer (Review). *Int J Mol Med.* 2019;43(2):647-656.
464. Jin S, DiPaola RS, Mathew R, White E. Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 3):379-83.
465. Park SY, Choi JH, Nam JS. Targeting Cancer Stem Cells in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2019;11(7):965.
466. Markowska A, Kaysiewicz J, Markowska J, Huczyński A. Doxycycline, salinomycin, monensin and ivermectin repositioned as cancer drugs. *Bioorg Med Chem Lett.* 2019;29(13):1549-1554.
467. Shaaban M, Othman H, Ibrahim T, Ali M, Abdelmoaty M, Abdel-Kawi AR, Mostafa A, El Nakeeb A, Emam H, Refaat A. Immune Checkpoint Regulators: A New Era Toward Promising Cancer Therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2020;20(6):429-460.



**X. értekezés alapját képező közlemények**

1. Petővári, G ; Dankó, T ; Tókécs, AM ; Vetlényi, E ; Krencz, I ; Raffay, R ; Hajdu, M ; Sztankovics, D ; Németh, K ; Vellai-Takács, K; Jeney A; Kulka, J ; **Sebestyén A**: In Situ Metabolic Characterisation of Breast Cancer and Its Potential Impact on Therapy.

CANCERS 12 : (9) Paper: e2492 (2020) **IF: 6.126** \*\*

2. Felkai, L ; Krencz, I ; Kiss, Dorottya J ; Nagy, N ; Petővári, G ; Dankó, T ; Micsik, T ; Khor, A ; Tornóczky, T ; Sági, Z; **Sebestyén, A#** ; Csóka, M#: Characterization of mTOR Activity and Metabolic Profile in Pediatric Rhabdomyosarcoma.

CANCERS 12 : (7) Paper: 1947 (2020) # megosztott levelező szerzők **IF: 6.126** \*\*

3. Krencz, I ; **Sebestyén, A** ; Pápay, J ; Lou, Y ; Lutz, G F ; Majewicz, T L ; Khor, A: Correlation between immunohistochemistry and RICTOR fluorescence in situ hybridization amplification in small cell lung carcinoma.

HUMAN PATHOLOGY 93 pp. 74-80. (2019) **IF: 2.735** \* Független idéző: 1 Független idéző: 3 Összesen: 4

4. Krencz, I## ; **Sebestyén, A##** ; Pápay, J ; Jeney, A ; Hujber, Z ; Burger, C D ; Keller, C A ; Khor, A: In situ analysis of mTORC1/2 and cellular metabolism-related proteins in human Lymphangiomyomatosis.

HUMAN PATHOLOGY 79 pp. 199-207. (2018) ## megosztott első szerzők **IF: 2.74** Független idéző: 2 Független idéző: 4 Összesen: 6

5. Hujber, Z; Horváth, G ; Petővári, G ; Krencz, I ; Dankó, T ; Mészáros, K ; Rajnai, H; Szoboszlai, N ; Leenders, WPJ ; Jeney, A ; **Sebestyén A**: GABA, glutamine, glutamate oxidation and succinic semialdehyde dehydrogenase expression in human gliomas.

JOURNAL OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL CANCER RESEARCH 37 : (1) Paper: 271 (2018) **IF: 5.646** Független idéző: 3 Összesen: 3

6. Petővári, G. ; Hujber, Z. ; Krencz, I. ; Dankó, T. ; Nagy, N. ; Tóth, F. ; Raffay, R. ; Mészáros, K. ; Rajnai, H. ; Vetlényi, E. ; Takács-Vellai K ; Jeney, A ; **Sebestyén, A**: Targeting cellular metabolism using rapamycin and/or doxycycline enhances anti-tumour effects in human glioma cells.

CANCER CELL INTERNATIONAL 18 : (1) Paper: 211 (2018) **IF: 3.439** Független idéző: 3 Független idéző: 1 Összesen: 4

7. Sticz, T; Molnár, A; Márk, Á ; Hajdu, M ; Nagy, N ; Végső, G ; Micsik, T ; Kopper, L ; **Sebestyén, A**: mTOR activity and its prognostic significance in human colorectal carcinoma depending on C1 and C2 complex-related protein expression.

JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY 70 : (5) pp. 410-416. (2017) **IF: 2.894** Független idéző: 11 Független idéző: 3 Összesen: 14

8. Hujber, Z ; Petővári, G ; Szoboszlai, N; Dankó, T; Nagy, N; Kriston, C; Krencz, I ; Paku, S ; Ozohanics, O ; Drahos, Jeney. A ; **Sebestyén A**: Rapamycin (mTORC1 inhibitor) reduces the production of lactate and 2-hydroxyglutarate oncometabolites in IDH1 mutant fibrosarcoma cells.

JOURNAL OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL CANCER RESEARCH 36 : (1) Paper: 74 (2017) **IF: 6.217** Független idéző: 4 Független idéző: 3 Összesen: 7

9. Krencz, I ; **Sebestyén, A** ; Fábrián, K ; Márk, Á ; Moldvay, J ; Khor, A ; Kopper, L ; Pápay, J: Expression of mTORC1/2-related proteins in primary and brain metastatic lung adenocarcinoma.

HUMAN PATHOLOGY 62 pp. 66-73. (2017) **IF: 3.125** Független idéző: 7 Független idéző: 6 Összesen: 13

10. Nagy, N ; Hajdu, M ; Márk, Á ; Király, PA ; Tóth, M ; Dankó, T ; Csóka, M ; **Sebestyén, A**: Growth inhibitory effect of rapamycin in Hodgkin-lymphoma cell lines characterized by constitutive NOTCH1 activation.

TUMOR BIOLOGY 37 : (10) pp. 13695-13704. (2016) **IF: 3.65** Független idéző: 1 Független idéző: 1 Összesen: 2

11. Jeney, A ; Hujber, Z\* ; Szoboszlai, N ; Fullár, A ; Oláh, J ; Pap, É ; Márk, Á ; Kriston, C ; Kralovánszky, J ; Kovalszky, Vékey K, **Sebestyén, A**: Characterisation of bioenergetic pathways and related regulators by multiple assays in human tumour cells.

CANCER CELL INTERNATIONAL 16 : (1) Paper: 4 (2016) **IF: 2.74** Független idéző: 1 Független idéző: 3 Összesen: 4

12. **Sebestyén, A** ; Márk, A ; Hajdu, M ; Nagy, N ; Molnár, A ; Végső, G ; Barna, G ; Kopper, L: Rapamycin can restore the negative regulatory function of transforming growth factor beta 1 in high grade lymphomas.

CYTOKINE 73 : (2) pp. 219-224. (2015) **IF: 2.94** Független idéző: 6 Független idéző: 3 Összesen: 9

13. Nemes, K ; Csóka, M ; Nagy, N ; Márk, Á ; Váradi, Zs ; Dankó, T ; Kovács, G ; Kopper, L ; **Sebestyén, A**: Expression of certain leukemia/lymphoma related microRNAs and its correlation with prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia.

PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 21 : (3) pp. 597-604. (2015) **IF: 1.94** Független idéző: 28 Független idéző: 1 Összesen: 29

14. Márk, Á ; Hajdu, M ; Váradi, Z ; Sticz, TB ; Nagy, N ; Csomor, J ; Berczi, L ; Varga, V ; Csóka, M ; Kopper, L, **Sebestyén, A**: Characteristic mTOR activity in Hodgkin-lymphomas offers a potential therapeutic target in high risk disease - a combined tissue microarray, in vitro and in vivo study.

BMC CANCER 13 Paper: 250 , 12 p. (2013) **IF: 3.319** Független idéző: 19 Független idéző: 3 Összesen: 22

15. Nemes, K## ; **Sebestyén, A##** ; Márk, Á ; Hajdu, M ; Kenessey, I ; Sticz, T ; Nagy, E ; Barna, G ; Váradi, Z ; Kovács, G ; Csóka, M.: Mammalian target of rapamycin (mTOR) activity dependent phospho-protein expression in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL).

PLOS ONE 8 : (4) Paper: e59335 , 11 p. (2013) ##megosztott elsőszerzők **IF: 3.534** Független idéző: 15 Független idéző: 2 Összesen: 17

16. **Sebestyén, A** ; Sticz, TB ; Márk, Á ; Hajdu, M ; Timár, B ; Nemes, K ; Nagy, N ; Váradi, Z ; Kopper, L: Activity and complexes of mTOR in diffuse large B-cell lymphomas-a tissue microarray study.

MODERN PATHOLOGY 25 : (12) pp. 1623-1628. , 6 p. (2012) **IF: 5.253** Független idéző: 7 Független idéző: 8 Összesen: 15

17. Egervári, G ; Márk, Á ; Hajdu, M ; Barna, G ; Sági, Z ; Krenács, T ; Kopper, L ; **Sebestyén, A**: Mitotic lymphoma cells are characterized by high expression of phosphorylated ribosomal S6 protein

HISTOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY 135 : (4) pp. 409-417. (2011) **IF: 2.588** Független idéző: 4 Független idéző: 1 Összesen: 5

18. Végső, G ; Hajdu, M ; **Sebestyén, A**: Lymphoproliferative Disorders After Solid Organ Transplantation-Classification, Incidence, Risk Factors, Early Detection and Treatment Options

PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 17 : (3) pp. 443-454. (2011) **IF: 1.366** Független idéző: 75 Összesen: 75



19.Végső, G ; **Sebestyén, A**; Paku, S ; Barna, G ; Hajdu, M ; Tóth, M ; Járny, J ; Kopper, L: Antiproliferative and apoptotic effects of mycophenolic acid in human B-cell non-Hodgkin lymphomas.

LEUKEMIA RESEARCH 31 : (7) pp. 1003-1008. (2007) <sup>&</sup>levelező szerző **IF: 2.561** Független idéző: 37 Fügő idéző: 3 Összesen: 40

20.Hajdu, M ; **Sebestyén, A** ; Barna, G ; Reiniger, L ; Jánosi, J ; Sréter, L ; Várkonyi, J ; Demeter, J ; Kopper, L: Activity of the notch-signaling pathway in circulating human chronic lymphocytic leukemia cells

SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY 65 : (3) pp. 271-275. (2007) **IF: 1.928** Független idéző: 14 Fügő idéző: 1 Összesen: 15

21.**Sebestyén, A** ; Hajdu, M ; Kiss, L ; Barna, G ; Kopper, L: Smad4-independent, PP2A-dependent apoptotic effect of exogenous transforming growth factor beta 1 in lymphoma cells

EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 313 : (15) pp. 3167-3174. (2007) **IF: 3.695** Független idéző: 10 Fügő idéző: 1 Összesen: 11

22.**Sebestyén, A**; Barna, G ; Nagy, K ; Jánosi, J ; Paku, S ; Kohut, E ; Berczi, L ; Mihalik, R ; Kopper, L: Smad signal and TGF beta induced apoptosis in human lymphoma cells

CYTOKINE 30 : (5) pp. 228-235. (2005) **IF: 2.012** Független idéző: 20 Fügő idéző: 3 Összesen: 23

23.Jánosi, J ; **Sebestyén, A** ; Bocsi, J ; Barna, G ; Nagy, K ; Vályi, Nagy I ; Kopper, L: Mevastatin-induced apoptosis and growth suppression in U266 myeloma cells

ANTICANCER RESEARCH 24 : (3A) pp. 1817-1822. (2004) **IF: 1.395** Független idéző: 23 Összesen: 23

24.Tóth, A ; **Sebestyén, A** ; Barna, G ; Nagy, K ; Göndör, A ; Bocsi, J ; Mihalik, R ; Peták, I ; Houghton, J ; Kopper, L: TGF beta 1 induces caspase-dependent but death-receptor independent apoptosis in lymphoid cells

ANTICANCER RESEARCH 21 : (2A) pp. 1207-1212. (2001) **IF: 1.416** Független idéző: 14 Fügő idéző: 7 Összesen: 21

***Fenti közlemények összesített impakt faktora 79,385 összesített idézettsége 362 Független idézettsége 305***

## **XI. további fontos saját közlemények**

Sarkadi, B ; Mészáros, K ; Krencz, I ; Canu, L ; Krokker, L ; Zakarias, S ; Barna, G ; **Sebestyén, A** ; Pápay, J ; Hujber, Z ; Butz, H ; Darvasi, O ; Igaz, P ; Chinopoulos, C ; Patócs, A: Glutaminases as a Novel Target for SDHB-Associated Pheochromocytomas /Paragangliomas. **CANCERS 12 : (3) Paper: 599 (2020) IF: 6.126 \*\***

Saskói, É ; Hujber, Z ; Nyíró, G ; Likó, I ; Mátyási, B ; Petővári, G ; Mészáros, K ; Kovács, A ; Patthy, L; Supekar, S ; Fan, H; Sváb, G; Tretter, L; **Sebestyén, A** ; Patócs, A; Mehta, A; Vellai-Takács K: The SDHB Arg230His mutation causing familial paraganglioma alters glycolysis in a new Caenorhabditis elegans model.

DISEASE MODELS & MECHANISMS 13 : (10) Paper: dmm0444925 (2020) **IF: 4.651 \*\***

Petővári, G ; Dankó, T ; Krencz, I ; Hujber, Z ; Rajnai, H ; Vetlényi, E ; Raffay, R ; Pápay, J ; Jeney, A ; **Sebestyén, A**: Inhibition of Metabolic Shift can Decrease Therapy Resistance in Human High-Grade Glioma Cells.

PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 26 : (1) pp. 23-33. , 11 p. (2020) **IF: 2.826 \*\*** Független idéző: 3 Fügő idéző: 1 Összesen: 4

Misra, S; Moro, C F ; Del Chiaro, M ; Pouso, S ; **Sebestyén, A** ; Löhr, M ; Björnstedt, M ; Verbeke, C S: Ex vivo organotypic culture system of precision-cut slices of human pancreatic ductal adenocarcinoma.

SCIENTIFIC REPORTS 9 : (1) p. 2133 (2019) **IF: 3.998** \* Független idéző: 11 Fügő idéző: 1 Összesen: 12

Sticz, T ; Molnár, A ; Dankó, T ; Hujber, Z ; Petóvári, G ; Nagy, N ; Végső, G ; Kopper, L ; Sebestyén, A: The Effects of Different mTOR Inhibitors in EGFR Inhibitor Resistant Colon Carcinoma Cells. PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 25 : (4) pp. 1379-1386. (2019) **IF: 2.826** \* Független idéző: 2 Fügő idéző: 1 Összesen: 3

Valcz, G ; Buzás, E I ; Kittel, Á ; Krenács, T ; Visnovitz, T ; Spisák, S ; Török, Gy ; Homolya, L ; Zsigrai, S ;Kiszler, G, Antalffy, G; Pálóczi, K ; Szállási, Z; Szabó, V; **Sebestyén, A** ; Solymosi , N ; Kalmár, A; Dede, K; Lőrincz, P; Tulassay, Z; Igaz, P; Molnár, B: En bloc release of MVB-like small extracellular vesicle clusters by colorectal carcinoma cells.

JOURNAL OF EXTRACELLULAR VESICLES 8 : (1) Paper: 1596668 (2019) **IF: 14.976** \* Független idéző: 3 Fügő idéző: 1 Összesen: 4

Marosvári, D ; Nagy, N ; Kriston, C ; Deák, B ; Hajdu, M ; Bödör, C ; Csala, I ; Bagó, AG ; Szállási, Z ; **Sebestyén, A** ; Reiniger, L: Discrepancy Between Low Levels of mTOR Activity and High Levels of P-S6 in Primary Central Nervous System Lymphoma May Be Explained by PASDomain-Containing Serine/Threonine-Protein Kinase-Mediated Phosphorylation.

JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY 77 : (4) pp. 268-273. (2018) **IF: 3.46** Független idéző: 1 Fügő idéző: 1 Összesen: 2

Mikó, E ; Vida, A ; Kovács, T ; Ujlaki, Gy ; Trencsényi, Gy ; Márton, J ; Sári, Zs ; Kovács, P ; Boratkó, A ; Hujber, Z; Csonka, T; Antal-Szalmási, P; Watanabe, M; Gombos, I; Csóka B; Kiss B; Vígh L; Szabó J; Méhes G, **Sebestyén A**; Goedert JJ, Bai P.: Lithocholic acid, a bacterial metabolite reduces breast cancer cell proliferation and aggressiveness.

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOENERGETICS 1859 : (9) pp. 958-974. (2018) **IF: 4.441** Független idéző: 17 Fügő idéző: 13 Összesen: 30

Nagy, AM ; Fekete, R ; Horváth, G ; Koncsos, G ; Kriston, C ; **Sebestyén, A** ; Giricz, Z ; Környei, Z ; Madarász, E ; Tretter, L: Versatility of microglial bioenergetic machinery under starving conditions.

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOENERGETICS 1859 : (3) pp. 201-214. (2018) **IF: 4.441** Független idéző: 8 Fügő idéző: 2 Összesen: 10

Rajnai, H ; Heyning, FH ; Koens, L ; **Sebestyén, A** ; Andrikovics, H ; Hogendoorn, PCW ; Matolcsy, A ; Szepesi, Á: The density of CD8+ T-cell infiltration and expression of BCL2 predicts outcome of primary diffuse large B-cell lymphoma of bone.

VIRCHOWS ARCHIV 464 : (2) pp. 229-239. (2014) **IF: 2.651** Független idéző: 9 Fügő idéző: 3 Összesen: 12

Pócza, T ; **Sebestyén, A** ; Turányi, E ; Krenács, T ; Márk, Á ; Sticz, TB ; Jakab, Z ; Hauser, P: mTOR Pathway As a Potential Target In a Subset of Human Medulloblastoma.

PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 20 : (4) pp. 893-900. (2014) **IF: 1.855** Független idéző: 7 Összesen: 7

Sápi, Z ; Füle, T ; Hajdu, M ; Matolcsy, A ; Moskovszky, L ; Márk, Á ; **Sebestyén, A** ; Bodoky, G : The activated targets of mTOR signaling pathway are characteristic for PDGFRA mutant and wild-type rather than KIT mutant GISTs.

DIAGNOSTIC MOLECULAR PATHOLOGY 20 : (1) pp. 22-33. (2011) **IF: 2.257** Független idéző: 22 Fügő idéző: 1 Összesen: 23

Kohut, E ; Hajdu, M ; Gergely, P ; Gopcsa, L ; Kilián, K ; Pálóczi, K ; Kopper, L ; **Sebestyén, A:** Expression of TGF beta 1 and Its Signaling Components by Peripheral Lymphocytes in Systemic Lupus Erythematosus.

PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 15 : (2) pp. 251-256. (2009) **IF: 1.152** Független idéző: 12 Összesen: 12

Hajdu, M ; Kopper, L ; **Sebestyén, A:** Notch-Regulation upon Dll4-Stimulation of TGFb-Induced Apoptosis and Gene Expression in Human B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas.

SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY 71 : (1) pp. 29-37. (2010) **IF: 1.935** Független idéző: 7 Összesen: 7

Barna, G ; **Sebestyén, A** ; Chinopoulos, CC ; Nagy, K ; Mihalik, R ; Paku, S ; Kopper, L: TGF beta 1 kills lymphoma cells using mitochondrial apoptotic pathway with the help of caspase-8.

ANTICANCER RESEARCH 22 : (6) pp. 3867-3872. (2002) **IF: 1.447** Független idéző: 11 Független idéző: 4 Összesen: 15

Peták, I ; Mihalik, R\* ; Bauer, PI ; Süli-Vargha, H ; **Sebestyén, A** ; Kopper, L: BCNU is a caspase-mediated inhibitor of drug-induced apoptosis.

CANCER RESEARCH 58 : (4) pp. 614-618. (1998) **IF: 8.37** Független idéző: 23 Független idéző: 8 Összesen: 31

### **összefoglaló és magyarnyelvű közlemények, könyvfejezetek**

Valcz, G; Buzás, E I.; **Sebestyén, A**; Krenács, T ; Szállási, Z ; Igaz, P ; Molnár, B: Extracellular Vesicle-Based Communication May Contribute to the Co-Evolution of Cancer Stem Cells and Cancer-Associated Fibroblasts in Anti-Cancer Therapy.

CANCERS 12 : (8) Paper: 2324 , 16 p. (2020) **IF: 6.126** \*\* Független idéző: 1 Összesen: 1

Krencz, I; **Sebestyén, A** ; Khor, A: mTOR in Lung Neoplasms.

PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 26: (1) pp. 35-48., 14 p. (2020) **IF: 2.826**\*\*

Timár, J; Lapis, K ; Dudás, J ; **Sebestyén, A** ; Kopper, L ; Kovalszky, I: Proteoglycans and tumor progression: Janus-faced molecules with contradictory functions in cancer.

SEMINARS IN CANCER BIOLOGY 12 : (3) pp. 173-186. , 14 p. (2002) **IF: 5.685** Független idéző: 88 Független idéző: 11 Összesen: 99

Mátyási, B ; Farkas, Zs ; Kopper, L ; **Sebestyén, A** ; Boissan, M ; Mehta, A ; Takács-Vellai, K : The Function of NM23-H1/NME1 and Its Homologs in Major Processes Linked to Metastasis.

PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 26 : (1) pp. 49-61. , 13 p. (2020) **IF: 2.826** \*\* Független idéző: 3 Összesen: 3

**Sebestyén, A** ; Kopper, L: A mammalian target of rapamycin (mTOR) és gátlóinak szabályozó szerepe, mellékhatásaik.

ORVOSTOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE 21 : (Augusztusi különszám) pp. 5-13. , 9 p. (2014)

**Sebestyén, A** ; Hujber, Z ; Jeney, A ; Kopper, L: Tumormetabolizmus. KLINIKAI ONKOLÓGIA 3 : (2) pp. 127-134. , 8 p. (2016)

Végső, Gy; **Sebestyén, A** ; Járay, J ; Kopper, L: Rosszindulatú daganatok a szervátültetést követő immunszupprimált állapotban. Malignant tumors in the immunocompromised state following organ transplantation.

ORVOSKÉPZÉS 81 : (3) pp. 235-242. , 8 p. (2006) Független idéző: 1 Összesen: 1

Kopper, L ; **Sebestyén, A:** Rezisztencia és/vagy progresszió - csőd vagy csak megtorpanás? KLINIKAI ONKOLÓGIA 1 : (1) pp. 41-47. , 7 p. (2014)

Hujber, Z ; Jeney, A ; Oláh, J ; Szoboszlai, N ; Baranyai, L ; Környei, J ; Petővári, G ; **Sebestyén, A**: A bioenergetikai profil vizsgálata 14C-glükóz és 14C-acetát oxidációjának összehasonlításával tumorsejtekben és tumoros szervezetben.

MAGYAR ONKOLÓGIA 59 : (4) pp. 292-301. , 10 p. (2015)

Jánosi, J; **Sebestyén, A** ; Mikala, G ; Pető, M ; Jákó, J ; Domján, Gy ; Németh, J ; Kis, Z ; Kopper, L ; Vályi-Nagy, I: Szolúbilis syndecan-1-(CD 138)-koncentráció plazmasejt-dyscrasiákban. Soluble syndecan-1 levels in different plasma cell dyscrasias.

ORVOSI HETILAP 146 : (4) pp. 165-168. , 4 p. (2005) Független idéző: 2 Összesen: 2

Jánosi, J ; **Sebestyén, A** ; Bocsi, J ; Barna, G ; Nagy, K ; Vályi-Nagy, I ; Kopper, L: Apoptózis indukálása mevastatinnal humán U266 myeloma sejtvonalon.

MAGYAR ONKOLÓGIA 48 : (4) pp. 333-337. , 5 p. (2004) Független idéző: 2 Összesen: 2

## **könyvfejezetek**

### **Sebestyén, A**

Metabolizmus - metabolom

In: Kopper, L; Tímár, J; Becságh, P; Nagy, Z (szerk.) Célzott diagnosztika és célzott terápia az onkológiában 4. [4. átd., bőv. kiad.]

Budapest, Magyarország : Semmelweis Kiadó, (2015) pp. 62-63. , 2 p.

### **Sebestyén, A ; Dankó, T**

A sejtenyésztés alapjai, lehetőségei és kihívásai

In: Krenács, Tibor; Bödör, Csaba; Matolcsy, András (szerk.) Patológiai és molekuláris onkodiagnosztikai módszerek : Kézikönyv patológusoknak, kutatóknak, analitikusoknak, asszisztenseknek és a társszakmák képviselőinek

Budapest, Magyarország : Medicina Könyvkiadó Zrt., (2021) pp. 253-263. , 11 p.

### **Sebestyén, A ; Sipos, M ; Krenács, T**

Speciális, in situ fehérjekimutatási módszerek

In: Krenács, Tibor; Bödör, Csaba; Matolcsy, András (szerk.) Patológiai és molekuláris onkodiagnosztikai módszerek : Kézikönyv patológusoknak, kutatóknak, analitikusoknak, asszisztenseknek és a társszakmák képviselőinek

Budapest, Magyarország : Medicina Könyvkiadó Zrt., (2021) pp. 219-226. , 8 p.

### **Sebestyén Anna**

B-sejtek és az apoptózis

In: Kopper, L; Fésűs, L (szerk.) Apoptózis

Budapest, Magyarország : Medicina Könyvkiadó Zrt., (2002) pp. 207-237. , 31 p.

Könyvrészlet/Szaktanulmány/Tudományos

## XII. tudományometriai adatok – az MTMT szerint jóváhagyva

### Sebestyén Anna tudományos és oktatási közleményeinek összefoglalása MTA V. Orvostudományi Osztály (2020.11.25)

Tudományos és oktatási közlemények	Szám		Hivatkozások <sup>1</sup>	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
<b>I. Folyóiratcikk<sup>2</sup></b>	84	---	---	---
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	60	592	707
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	0	0	0
szakcikk, magyar nyelvű	---	10	6	6
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként <sup>3</sup>	---	0	0	0
összefoglaló közlemény	---	12	172	185
rövid közlemény	---	2	56	60
<b>II. Könyv</b>	0	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
<b>III. Könyvrészlet</b>	4	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	4	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	0	0	0
<b>IV. Konferenciaközlemény<sup>4</sup></b>	0	---	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	---	0	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV.)	---	88	826	958
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	88	---	826	958

<b>V. További tudományos művek</b>	1	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkekét és a nem ismert lektorált ságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkekét is	---	0	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	1	6	7
Öltalmak, szabadalmak	---	0	0	0

<b>VI. Hivatkozott absztraktok<sup>5</sup></b>	0	---	0	0
<b>Összes hivatkozás<sup>1</sup></b>	---	---	832	965
<b>Hirsch index<sup>6</sup></b>	19	---	---	---
<b>g index<sup>6</sup></b>	28	---	---	---

Speciális tudományometriai adatok	Szám	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma <sup>2</sup>	16	208
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma <sup>2</sup>	21	210
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (1998) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	75	856
Az utolsó 10 év (2010 - 2020) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	47	402
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	99	10,26%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben	---	20
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő <sup>7</sup>	0	0

#### Megjegyzések:

1. a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli, a WoS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott adatok
2. lektorált, tudományos folyóiratban
3. a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja
4. konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben
5. nem-hivatkozott absztrakt itt nem kerül az összesítésbe
6. a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli összes hivatkozással számolva. A Hirsch és a g index definíciója
7. közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények hivatkozottsága külön értékelendő, és nem számítható be az összesített hivatkozások közé

n.a. = nincs adat

Készült: 2020. november 25. 13:30



## XII. Rövidítésjegyzék

AEC	adenilát energiatöltés
2DG	2-dezoxi-glükóz
2-HG	2-hidroxi-glutarát
3BP	3-brómpiruvát
4E-BP	4E kötő fehérje (4E-BP1: 1-es típus)
AB	Alamar Blue
ABC-DLBCL	aktivált B sejtes diffúz nagy B sejtes lymphoma
ACC	acetyl-koenzim A-karboxiláz
ACLY	ATP-citrát-liáz
ACSS2	acetyl-koenzim A-szintetáz 2
$\alpha$ -KG	$\alpha$ -ketoglutarát
$\alpha$ -KGDH	$\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz
AKT	v-akt egér thymoma virális onkogén homológ; szerin/treonin kináz
ALDH	aldehyd-dehidrogenáz
ALL	akut lymphoid leukaemia
ALCL	anapláziás nagy sejtes lymphoma
AML	akut myeloid leukaemia
AMPK	adenozin-monofoszfát-aktiválta kináz
AMPK $\beta$	adenozin-monofoszfát-aktiválta kináz b
ATCC	„American Type Culture Collection”
ATG13	„autophagy-related protein 13”
ATM	„ataxia telangiectasia-mutated protein kinase”
ATP	adenozin-trifoszfát
ATRX	X-kromoszómához kapcsolt alfa-talasszémia/mentális retardáció
BCR	B sejt receptor
BEZ	NVP-BEZ235 (PI3K és mTOR dual inhibitor)
BMS	BMS-303141 (ATP citrát-liáz inhibitor)
BL	Burkitt lymphoma
BPTES	bisz-2-(5-fenilacetamido-1,3,4-tiadiazol-2-il) etil szulfid
BRCA1/2	„breast cancer gene 1/2”
BSM	bronchiális sima izom sejtek
CAD	karbamil-foszfo-transzferáz
CB-839	2-(piridin-2-il)-N-(5-(4-(6-(2-(3-(trifluorometoxi) fenil) acetamid) piridazin-3-il) butil)-1, 3, 4-tiadiazol-2-il)-acetamid
CD36	„cluster of differentiation 36, platelet glycoprotein 4, fatty acid translocase (FAT)”
CD44	„cluster of differentiation 44”
CDK4/6	ciklin-dependens kináz 4/6
Chl	chloroquine (autofágia inhibitor)
CI	kombinációs index
CLL	krónikus lymphocytás leukémia
c-Met	receptor tirozin kináz protoonkogén
c-Myc	celluláris myelocytomatosis onkogén
COXIV	„Cytochrome C Oxidase Subunit IV Isoform”
CPT1A	karnitin-palmitoil-transzferáz 1 A
CXC	kemokin
CS	citrát szintáz
DAB	3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid
DCA	diklór-acetát
DCIS	ductalis <i>in situ</i> carcinoma
DEPTOR	„DEP domain containing mTOR-interacting protein”
DLBCL	diffúz nagy B sejtes lymphoma
DMFS	távoli metasztázis mentes túlélés
DMSO	dimetil-szulfoxid

DNS	dezoxiribonukleinsav
Doxo	doxorubicin
Doxy	doxycycline
ECAR	extracelluláris savasodás
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
eIF4E	eukarióta iniciációs faktor 4 E
EMT	epithelialis-mesenchymalis transzformáció
ER	ösztrogén receptor
ERK	extracelluláris szignál-regulált kináz
ETC	elektron transzportlánc
Etom	etomoxir (CPT1A inhibitor)
FADH2	redukált flavin-adenin-dinukleotid
FAS	zsírsav-szintáz
FAT	FRAP, ATM, TRRAP mTOR domén
FATC	C-terminuson elhelyezkedő FAT domén
FBS	fötális borjúsavó
FBXW7	F-box/WD ismétlődéseket tartalmazó protein 7
FDA	„Food and Drug Administration”
FGF	fibroblaszt növekedési faktor
FGFR	fibroblaszt növekedési faktor receptor
FISH	fluoreszcens in situ hibridizáció
FKBP12	12 kDa-os FK506-ot kötő fehérje
FL	follikuláris lymphoma
FOXO1/3a	„Forkhead Box O1/3a”
FRAP	FKBP12-rapamycin-asszociált fehérje
FRB	FKBP12-rapamycin kötő domén
FUM	fumarát
GAB	glutamináz B
GABA	gamma-amino-vajsav
GAC	glutamináz C
GAM	glutamináz M
GAPDH	glicerín-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GATOR1	„GAP activity toward Rags 1”
GATOR2	„GAP activity toward Rags 2”
GC	csíráköpont
GDC	GDC-0068 (pan-Akt inhibitor)
GIST	gastrointestinális strómális tumor
GLS	glutamináz
GLU	glutamát
GLUT	glükóz transzporter (GLUT1: 1-es típus)
GnRH	„gonadotropin-releasing hormon”
GS	glutation-szintáz
GSH	glutation tripeptid
GSI	gamma-szekretáz inhibitor
GSK3b	glikogén-szintáz-kináz 3 b
H3	hiszton 3
HEAT	Huntington, elongációs faktor 3, PR65/A
HER2	humán epidermális növekedési faktor receptor 2
HIF-1	hipoxia indukálta faktor 1 $\alpha$ transzkripció faktor
HL	Hodgkin lymphoma
HK2	hexokináz 2
HOPS	„homotypic fusion and vacuole protein sorting complex”
HR	hormon receptor
hTERT	telomeráz reguláció elmarad
IDH	izocitrát-dehidrogenáz (IDH1: 1-es típus)



IGF-1	inzulinszerű növekedési faktor-1
IGF1R	inzulinszerű növekedési faktor-1 receptor
IHC	immunhisztokémia
IL8	interleukin 8
IRS	insulin receptor szubsztrát
IRS-1	insulin receptor szubsztrát 1
KD	kináz domén
KGA	vese-típusú glutamináz
KO	knock out
LAC	laktát
LAM	lymphangiolyomatosis
LC3	„(microtubule-associated protein 1A/1B-)light chain 3”
LCIS	lobularis <i>in situ</i> carcinoma
LC-MS	folyadék kromatográfia-tömegspektrometria
LDHA	laktát-dehidrogenáz A
LDHB	laktát-dehidrogenáz B
L-DON	6-diazo-5-oxo-L-norleucine
LGA	máj-típusú glutamináz
LOH	loss-of-heterogeneity
LumA	luminális A szubtypusú emlő carcinoma
LumB	luminális B szubtypusú emlő carcinoma
MAL	malát
MCL	köpenysejtes lymphoma
MCT	monokarboxilát transzporter (MCT1: 1-es típus)
MDH	malát dehidrogenáz
MET	mesenchymális-epitheliális tranzíció
mIDH	izocitrát-dehidrogenáz mutáció
mLST8	„mammalian lethal with SEC13 protein 8”
MPA	mycophenolsav
MRM	többszörös reakciófigyelő módszer
mRNS	hírvivő RNS
mSIN1	„mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1”
MTHFD2	metil-tetrahidro-folát-reduktáz
mTOR	„mammalian target of rapamycin”
mTORC1	mTOR komplex 1
mTORC2	mTOR komplex 2
mTORI	mTOR inhibitor
MYC	MYC proto-onkogén
MYCL	MYCL proto-onkogén
MYCN	MYCN proto-onkogén
MZL	marginális zóna lymphoma
NADH	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADK	NAD kináz
NADPH	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NEXT	csonka Notch receptor
NICD	Notch intracelluláris domén
NOS	másképp nem csoportosítható
OCR	oxygen consumption rate
OS	teljes túlélés
OXPHOS	oxidatív foszforiláció
OVS	overall survival
PARP	poli-(ADP-ribóz)-polimeráz
PDGF	vérlemezske-eredetű növekedési faktor
PDGFR $\alpha$	vérlemezske-eredetű növekedési faktor receptor $\alpha$
PDK1	foszfatidil-inozitol dependens kináz-1

PD-L1	programozott sejthalál ligand-1
PET-CT	pozitron emissziós tomográfia-computer tomográfia
PFK2	foszfofruktokináz-2
PFKP	foszfofruktokináz P
PHD	prolil hidroxiláz
PI3K	foszfatidil-inozitol-3-kináz
PIP3	foszfatidil-inozitol-3,4,5-trifoszfát
PKC $\alpha$	protein kináz C $\alpha$
PKM2	piruvát-kináz M2 izoforma
PLA	proximity ligation assay
PP	PP242 (mTORC1 és mTORC2 inhibitor)
PPAR $\gamma$	„peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ ”
PR	progeszteron receptor
PRAS40	„proline-rich Akt substrate of 40 kDa”
PROTOR1/2	„protein observed with rictor 1 and 2”
PTEN	„tensin homolog deleted on chromosome 10”
PYR	piruvát
R132H	IDH misszensz funkciónyeréses mutáció
Rab7	„Ras-related protein 7”
Rac1	„Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1”
Rag	„Ras-related GTP binding protein”
Rap1	„Ras-associated protein 1”
Rapa	rapamycin (mTORC1 inhibitor)
RAPTOR	„regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin”
RAS	„rat sarcoma viral oncogene homolog”
RB	„retinoblastoma”
REDD1	„regulated in development and DNA damage responses 1”
Rheb	„Ras homolog enriched in brain”
RICTOR	„rapamycin-insensitive companion of mTOR”
RNS	ribonukleinsav
ROS	reaktív oxigén gyök
RR	relative risk
RRM2	ribonukleotid reduktáz M2
RSK	riboszómális S6 kináz
S6	riboszómális S6 fehérje
S6K1	riboszómális S6 kináz 1
SAM	S-adenozilmetionin
SAMTOR	„S-adenosyl-L-methionine-binding protein of mammalian target of rapamycin”
SCD1	sztearol koenzimA deszaturáz-1
SCID	súlyos kombinált immunhiány
SCLC	kis sejttes tüdő carcinoma
SCS	szukcinát-szintáz
SGK1	szérum-, glükokortikoid indukált proteon kináz-1
SKAR	„S6K1 Aly/REF-like target”
SLC1A5	„Solute Carrier Family 1 Member 5”
SLC7A5	„Solute Carrier Family 7 Member 5”
SRB	szulfrodamin B
SREBP	„sterol regulatory element-binding protein 1”
SUC	szukcinát
T-ALL	T-sejttes akut lymphoid leukémia
TCA	citromsavciklus
TGF $\alpha$	transzformáló növekedési faktor $\alpha$
TGF $\beta$	transzformáló növekedési faktor $\beta$
TMA	szöveti multi blokk
TMZ	temozolomide

TN	tripla negatív (emlő carcinoma)
TNF $\alpha$	tumor nekrosis faktor $\alpha$
TP53	tumor protein 53
TRRAP	„transformation/transcription domain-associated protein”
TSC1/2	„tuberous sclerosis proteins 1/2”
ULK1	„uncoordinated 51-like kinase 1”
UVRAG	„UV radiation resistance-associated gene”
VEGF	vaszkuláris növekedési faktor
VEGFR2	vaszkuláris növekedési faktor receptor 2
Wnt	„wingless-related integration site”
WZB117	„3-Fluoro-1,2-phenylene bis(3-hydroxybenzoate)”