

Az mTOR kináz aktivitás meghatározása, a rapamycin kezelési lehetőségének vizsgálata gyermekkori akut lymphoid leukémiában

Doktori értekezés

Dr. Nemes Karolina

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Csóka Monika, egyetemi docens, Ph.D.
Konzulens: Dr. Sebestyén Anna, tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Hivatalos bírálók:
Dr. Hegyesi Hargita, tudományos főmunkatárs, Ph.D.
Dr. Kiss András, egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Demeter Judit, egyetemi tanár, D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Tordai Attila, főorvos, Ph.D.
Dr. Kriván Gergely, osztályvezető főorvos, Ph.D.

Budapest
2013

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS	7
1.1. <i>Gyermekkori akut lymphoid leukémia</i>	7
1.1.1. <i>Gyakoriság, klinikai kép</i>	7
1.1.2. <i>Diagnosztika, besorolás</i>	7
1.1.3. <i>Kezelés</i>	10
1.1.4. <i>Túlélés</i>	14
1.2. <i>Célzott terápia gyermekkori ALL-ben</i>	14
1.3. <i>mTOR (mammalian target of rapamycin) kináz</i>	18
1.3.1. <i>Funkció, felépítés</i>	18
1.3.2. <i>Az mTOR jelátviteli útvonal</i>	19
1.3.2.1. <i>mTOR aktivitás akut lymphoid leukémiában</i>	23
1.3.3. <i>mTOR gátlók</i>	24
1.3.3.1. <i>mTOR gátlás akut lymphoid leukémiában</i>	27
1.4. <i>MikroRNS-ek</i>	29
1.4.1. <i>MikroRNS-ek tumorbiológiai jelentősége</i>	29
1.4.2. <i>MikroRNS-ek expressziója hematológiai malignitásokban, ALL-ekben</i> ...	30
1.4.3. <i>Saját munkánkban vizsgált mikroRNS-ek</i>	32
2. CÉLKITŰZÉSEK	35
3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK	36
3.1. <i>Betegek</i>	36
3.2. <i>Primer ALL sejtek izolálása</i>	42
3.3. <i>Sejtvonalak, tenyésztés, kezelések</i>	42
3.4. <i>Apoptózis vizsgálat áramlási citometriával</i>	43
3.5. <i>Western-blot</i>	43
3.6. <i>ELISA vizsgálat</i>	44
3.7. <i>Immuncitokémia</i>	45
3.8. <i>MikroRNS izolálás, cDNA átírás</i>	45
3.9. <i>Valós idejű PCR</i>	46
3.10. <i>Statisztikai módszerek</i>	47
4. EREDMÉNYEK	48

4.1. Az <i>mTOR</i> jelátviteli útvonal aktivitásának vizsgálata.....	48
4.1.1. Az <i>mTOR</i> jelátviteli útvonal aktivitásának vizsgálata humán ALL sejtvonalakban és izolált gyermekkori ALL sejtekben.....	48
4.1.2. Gyermekkori ALL-es betegek <i>mTOR</i> aktivitásának és klinikai adatainak összefüggése.....	52
4.1.3. Az <i>mTOR</i> aktivitás vizsgálata a kezelés közben gyűjtött követéses ALL mintákból izolált mononukleáris sejtekben.....	56
4.1.4. Az <i>mTOR</i> aktivitás kimutatása gyermekkori ALL-es mintákban áramlási citometriával.....	57
4.1.5. A rapamycin apoptózis indukáló hatása kemoterápiás szerekkel humán ALL sejtekben.....	58
4.1.6. A rapamycin csökkenti az <i>mTOR</i> aktivitás függő foszforilált fehérjék mennyiségét humán ALL és lymphoma sejtekben.....	60
4.2. MikroRNS expresszió vizsgálatok.....	63
4.2.1. MiRNS expresszió vizsgálatok humán leukémia sejtvonalakban.....	63
4.2.2. Gyermekkori ALL-es betegek miR 128b expressziójának és klinikai adatainak, prognosztikai tényezőinek vizsgálata.....	65
4.2.3. Perifériás vérből és csontvelőből izolált MNC sejtek miRNS expresszió változásának vizsgálata a betegek követéses mintáiban.....	67
5. MEGBESZÉLÉS.....	69
5.1. <i>mTOR</i> aktivitás vizsgálatok.....	69
5.2. MikroRNS expresszió vizsgálatok.....	72
5.3. MiRNS expresszió és <i>mTOR</i> aktivitás vizsgálatok eredményeinek érdekes, további vizsgálatokat igénylő összefüggése.....	74
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	75
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	77
8. SUMMARY.....	78
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	79
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	97
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	100

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

4EBP1: eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1

AID: activation-induced cytidine deaminase

AKT: v-akt egér thymoma virális onkogén homológ

ALCL: anapláziás nagy sejtes lymphoma

ALL: akut lymphoid leukémia

AML: akut myeloid leukémia

AMPK: AMP aktivált protein kináz

ATG13: mammalian autophagy-related gene 13

BAK: BCL2-antagonist/killer 1

BAX: BCL2-associated X protein

BCL2: B-cell lymphoma-2 protein

BCL-xL: B-cell lymphoma-extra large protein

BCP-ALL: prekursor-B sejtes akut lymphoid leukémia

BCR-ABL1: B-sejt receptor – Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 fúziós fehérje

cAMP: ciklikus adenzin monofoszfát

CDKN2A: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

CDK-2: cyclin-dependent kinase-2

CEBPA: CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) α

c-Myc: v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog

CRLF2: cytokine receptor-like factor 2

CXCR4: CXC chemokine receptor 4

DEPTOR: DEP domain containing mTOR-interacting protein

DLBCL: diffúz nagy B-sejtes lymphoma

EGFR: epidermális növekedési faktor receptor

eIF4B: eukaryotic initiation factor 4B

eIF4E: eukaryotic initiation factor 4E

E2F1: E2F transcription factor 1

EPHA2: Ephrin type-A receptor 2

ERK: extracellular signal-regulated kinase

ETV6-RUNX1: Ets variant 6 – Runt-related transcription factor 1 fúziós fehérje

FBXW7: F-box/WD repeat-containing protein 7

FIB200: focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa
FKBP12: FK506 kötő fehérje 1A, 12 kDa
FLT3: Fms-like Tyrosine Kinase
FOXO: Forkhead box fehérje
FOXP1: Forkhead box P1
FRB-domén: FK506-rapamycin kötő domén
GβL: G protein b subunit-like protein
GRα: glucocorticoid receptor α
HD methotrexate: magas dózisú methotrexate
HEAT: for Huntingtin, EF3, A subunit of PP2A, TOR1
HIF-1α: hipoxia indukálta faktor-1 α
HSP: Hősokk fehérjék
HOX11L2: TLX3/T-cell leukemia homeobox 3
HOX11: TLX1/T-cell leukemia homeobox 1
IGF: insulinszerű növekedési faktor
IGF-1R: inzulinszerű növekedési faktor receptor 1
IKZF1: IKAROS family zinc finger 1 gene
IRS: inzulin receptor szubsztrát
IRF4: interferon regulatory factor 4
JAK1: Janus kináz 1
JNK2: c-jun-N-terminal kinase 2
K-RAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LEF1: lymphoid enhancer-binding factor-1
LKB1: liver kinase B1
LMO2: LIM domain only 2
MAPK: mitogen-activated protein kinase
MCL-1: myeloid cell leukemia-1
MEF2C: myocyte enhancer factor 2C
MEK: mitogen-activated protein kinase kinase
MFI: átlagos fluoreszcencia intenzitás
MLL-AF4: mixed-lineage leukemia-AF4/FMR2 family, member 4 fúziós gén
mLST8: mammalian lethal with sec-13 protein 8
mSin1: mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1
mTOR: mammalian target of rapamycin

mTORC1: mTOR komplex 1
mTORC2: mTOR komplex 2
NF1: neurofibromatosis type 1
NFIA: Nuclear factor I/A
NFKB1 nuclear factor κ B
NHL: non-Hodgkin lymphoma
N-RAS: neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog
NUP214-ABL1: nuklear pore complex protein 241 kDa-Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 fúziós gén
OS: overall survival, teljes túlélés
PDCD4: programmed cell death 4
PDK1: foszfatidilinositol-dependent kinase 1
PE38: Pseudomonas exotoxin
PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 α
Ph+ ALL: Philadelphia kromoszóma pozitív akut lymphoid leukémia
PI3K: foszfatidilinozitol 3-kináz
PIK3R1: foszfatidilinozitol 3-kináz, szabályozó alegység 1
PIP2: foszfatidilinozitol-biszfoszfát
PIP3: foszfatidilinozitol-triszfoszfát
PKA: protein kináz A
PKB: proteinkináz B
PKC α : protein kináz C α
PMSF: phenyl-methylsulfonyl fluoride
PPAR-g: peroxisome proliferator-activated receptor g
PRAS40: proline-gazdag Akt szubsztrát 40 kDa
PRDM1: PR domain zinc finger protein 1
pre-B-ALL: pre-B-sejtes akut lymphoid leukémia
Protor 1/2: protein observed with Rictor 1/ 2
PTEN: phosphatase and tensin homolog
p70S6K: S6 kináz 70 kDa
p90RSK: p90 riboszómális S6 kináz
RAF: rapidly accelerated fibrosarcoma kinase
RAG: Ras-related GTP-binding protein
Raptor: regulatory associated protein of mTOR

RAS: rat sarcoma homolog
REDD1: Regulated in development and DNA damage response 1
RHEB: Ras homolog enriched in brain
Rictor: rapamycin-insensitive companion of mTOR
RSK1 riboszómális S6 kináz polypeptide 1
S6RP: S6 riboszómális fehérje
SAPK: stress activated protein kinase
SGK1: serum glukocortikoid-regulated kinase 1
SHIP1: foszfatidilinozitol-3,4,5-triszfoszfát 5-foszfátáz
SIN1: stress-activated protein kinase-interacting protein 1
SREBP1/2: sterol regulatory element-binding protein 1/2
STAT-3: signal activator and transducer of transcription-3
STAT-5: signal activator and transducer of transcription-5
TAB1: TGF-beta-activated kinase 1
T-ALL: T-sejtes akut lymphoid leukémia
TCL-1: T-cell leukemia/lymphoma 1A
TCR α : T-sejt receptor α
TFEB: transzkripciós faktor EB
TIAM1: T-cell lymphoma invasion and metastasis 1
TNFAIP3: tumor necrosis factor alpha-induced protein 3
TRAIL: tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRK: receptor tirozin kináz
TSC1/2: tuberous sclerosis 1/2
ULK1: unc-51-like kinase 1
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
YY1: transcription factor Ying-Yang 1

1. BEVEZETÉS

1.1. Gyermekkori akut lymphoid leukémia

1.1.1. Gyakoriság, klinikai kép

Az akut lymphoid leukémia (ALL) a leggyakrabban előforduló gyermekkori malignitás. Az újonnan diagnosztizált gyermekkori daganatok 25%-a, az akut leukémiák 80-85%-a ALL (1). A betegség incidenciája 3/100 ezer 15 év alatti gyermek évente, elsősorban a 2-5 éves korosztályt érinti, és fiúknál valamivel gyakrabban fordul elő, mint lányoknál (fiú:lány – 1,3:1) (2, 3).

Az ALL mind a genetikai, mind a klinikai képet tekintve heterogén betegcsoportot képez, melyben a leukémia sejtek szomatikus mutációk miatt megváltozott proliferációs és differenciálódási programmal rendelkező, éretlen és differenciálatlan B- vagy T-progenitor sejtekből származnak (4, 5). A kontrollálatlan proliferáció következtében a lymphoblastok a csontvelőben felszaporodva kiszorítják a normális vérképző elemeket, pancytopeniát eredményeznek az anemia (sápadtság, általános gyengeség, fáradékonyság, pulzusszám emelkedés, szisztolés zörej), a neutropenia (láz, fertőzésekre való hajlam, nyálkahártya fekélyek) és a trombocytopenia (bőr- és nyálkahártyavérzések) klinikai következményeivel. A leukémia sejtek lymphoid rendszeri- és más parenchymás szervi infiltrációja következtében nyirokcsomó (perifériás, hasi, mediasztinális), lép, és máj megnagyobbodás is jelentkezhet. A klinikai képet színezhetheti az extramedulláris megjelenés a központi idegrendszerben, herékben, petefészekben, vesében, bőrben, szemben, csontokban és ízületekben (jellegzetes csont- és ízületi fájdalom).

1.1.2. Diagnosztika, besorolás

A diagnózis megállapítása, a pontos altípus meghatározása több, egymásra épülő vizsgálat alapján történik. Az anamnézis felvételét, fizikális vizsgálatot követően képalkotó és laboratóriumi vizsgálatokat végzünk a betegeknél. Vérvék és -kenet, csontvelő és liquor vizsgálat – leukémiás infiltráció gyanúja esetén herebiopszia – szükséges a diagnózis felállításához. A liquor vizsgálata a meningealis érintettség kizárása érdekében történik. A perifériás vér, a csontvelő, és a liquor morfológiai (FAB klasszifikáció) vizsgálata mellett, a csontvelői sejtek áramlási citometriai (immunfenotípus, DNS-index), cytogenetikai (kromoszóma számbeli és szerkezetbeli eltérései), és molekuláris genetikai (fúziós gének) vizsgálata teszi lehetővé a pontos altípus meghatározását.

A sejtek morfológiájának jelentősége napjainkban csökkent, mivel az immunfenotípus áramlási citometriás meghatározása gyors, pontos besorolást tesz lehetővé. A cytogenetikai és molekuláris genetikai vizsgálatok segítségével lehetőség nyílik az egyes altípusokat jobban elkülöníteni, ami a prognózis megítélésében, a kezelés megválasztásában döntő jelentőségű (6).

Mivel a leukémia sejteket azok a differenciálódási antigének jellemzik, amelyek szintjén a malignus transzformáció bekövetkezett, monoklonális ellenanyagok és áramlási citometriai módszer segítségével (immunglobulin, intracitoplazmatikus nehézlánc, TdT, CD és HLA-DR sejtfelszíni antigén expresszió meghatározás révén) a betegség pontos immunológiai besorolására nyílik lehetőség. A leukémia sejtek immunfenotípusa alapján megkülönböztetünk prekursor B-ALL-t (~80%), T-ALL-t (~15%) és B-ALL-t (~2%). A prekursor B-ALL-hez tartozik a pre-pre-B-ALL, a common-ALL és a pre-B-ALL. A T-ALL-en belül megkülönböztetünk korai, kortikális és érett T-ALL típust (7).

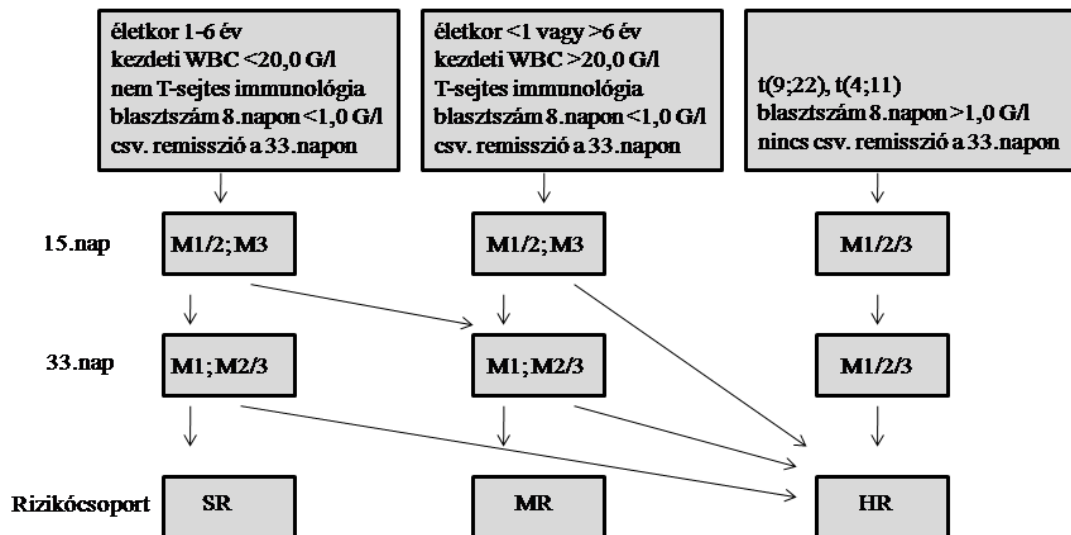
A cytogenetikai és molekuláris genetikai vizsgálatok segítségével azonosíthatók azok a genetikai eltérések, melyeket a lymphoblastok 70-80%-a hordoz. Az eltérések kb. 30%-a kromoszóma transzlokáció (8). Feltételezhetően ezek az eltérések szerepet játszhatnak a leukémia kialakulásának patomechanizmusában protoonkogének aktivációja, illetve tumorszupresszor gének inaktivációja révén. A genetikai eltérések, mint független prognosztikai tényezők megváltoztathatják a betegek prognosztikai besorolását, ami pedig a kezelés szempontjából fontos. Ma már számos olyan genetikai eltérést ismerünk, melyek jelenléte jó (hyperdiploiditás, 4-es, 7-es, 10-es triszómia, ETV6-RUNX1 transzlokáció), illetve rossz (BCR-ABL1, TCF3-PBX1, MLL-AF4, 21-es kromoszóma intrakromoszómális amplifikációja, hypoploiditás) prognózisra utal (6). A leggyakrabban előforduló cytogenetikai eltéréseket az 1. táblázat foglalja össze (4, 7, 9-14).

Ismertek olyan genetikai eltérések is, melyek célzott terápia alapjául szolgálhatnak. A rossz prognózisú, Ph+ ALL-es betegeknél a kemoterápia kiegészítéseként célzottan alkalmazott tirozin-kináz gátlók a túlélési eredmények javulásához vezettek (15).

1. táblázat. Cytogenetikai eltérések gyermekkori ALL-ben (4, 7, 9-14).

Subtípus	Előfordulás	Gyakoriság %	Prognózis	Klinikai jellemző
prekurzor B-ALL				
Hyperdiploiditás (kromoszómaszám >50)	BCP-ALL	35%	jó	a betegek jól reagálnak az antimetabolit kezelésre (8, 10)
ETV6-RUNX1 t(12;21)(q13;q22)	BCP-ALL	25%	jó	a betegek jól reagálnak asparaginase kezelésre, relapszus ritka (8, 10)
Triszómia (4, 7, 10 kromoszóma)	BCP-ALL	20%	jó	a betegek jól reagálnak az antimetabolit kezelésre (16)
TCF3-PBX1 t(1;19)(q23;q13)	pre-B-ALL	10%	rossz	a betegek jól reagálnak a HD methotrexate kezelésre (8, 10)
BCR-ABL1 t(9;22)(q34;q11)	common, pre-B-ALL	2-5%	rossz	Imatinib kezeléssel a túlélési eredmények emelkedtek (>80%) (15, 17)
MLL-AF4 t(4;11)(q21;q23)	pre-pre-B-ALL	2%	rossz	<1évnél gyermekek 70%-ában kimutatható, myeloid antigén koexpresszió (8, 10)
Intrakromozómális amplifikáció (21)	BCP-ALL	3%	rossz	idősebb gyermekeknél, fiatal felnőtteknél gyakoribb előfordulás (18)
Hypodiploiditás (kromoszómaszám <44)	BCP-ALL	2%	rossz	a betegek 90%-a BCP-ALL, gyakori RAS jelút-, IKAROS gén mutáció (14, 19)
T-ALL				
TAL/LMO t(1;14)(p32;q11)/t(1;7)(p32;q34);1p32 del.	T-ALL	15-30%	jó	a betegek jól reagálnak a hiszton deacetyláz gátlókra (12, 20)
HOX11L2 t(5;14)(q35;q32)	T-ALL	20%	rossz	a kezelés reintenzifikálásával a betegek >90% komplett remisszióba kerül (12, 21)
HOX11 t(11;14)(p24;q11)	kortikalis T-ALL	5-10%	jó	gyakori NOTCH mutáció, NOTCH gátlók potenciálisan hatékonyak lehetnek (20, 22)
HOXA inv(7)(p15q34)/t(7;7)(p15;q34)	T-ALL	6%	rossz	a betegek jól reagálnak a hiszton H3K79 metiltransferáz gátlókra (12, 20)
NUP214-ABL1 (9q34 del.)	T-ALL	3%	rossz	a betegek jól reagálnak a tirozin-kináz gátlókra (12, 20)
Újabb gyakori eltérések				
IKZF1 del./mutáció	BCP-ALL	15-30%	rossz	daunorubicin, asparaginase rezisztencia, Ph+ ALL 80%-ban megfigyelhető (5, 23)
JAK1/2 mutáció	BCP-ALL, T-ALL	5-10%	rossz	Down szindrómás- és magas rizikójú betegeknél gyakoribb előfordulás (5, 17, 24)
CDKN2A/B del.	BCP-ALL, T-ALL	30-50%	rossz	relabáló Ph+ ALL-es betegek ~50%-ban-, T-ALL ~ 30%-ban megfigyelhető (5, 20)
CRLF2 overexpresszió	BCP-ALL	5-16%	rossz	Down szindrómás ALL-es betegek >50%-ban megfigyelhető (5)
NOTCH/FBXW7 mutáció	T-ALL	50%	jó/rossz	Felnőttkorban a relapszus megjelenésével-, gyermekkorban jelenlétük a jó prognózissal korrelál (5, 25, 26)
PTEN/P13K/AKT jelátviteli útvonal del., mutáció	T-ALL	50%	rossz	mTOR gátlók potenciálisan hatékonyak (27)
LEF1 del., mutáció	T-ALL	15%	jó	fiatalabb életkorral hozható összefüggésbe (5, 28)

A betegeket a diagnózis felállítását követően a Berlin-Frankfurt-Münster-munkacsoport (BFM) által meghatározott prognosztikai faktorok alapján rizikócsoportokba soroljuk, mely a kezelés intenzitását határozza meg. A legfontosabb prognosztikai tényezők: az életkor, a kezdeti fehérvérsejtszám, az immunfenotípus, a központi idegrendszer esetleges érintettsége, cytogenetikai és molekuláris genetikai eltérések jelenléte, valamint a terápiás válasz. Utóbbi alapja a 8. napi szteroid válasz a perifériás vérben, és a 15. napi, és 33. napi csontvelői minták blaszt száma. Ezek alapján megkülönböztetünk alacsony, közepes és magas rizikójú betegcsoportot – a kemoterápiás kezelés 3 ágának (SR, MR, HR) megfelelően – (1. ábra). A 2010-ben induló protokoll alapján a 15. napi csontvelővizsgálatnak a prognosztikai értéke megemelkedett, alacsony rizikóba történő besoroláshoz a 15. napi blaszt aránynak 0,1% alatt kell lennie. Közepes rizikóról beszélünk 0,1-10% közötti blaszt arány esetében, 10% feletti blaszt aránynál a beteg a nagy rizikójú csoportba kerül (4).



1. ábra. Rizikócsoportok. A betegek BMF (Berlin-Frankfurt-Münster) munkacsoport által felállított rizikócsoportokba történő besorolás kritériumai. WBC: fehérvérsejtszám, csv.: csontvelő, M1: csontvelői blaszt<5%, M2: csontvelői blaszt>5-<25%, M3: csontvelői blaszt>25%, SR: alacsony rizikó, MR: közepes rizikó, HR: magas rizikó. (ALL IC BFM 2002: Classification).

1.1.3. Kezelés

A betegek kezelése 2 évig tart az ALL-BFM terápiás protokollok alapján. Ez egy intenzív (6-8 hónapos), és ezt követő fenntartó (16-18 hónapos) kezelési szakból áll. Az intenzív kezelési szakaszon belül megkülönböztetünk indukciót, konszolidációt és

reindukciót. Valamint a kezelés része a meningeális profilaxis is, mely intrathecalis kemoterápiás kezelést, bizonyos esetekben koponya besugárzást jelent.

Az indukció alapja a kortikoszteroid (prednison) kezelés. A kezelés első hetében a betegek kizárólag per os kortikoszteroid kezelést kapnak. A 8. terápiás napon a perifériás vérben mért abszolút blasztszám határozza meg a szteroid választ, mely az egyik legfontosabb prognosztikai faktor. A továbbiakban a betegek különböző kemoterápiás szerek kombinációját kapják (vincristin, daunorubicin, asparaginase, cytosin-arabioside, cyclophosphamide, 6-mercaptopurin), melynek eredményeképpen a beteg remisszióba kerül. A konszolidáció és meningeális profilaxis során a betegek nagy-dózisú methotrexate (HD-MTX; $5\text{g/m}^2/24\text{h}$) és 6-mercaptopurin kombinációját kapják, valamint intrathecalis methotrexate kezelésben részesülnek. A reindukció során a betegek az indukcióhoz hasonló gyógyszerkombinációt kapnak. A fenntartó kezelés során a betegek a kezelés megkezdésétől számított 2. év végéig részesülnek szájon át methotrexate és 6-mercaptopurin kombinációjában. A protokoll szerinti kezelés a túlélés növekedését, és a központi idegrendszeri recidívák csökkenését eredményezte (29).

A magas kockázatú, rosszabb prognózisú betegek az indukciós kezelést követően intenzív blokk-kezelésben részesülnek, mely során kemoterápiás szerek (szteroidok, vinca alkaloidok, alkiláló, antraciklin, nagy adagú cytosin-arabioside, etoposide, asparaginase) nagy dózisú kombinációját kapják. A kezdeti meningeális érintettségben szenvedő – magas malignitású és T-ALL-es – betegek koponya besugárzást (12-18Gy) is kapnak a későbbi központi idegrendszeri recidíva megelőzésére. A betegek egy részénél (pl. rossz terápiás válasz, Ph+ ALL, recidíva) a kemoterápián kívül allogén őssejt átültetésre is szükség lehet.

A jól megválasztott kezelés ellenére a betegek 20%-ában mégis recidíva jelentkezik, ami a halálozás mintegy 60%-ért felelős (30, 31). A recidív ALL kezelése szempontjából igen fontos, hogy mikor – korai, késői recidíva –, és hol – izolált csontvelői, központi idegrendszeri, tesztikuláris recidíva vagy ezek kombinációja – jelenik meg újból a betegség. A recidív betegek kezelése kemoterápia, sugárkezelés és allogén őssejtátültetés kombinációja.

Sajnos az intenzív kezelés ellenére a betegek 15-20%-át ma sem sikerül meggyógyítani. Ennek hátterében mintegy 60-70%-ban kemoterápia rezisztencia vagy recidíva áll. Ezeknél a betegeknél igen gyakran kromoszóma eltérések [t(9;22)(q34;q11), t(4;11)(q21;q23), hypodiploiditás] figyelhetők meg (29). A rossz kemoterápiás válasz, a betegség recidívája, valamint az agresszívebb kemoterápia miatt jelentkező mellékhatások következtében ezen betegek túlélési eredményei rosszabbak (1, 32). A másik nehézség a

betegek kezelése során (kemoterápia, radioterápia, csontvelőátültetés), és a kezelést követően fellépő mellékhatások. Az túlélők közel 50%-ánál jelentkezik valamilyen krónikus egészségügyi probléma (33). A kezelés során előforduló mellékhatásokat a 2. táblázat foglalja össze (31, 33-35).

2. táblázat. A kezelések leggyakrabban jelentkező mellékhatásai. a. Gyermekkori ALL kezelése során jelentkező mellékhatások kezelési mód szerint. b. A kemoterápia során alkalmazott citosztatikumok leggyakrabban előforduló mellékhatásai. c. A kezelést követően megjelenő mellékhatások relatív rizikója (RR) az ALL-es túlélőkben, a betegek (korban legközelebb lévő) testvéreihez viszonyítva (31, 33-35).

Terápia	Mellékhatás
Kemoterápia	GI mucosa károsodás, gyomorfekély, nekrotizáló enterokolitis, pancreatitis
	infekció (candidiasis, aspergillosis, HZV, HSV, CMV, Pneumocystis carinii), ARDS
	szív-, vese-, májtoxicitás
	osteoporosis, csontnekrózis
	neuropathia
	infertilitás
Sugárkezelés	endokrinológiai eltérések, növekedési retardáció
	infertilitás
	neurokognitív eltérés
Csontvelőtranszplantáció	másodlagos malignitás
	akut, krónikus "graft versus host betegség"
	szív-, vese-, májtoxicitás
	ARDS, pneumonia, nem szíveredetű tüdőödéma
	agyödéma, encephalopathia, trombózis, vérzés
	dermatitis, erythema, epidermolysis, Lyell-szindróma, hiperszenzitív reakció
	infertilitás
	aszéptikus csontnekrózis
	másodlagos daganat

a.

Kemoterápiás szer	Legfontosabb mellékhatások
Prednisolon	Cushing-szindróma, diabetes mellitus, magas vérnyomás, GI vérzés, osteoporosis, aszeptikus csontnekrozis, pszichés labilitás
Vincristin	perifériás neuropathia, myopathia, myelozupresszió, paralytikus ileus, szív- és érrendszeri eltérések, polyuria, dysuria
Daunorubicin	akut és krónikus cardiotoxicitás, kardiomyopathia, myelozupresszió, GI mucosa károsodás, vese- és májtoxicitás, gonadális diszfunkció
L-Asparaginase	allergiás reakció, májtoxicitás, hasnyálmirigy és vese diszfunkció, encephalopathia
Cytosin-arabinoside	myelozupresszió, GI mucosa károsodás, gonadális diszfunkció, ritmuszavar, tüdőödéma, vesediszfunkció, csont és izom fájdalom
Cyclophosphamide	myelozupresszió, vesediszfunkció, karcinogenezis, gonadális diszfunkció, cardiotoxicitás, májtoxicitás, neurotoxicitás
Ifosfamide	mint cyclophosphamid, de jelentősebb a vese-, uro-, és nephrotoxicitás
6-Merkaptopurin	myelozupresszió, máj- és vesediszfunkció, stomatitis, diarrhea
Methotrexate	vese-, és májtoxicitás, encephalopathia, myelozupresszió, gonadális diszfunkció, GI mucosa károsítás, pneumonitis, ARDS
Etoposide	alacsony vérnyomás, allergiás reakció, myelozupresszió, GI mucosa károsodás, neuropathia, májtoxicitás, karcinogenezis

b.

Mellékhatások	RR
csontrendszer	7.7 (2.8-21.3)
szív- és érrendszer	6.9 (4.2-12.9)
idegrendszer	5.3 (3.1-11.4)
vese	4.8 (2.1-18.9)
tüdő	4.2 (2.8-6.6)
másodlagos daganat	4.1 (3.1-5.8)
endokrinológiai szervek	3.1 (2.3-4.5)
hallás	3 (1.5-6.8)
gyomor-bél rendszer	2.2 (1.0-5.0)

c.

A hosszútávú túlélés szempontjából nagyon fontos lenne a lehető leghamarabb kimutatni, ha a beteg nem reagál megfelelően a kezelésre, illetve a betegség újból visszatér. A kezelés hatékonyságának felmérésére a korai időszakban a 8. napi szteroid válasz, a 15. napi, 33. napi, valamint protokoll M előtti csontvelői vizsgálatok nyújtanak felvilágosítást. A betegek követése a flow cytometria, illetve cytogenetikai/molekuláris genetikai vizsgálatokkal történik. Áramlási citometriai módszerrel egyetlen leukémia sejt kimutatható 10^3 - 10^4 hemopoetikus sejt között. A RT-PCR érzékenysége az áramlási citometriához hasonló, újabb vizsgálatok alapján mindkét módszer hatékony a betegek követésére, minimális reziduális betegség (MRD), ill. recidíva kimutatására (4, 36).

Csontvelő vizsgálat ismételt elvégzése szükséges, amennyiben felmerül a betegség recidívájának gyanúja. A csontvelő vizsgálat elvégzése fájdalommal jár, ezért gyermekkorban

altatásban történik. A betegek követése egyszerűbb és kevésbé megterhelő lenne olyan markerek segítségével, melyek korán (akár a klinikai tünetek megjelenése előtt), perifériás vér mintából is tudnának információval szolgálni a betegség visszatérésével kapcsolatban. A kérdés fontosságára utal, hogy rengeteg publikáció jelenik meg évtizedek óta, ami olyan markereket próbál meghatározni, melyek hasznosak lehetnek a prognózis megítélésében, a recidíva korai kimutatásában (37-43).

1.1.4. Túlélés

Napjainkban a kombinált, intenzív kezelés (kemoterápia, központi idegrendszeri és here besugárzás, valamint allogén őssejt átültetés) – a 60-as években 90%-os letalitással járó betegségben szenvedő ALL-es betegek – 80-85%-ban hosszútávú gyógyulást eredményez (11, 44). A rizikócsoportok pontosabb meghatározásának lehetősége, a nemzetközi kezelési protokollok alkalmazása, a javuló szupportációs kezelés, illetve a jobb technikai felszereltség ugyancsak hozzájárult a túlélési eredmények javulásához (45). Ugyanakkor továbbra is nehézséget jelent a relabáló, kezelésre rosszul reagáló betegek kezelése, másrészt a kezelés következtében kialakuló rövid- és hosszútávú mellékhatások. Recidíva esetén a betegek 3 éves túlélése 28-60% a recidíva időpontjától és lokalizációjától függően (29). Egy, 2600 gyermekkori ALL-es túlélőt vizsgáló közlemény szerint a gyógyult betegek mintegy 50%-ában jelentkezett valamilyen krónikus egészségügyi eltérés (46). A betegek túlélési eredményeinek és hosszútávú életminőségének javításához új terápiás lehetőségként a célzott terápia járulhat hozzá.

1.2. Célzott terápia gyermekkori ALL-ben

Az *in vitro*, *in vivo* és fázis kísérletek eredményei azt mutatják, hogy gyermekkori ALL-ben a célzott terápia révén a konvencionálisan alkalmazott szerek dózisa csökkenthető, ami a kezelés toxicitásának csökkenését, a betegek gyógyulási esélyének növekedését eredményezhetné. Célzott terápia alkalmazásával a relapszus ráta is csökkenthető lenne (15, 47-59).

Az első célzott terápiás sikereket CML-ben érték el. Az ABL1 tirozin-kináz – imatinib – szelektív gátlásával, a betegek túlélési eredményei 15%-ról 75%-ra emelkedtek (60). A tirozin-kináz gátlókkal elért sikereket követően, már gyermekkori ALL-ben is számos, potenciálisan alkalmazható gátlószert ismerünk, melyek hatékonyak lehetnek a

konvencionálisan alkalmazott kemoterápia kiegészítéseként a rosszul reagáló betegek kezelésére.

ALL-ben elsősorban a normál B-, illetve T-lymphocyták differenciálódásában, proliferációjában, túlélésében és aktivációjában fontos szerepet játszó jelátviteli útvonalak (RAS/RAF/ERK/JNK, PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT, ABL tirozin-kináz, SRC tirozin-kináz család, NOTCH1, Aurora kináz A/B, DR4, DR5) intermedierjeinek, és sejtfelszíni receptorainak a gátlása merül fel lehetséges célzott terápiás célpontként (17, 61) (3. táblázat).

Gyermekkori ALL-ben alkalmazható célzott terápiák közül kiemelném az mTOR gátlókat. A PI3K/AKT/mTOR jelátviteli útvonal fokozott aktivitása, illetve az mTOR gátlók alkalmazásának lehetősége intenzív kutatások tárgyát képezi napjainkban (27, 50, 61-69).

3. táblázat. Potenciális célzott terápiák gyermekkori ALL-ben (17, 61).

Gátlószertípus	Szer neve	Célmolekulák	Célmolekula által befolyásolt jelutak, funkciók	Klinikai hatékonyság
Onkogén kináz gátlók				
ABL1 gátlók	Imatinib (STI571)	ABL1, cKIT, PDGFR	RAS/RAF/ERK/JNK, PI3K/AKT/mTOR, NFKB1, Abi-2	Ph+ALL
	Dasatinib (BMS-354825)	ABL1, SRC kinázok, cKIT, EPHA2, PDGFR		
	Nilotinib (AMN107)	ABL1, cKIT, PDGFR		
FLT3 gátlók	Lestaurtanib (CEP-701)	FLT-3	RAS/RAF/ERK, PI3K/AKT/mTOR, STAT5	MLL-, T-ALL
	Midostaurin (PKC-412)	FLT-3		
mTOR gátlók	Rapamycin (Sirolimus)	mTORC1 (+/-mTORC2)	4EBP1, S6K, Akt, transzkripció, autofágia, aktin organizáció	B- and T-ALL, Ph+ ALL
	Everolimus (RAD-001)	mTORC1 (+/-mTORC2)		
	Temsirolimus (CCI-779)	mTORC1 (+/-mTORC2)		
PI3K/mTOR gátlók	PI-103	PI3K, mTORC1, mTORC2	4EBP1, S6K, Akt, transzkripció, autofágia, aktin organizáció	B- and T-ALL, Ph+ ALL
	NVP-BEZ235	PI3K, mTORC1, mTORC2		
PI3K gátlók	LY294002	PI3K	AKT/mTOR	B- and T-ALL, Ph+ ALL
Akt gátlók	Perifostine	Akt	mTOR, aktin organizáció	B- and T-ALL, Ph+ ALL
	Tricibine	Akt		
JAK gátlók	ruxolitinib	JAK, IKZF1, CRFL2	RAS/RAF, PI3K/Akt, STAT, IKAROS, IL7R	pre-B-ALL Down szindrómában
Aurora gátlók	Alisertib (MLN8237)	Aurora A, ABL1, FLT-3	G2->M tranzíció, citokinézis, mitózis szabályozás	relabáló ALL, Ph+, FLT-3+ ALL
Multi-kináz gátlók	Sorafenib (BAY439006)	RAF, FLT-3, VEGFR, PDGFR, cKIT, p38 α	RAS/RAF/ERK, PI3K/AKT/mTOR, STAT5	relabáló ALL
TAM tirozin kináz gátlók		Tyro-3, Axl, Mer	RAS/RAF/ERK, AKT/mTOR, p38, STAT6	relabáló ALL
PIM kináz gátlók	SGI-1776	PIM-1	c-MYC, 4EBP1, BAD, p21, p27	B- and T-ALL, Ph+ ALL
Onkogén célmolekulák				
Proteaszóma gátlók	Bortezomib (PS-341)	26S ubiquitin proteaszóma	NFKB1, BCL2, XIAP, JNK, caspase-8	relabáló ALL
Farnesyltransferáz gátlók	Tipifarnib (R115777)	RAS	RAF, MEK, ERK	T-ALL, RAS pozitív leukémiák
Hősokk fehérje gátlók	Tanespimycin (17-AAG)	Hősokk fehérje 90	AKT, RAF	Ph+, FLT3 pozitív leukémiák
	Alvespimycin (17-DMAG)			
Gamma-szekretáz gátló	MK0752, LY450139	Notch1	c-MYC, NFKB1	T-ALL

3. táblázat folytatása. Potenciális target terápiaiák gyermekkori ALL-ben.

Apoptotikus jelút aktiválás				
BCL2 antagonisták	Obatoclox (GX 15-070)	Pan-anti-apoptotikus BCL2	pro-apoptotikus BAX, BAK	relabáló ALL
TRAILR monoklonális antitest	Lexatumumab (ETR2-ST01)	DR5 receptor	caspase-3, -8, -10	relabáló ALL
Survivin gátlók		Survivin	caspases-3, -7	relabáló pre-B-ALL
Epigenetikus célmolekulák				
Hisztón-deacetiláz gátlók	Vorinostat (SAHA)	HDAC	kromatin összerendeződés, fehérjetermelés	relabáló ALL, Ph+ ALL
DNS metiltransferáz gátlók	Decitabine	DNS metiltransferáz	DNS metiláció, kromatin összerendeződés	többszörösen relabáló ALL
Sejtelszíni célmolekulák				
Receptor antagonisták	RCP168 peptid	CXCR4	B-sejt lymphopoiesis, csontvelői myelopoiesis, ERK, PI3K, NFkB1	B-ALL
Monoklonális antitestek (mAb)	Rituximab	CD20	B-sejt	CD20 ⁺ B-ALL
	Epratuzimab	CD22	B-sejt fejlődés	pre-B-ALL, relabáló ALL
	Alemtuzumab	CD52	ismeretlen (70)	CD52 ⁺ pre-B-ALL, T-ALL
Konjugált mAb	CAT8015	CD22	B-sejt fejlődés	CD22 ⁺ ALL, relabáló ALL
	Blinatumomab	CD19	B-sejt érés, fejlődés	CD19 ⁺ pre-B-ALL

1.3. *mTOR (mammalian target of rapamycin) kináz*

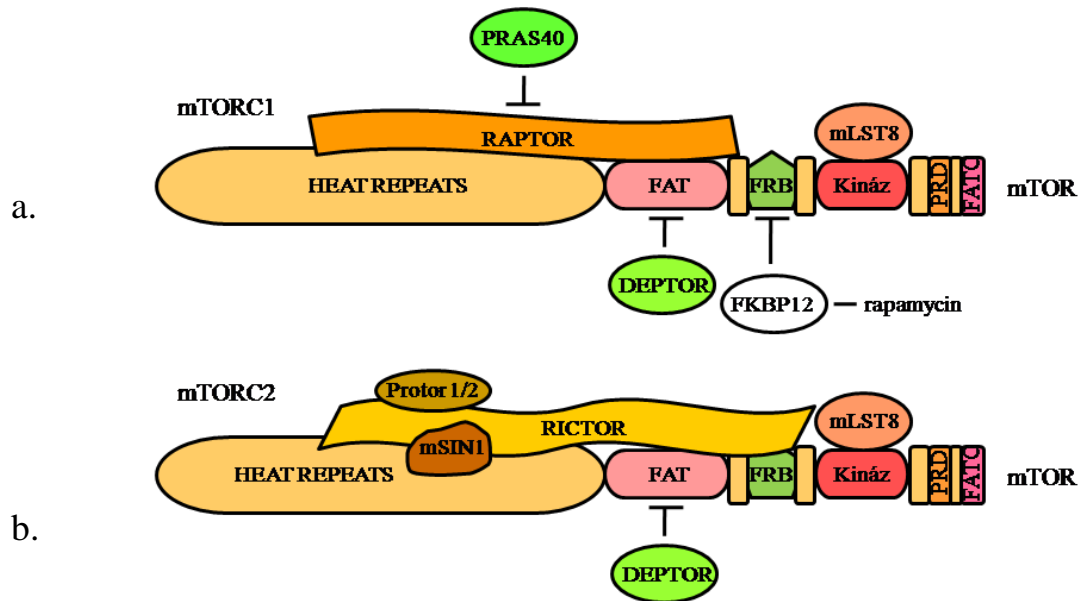
1.3.1. *Funkció, felépítés*

Az mTOR kináz a sejt alapvető funkcióinak központi szabályozójaként, a sejtbe érkező jeleket – növekedési faktor stimuláció, energia- és tápanyag-ellátottság, celluláris stressz – integrálja, és ezek alapján irányítja a sejt működésében fontos folyamatokat: mint a növekedést, proliferációt, túlélést, sejtmotilitást és autofágiát (71).

Az mTOR a foszfatidilinozitol-3 kináz (PI3K) családba tartozó, 289 kD molekulatömegű szerin-treonin kináz. Felépítésére konzervált, szerkezeti domének jelenléte jellemző: N-terminálisan α -hélixek ismétlődéséből felépülő HEAT-repeats szekvenciák, C terminális felé haladva a FAT, kináz (KD), szabályozó (PRD), és FAT C terminális (FATC) domének. A FAT és kináz domén között elhelyezkedő FRB domén jellegzetessége, hogy ebbe a régióba képes bekötődni az mTOR gátló rapamycin és az FKBP12 fehérje által alkotott komplex, ami az mTOR kináz aktivitásának részleges gátlását eredményezi (72) (2. ábra).

Az mTOR két különböző komplexben (mTORC1 és mTORC2) fordul elő, melyek eltérő felépítéssel és funkcióval rendelkeznek. Mindkét komplex esetében megkülönböztetünk általános és specifikus alegységeket. A komplexekre jellemző általános alegységek: az mTOR kináz, az mLST8/G β L és a DEPTOR. Az mLST8 az mTOR kináz doménjéhez (KD) kapcsolódva stimulálja az mTOR komplexek aktivitását, ezen kívül támogatja a Raptor és mTOR közötti kapcsolat kialakulását, és az mTOR tápanyag szenzitivitásában is részt vesz. A DEPTOR az mTOR kináz FAT doménjéhez kapcsolódva mindkét komplex működését képes gátolni (73-75). Az mTORC1 komplex specifikus alegységei a Raptor és PRAS40. A Raptor (regulatory associated protein of mTOR) scaffold fehérjeként az mTORC1 komplex célfehérjeinek (S6K1 és 4EBP1) kötődését segíti elő. A PRAS40 (prolin gazdag AKT szubsztrát) a Raptorhoz kapcsolódva gátolja az mTORC1 komplex aktivitását. Az AKT által foszforilálódva azonban leválik a Raptorról, és hatására az mTORC1 komplex felszabadul a gátlás alól (76). Az mTORC2 komplex specifikus alegységei a Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), az mSIN1, és Protor 1/2. A Rictor és mSIN1 fehérjék alapvető fontosságúak az mTORC2 komplex stabilitásának és integritásának kialakításában. Ezen kívül kötőhelyet biztosítanak az mTORC2 komplex célfehérjeinek, ezáltal támogatják – köztük az AKT (Ser471 helyen történő) – foszforilációjukat. A Protor – melynek két izoformáját (Protor-1, Protor-2) különböztetjük meg – a Rictor fehérjén keresztül kapcsolódik az mTOR kinázhoz. Pontos funkciójával kapcsolatban kevesebb adat áll rendelkezésünkre,

feltételezhetően az SGK1 – mTORC2 komplex célfehérje – aktivációjában játszik szerepet (77, 78) (2. ábra).

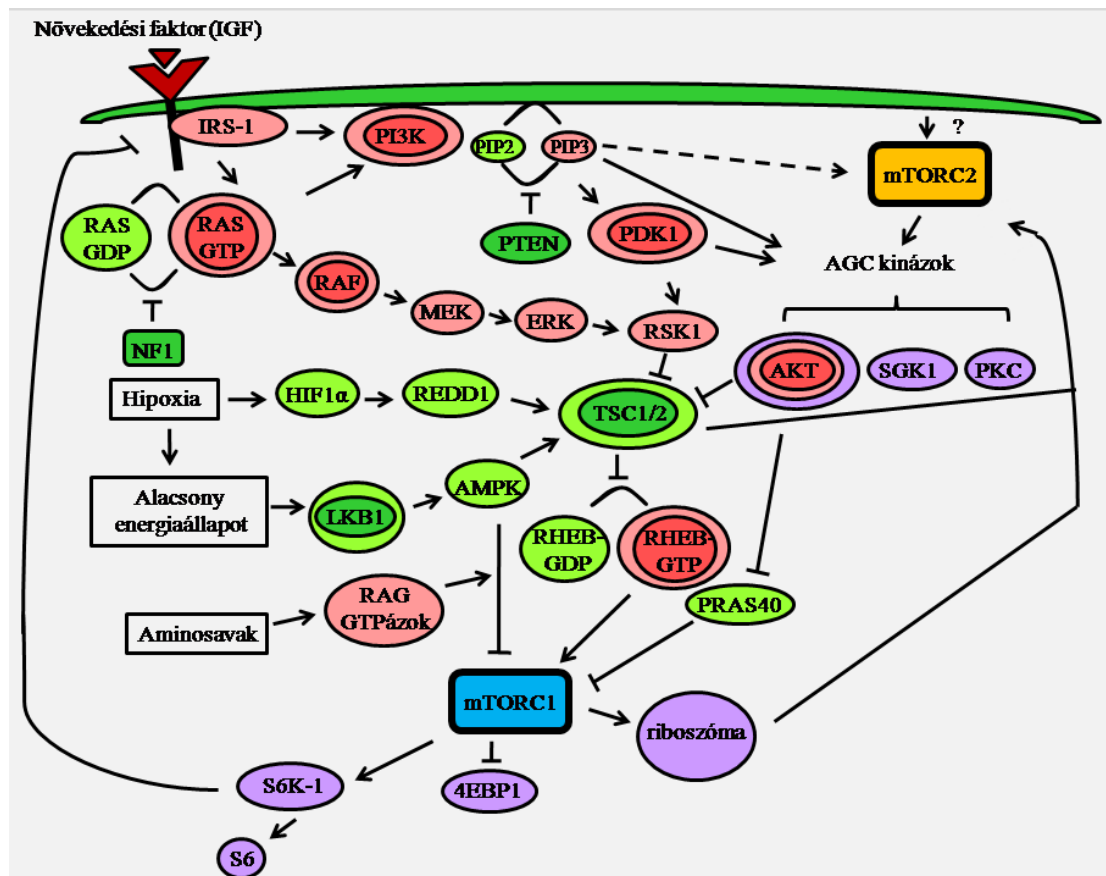


2. ábra. Az mTOR komplexek felépítése. **a.** mTORC1 komplex. **b.** mTORC2 komplex (72, 73, 79).

1.3.2. Az mTOR jelátviteli útvonala

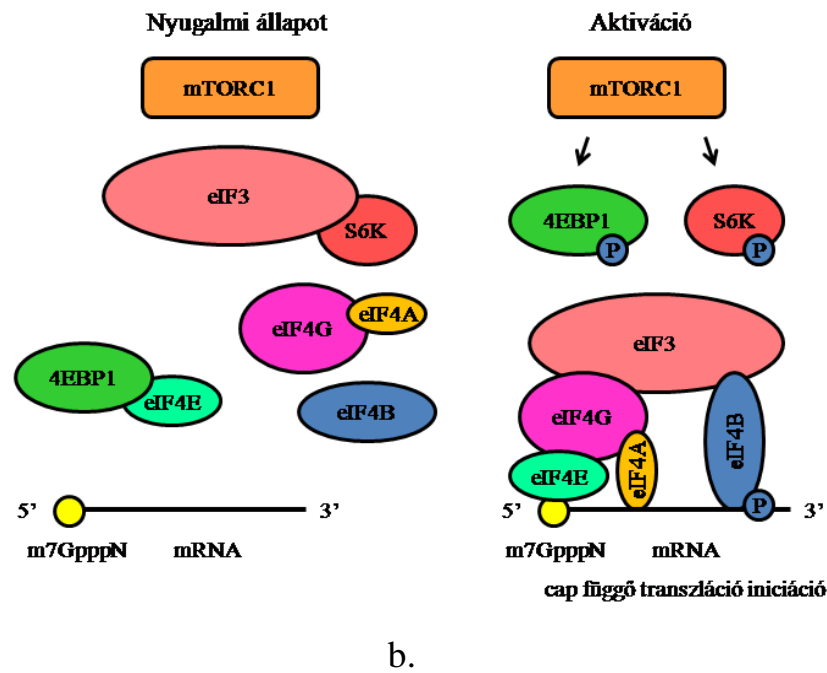
A PI3K/AKT/mTOR jelátviteli útvonala – melynek központi szabályozója az mTOR kináz – aktiválásában különböző növekedési faktorok (IL-7, IGF, EGF, HGF, PDGF) vehetnek részt. A ligandok bekötését követően az aktivált receptor tirozin kináz (RTK) a jelet továbbítja a foszfatidilinozitol-3 kináz (PI3K) felé, ami a foszfatidilinozitol-biszfoszfát (PIP₂) foszfatidilinozitol-triszfoszfáttá (PIP₃) foszforilálásával, a PDK1 kináz aktivációjához vezet. A rendszer fontos gátlója, a tumorszupresszor funkciójú PTEN, ami a PIP₃ defoszforilációja révén képes negatívan szabályozni az útvonala működését. Az aktivált PDK1 kináz a Thr/308-as helyen foszforilálja az AKT-ot, azonban a teljes aktiválásához szükség van az mTORC2 komplex Ser/373-as pozíciójú foszforilációjára is. Az AKT az mTOR jelátviteli útvonala fontos állomása, az előbb említett kettős foszforiláló aktivációja révén képes az mTOR-kináz negatív szabályozó komplexét, a TSC1/2 komplexet gátolni. A TSC1/2 komplex a RHEB fehérjét – mTOR kináz aktiváló fehérje – inaktív, GDP kötött formában tartja, ezáltal nem engedi az mTORC1 komplex aktiválódását (80).

Az mTORC1 komplex aktivitását nemcsak a PI3K/AKT útvonaltól szabályozza. A sejt energetikai állapotának, tápanyag-ellátottságának, illetve a külső stressz hatásoknak (hipoxia, ozmotikus stressz, oxidatív szabad gyökök, vírusos fertőzés) a függvényében változhat a TSC1/2 komplex, illetve mTORC1 aktivitása. A TSC1/2 komplex képes az AKT útvonaltól függetlenül is inaktiválódni, így szabályozó szerepe kiesik, nem gátolja az mTORC1 komplex aktiválódását (81-83). A sejt megfelelő aminosav-ellátottsága a RAG GTP-ázok foszforilációjához vezet, melyek a RHEB közvetítésével eredményezik az mTORC1 aktivációját (84). A hipoxia, mint külső stressz hatás – a REDD1 expresszióját fokozva –, illetve a sejt alacsony energia állapotát érzékelő AMPK kináz a TSC1/2 komplex aktiválásán keresztül gátolják az mTORC1 komplexet. Az AMPK kináz közvetlenül is képes a Raptor fehérje foszforilálása révén az mTORC1 komplexet inaktiválni (85, 86) (3. ábra).



3. ábra. Az mTOR jelátviteli útvonaltól szabályozása. Színjelentés: rózsaszín – aktiváló jelátviteli útvonaltól; világoszöld – gátló jelátviteli útvonaltól; sötét piros – onkogének; sötétzöld – tumorszuppresszor gének; lila – mTOR célfehérjék; aktiváció – nyíl (↑); gátlás – lezárt talpas nyíl (⊥) (73, 87, 88).

Az aktivált mTORC1 komplex foszforilálja – a fehérjeszintézisben központi szerepet játszó – direkt célfehérjéit: az riboszomális S6 kináz 1-et (S6K1) és a 4E-kötő fehérjét (4EBP1). Az S6K1 foszforilálatlan, inaktív formában az eIF3-mal komplexet alkot, aktivációját követően leválik az eIF3-ról, és foszforilálja a riboszomális S6 fehérjét, mely a riboszóma bioszintézisében vesz részt, illetve az eIF4B-t. A 4EBP1 foszforiláló inaktivációja során felszabaduló eIF4E iniciációs faktor, az eIF4G-vel, a p-eIF4B, eIF4A-val és az eIF3-mal összekapcsolódva a cap függő translációért felelős (4. ábra) (89).

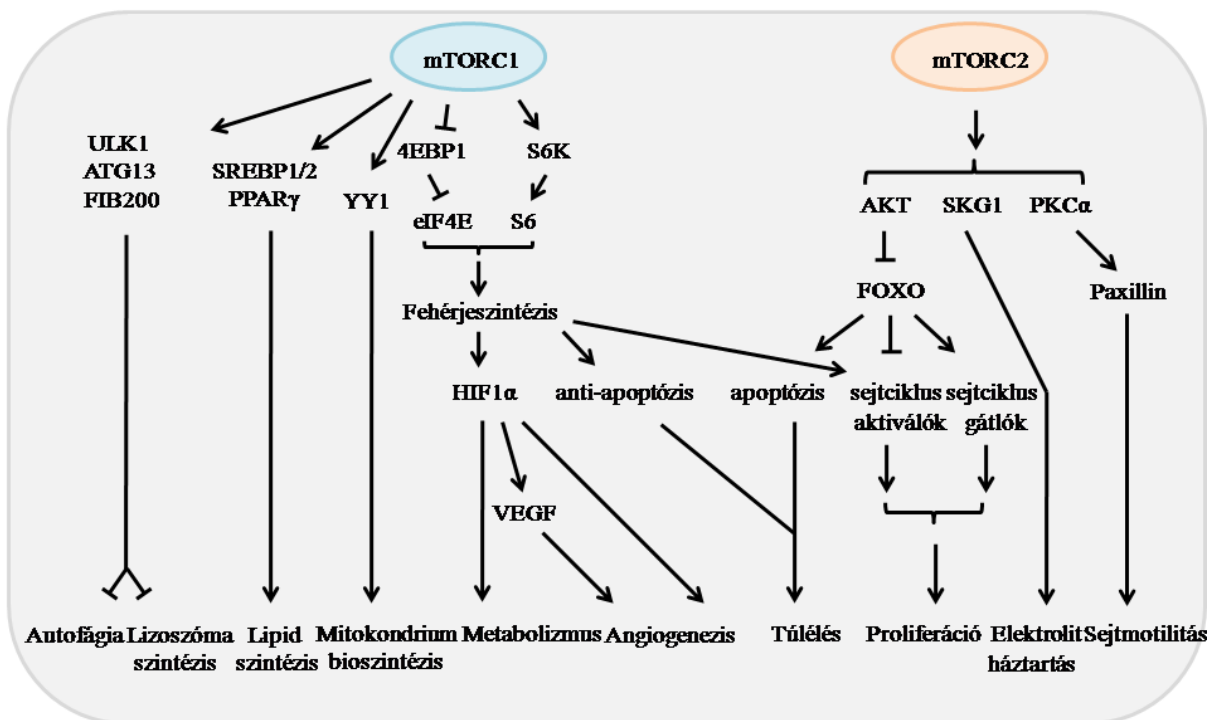


4. ábra. Az mTORC1 komplex két direkt célfehérjéjének aktivációja. **a.** Inaktivált, **b.** aktív mTORC1 komplex (89).

Az mTORC1 a sejt növekedésének központi regulátoraként – a fehérjetermelés szabályozása mellett – számos olyan folyamatot irányít, melyek a sejt megfelelő tápanyag- és energia-ellátásának biztosításához szükségesek, illetve a sejt túlélését segítik. A zsírsavak és a koleszterin szintéziséhez elengedhetetlen génterületek aktiválódásában szerepet játszó transzkripciós faktorok (SREBP1/2, PPAR γ) átírását fokozva, az mTORC1 hozzájárul a sejt megfelelő energia-ellátottságához (90, 91). A sejt metabolizmusának szabályozásában a HIF-1 α expressziójának fokozásával – a glikolízisben szerepet játszó gének átírását támogatva – vesz részt. Ezen kívül a mitokondrium bioszintézis és oxidatív folyamatok szabályozóit – PGC-1 α és YY1 transzkripciós faktorok – aktiválva, a mitokondriumban zajló oxidatív metabolizmust fokozza (90, 92). Az aktivált mTORC1 komplex gátló funkciója révén is képes

a sejt növekedéséhez hozzájárulni: egyrészt az autofagoszóma kialakításában szerepet játszó kináz komplex (ULK1, ATG13, FIB200) működésének gátló foszforilációja által, másrészt a lizoszóma szintéziséhez elengedhetetlen gének átírását szabályozó transzkripciós faktor (TFEB) gátlásával (93, 94).

Az mTORC2 komplex – növekedési faktorok és kemokinek által történő – aktivációjának pontos mechanizmusáról jóval kevesebbet tudunk. Feltételezik a PI3K/PIP3 útvonalon keresztül megvalósuló, illetve újabban a TSC1/2 komplex által közvetített direkt aktivációt (95, 96). Emellett a riboszomákkal való összekapcsolódás szerepe is felmerül az mTORC2 aktiválásában (97) Az mTORC2 foszforilálja célfehérjéit, az AGC kinázokat – beleértve az AKT-ot (Ser/473, Thr/450 helyeken), az SGK1-t, és PKC család tagjait –. Az AKT foszforilációja egyrészt a korábban tárgyalt TSC1/2 komplex, és – PRAS40 gátlása révén – az mTORC1 komplex aktivitását fokozza, másrészt kinázként számos az apoptózis és a sejtciklus szabályozásában fontos fehérje (pl. a FOXO1/3 vagy Bad gátlás) aktivitását befolyásolva, a sejt túlélését, proliferációját támogatja. Az mTORC2 komplex az SGK1 fehérjea ktiválásával a sejt elektrolit forgalmát befolyásolja, a PKC család tagjainak foszforilációjával a sejt motilitásának szabályozásában vesz részt (98, 99) (5. ábra).



5. ábra. Az mTORC1 és mTORC2 komplexek által szabályozott folyamatok. Részletes magyarázat a szövegben (73, 78).

1.3.2.1. *mTOR kináz aktivitás akut lymphoid leukémiában*

A PI3K/AKT/mTOR jelátviteli útvonal fokozott aktivitását különböző hematológiai malignitásokban, köztük akut lymphoid leukémiában is kimutatták már (62). Számos olyan mechanizmust ismerünk, melyek a daganatsejtekben az mTOR jelátviteli útvonal tagjainak szabályozási zavarát okozhatják, és az mTOR aktivitást fokozva a sejt növekedését, túlélését eredményezik. Gyakori eltérések a jelátviteli útvonal ligandjainak [növekedési faktorok (IGF, FLT-3)], receptorainak [növekedési faktor receptorok (IGFR, HER-2, EGFR)] funkciónyerő mutációi, illetve pre-B-ALL-ben, a t(9;22) transzlokációt követően konstitutívan termelődő tirozin-kináz aktivitással rendelkező BCR-ABL fúziós fehérje következményeként is megjelenő emelkedett mTOR aktivitás. A receptor tirozin kinázok, az aberráns RAS/RAF/MAPK jelátviteli útvonal közvetlen stimuláló hatása, illetve a PI3K katalitikus alegységét érintő mutációk a PI3K konstitutív aktiválódását eredményezik (100, 101).

Az mTOR jelátviteli útvonal fontos negatív szabályozói a tumorszupresszor gének (PTEN, TSC1/TSC2 komplex, NF1, LKB1). Mutációjuk, deléciójuk igen gyakran figyelhető meg akut lymphoid leukémiában, ami a PI3K/AKT útvonal aktivációja révén az mTOR kináz aktivitásához vezet (102, 103). Emellett családi halmozódást mutató daganattípusok kialakulásának hátterében is bizonyították mutációik szerepét.

A gyermekkori ALL rosszabb prognózisú, T-ALL-es betegcsoportja esetében az mTOR jelátviteli útvonal számos elemét érintő eltéréseket mutattak ki. A PTEN mutációja, deléciója – melynek megjelenését a rossz prognózissal hozták összefüggésbe – a betegek 35-40%-ban figyelhető meg. A PI3K, AKT és N-RAS mutációit a T-ALL-es betegek 10%-nál mutatták ki (27, 104). Emellett az – mTOR lebontását támogató – FBXW7 ubiquitin ligáz inaktiváló génmutációja a T-ALL-es betegek 20%-ban detektálható (105). A NOTCH1 onkogén mutációi, melyek a betegek 40-50%-t érintik, növekedési faktor útvonalak (IGFR1, IL7R α) aktiválásával, illetve a PTEN inaktiválásával befolyásolják az mTOR jelutat (106, 107).

A fokozott mTOR aktivitás hátterében megfigyelhető eltérések feltérképezése mellett az mTOR jelátviteli útvonal pontos – a leukémia sejtek túlélését és szaporodását segítő – szerepével kapcsolatban még kevés adat áll rendelkezésünkre akut lymphoid leukémiák esetében. Emellett az mTOR gátló kezelések – melyeket hatékonyan kezdtek el alkalmazni preklinikai és klinikai vizsgálatokban (62, 108) – pontos indikációs területe sem ismert még. Ezek alapján biztosan szükség van az mTOR aktivitás, illetve az mTOR gátlókkal szembeni érzékenység átfogó vizsgálatára.

1.3.3. mTOR gátlók

A klasszikus mTOR gátlók (MTI: rapamycin és származékai, a rapalógok) „prototípusának” tekinthető rapamycin, a Húsvéti szigeteki (Rapa Nui a helyiek nyelvén) *Streptomyces hygroscopicus* talajbaktériumból izolált makrolid antibiotikum. Kezdetben gombaellenes tulajdonságai révén keltette fel a kutatók érdeklődését, később sikerült kimutatni immunszuppresszív [graft versus host betegség (GVHD) megelőzésére hemopoetikus őssejt átültetés, és szervkilökődés megakadályozására szervtranszplantáció során] és antiproliferatív hatását humán daganatsejtekben (109-112). A rapamycin kedvezőtlen farmakológiai tulajdonságai – gyors lebomlása, instabilitása, rossz vízdékonyság – klinikai felhasználhatóságát nagymértékben korlátozták, ezért jelenleg különböző rapamycin származékok, rapalógok [(temsirolimus (CCI-779), everolimus (RAD001), és ridaforolimus (deferolimus, AP23573)] állnak rendelkezésre, de az mTOR gátlók fejlesztése folyamatosan zajlik (113).

A klasszikus MTI-ok mTORC1 gátló hatásukat az FKBP12 fehérjével komplexet képezve, az mTOR kináz FRB doménjéhez kapcsolódva fejtik ki. Feltételezhetően nem az mTOR kináz foszforilációját befolyásolják, hanem alloszterikus gátlását eredményezik (114). Az mTORC2 komplex klasszikus mTOR gátló kezelésre adott válaszával kapcsolatban az irodalom nem egyértelmű. Korábbi álláspont szerint, az mTORC2 komplex rapamycinnel nem gátolható. Eszerint az mTORC2 komplex aktivitását a rapamycin nem gátolja, és így az mTORC2 komplexen keresztül az AKT aktivitása fokozódhat, ez pedig segíti a sejt túlélését (115). Jelenlegi ismereteink szerint az mTORC2 komplex működését a klasszikus mTOR gátlók (rapalógok) rövidtávú kezelése nem képes gátolni, azonban a hosszútávú, magasabb koncentrációjú kezelés az mTORC2 komplex gátlására is képes (116).

A temsirolimus az első MTI, melyet a klinikai gyakorlatban a daganatos betegek kezelésébe bevezettek. Előrehaladott világos sejtes veserákban, illetve refrakter, vagy relabáló köpenysejtes lymphomában szenvedő betegek esetében a temsirolimus monoterápia növelte a progresszió mentes túlélést (117, 118). A temsirolimus törzskönyvezett szer ezekben a betegcsoportokban. Az everolimus orálisan aktív rapalog, melyet sikeresen alkalmaznak előrehaladott világossejtes veserákban szenvedő betegek másodvonalbeli kezelésekként, sunitinib és sorafenib (VEGFR tirozin-kináz gátló) terápiás sikertelenségét követően. Emellett pancreas eredetű neuroendokrin daganatos betegek előrehaladott eseteiben is alkalmazzák az everolimus kezelést, mely növeli a progresszió mentes túlélést. Herceptin kezelésre nem

reagáló, előrehaladott HER2 pozitív emlődaganatos betegek klinikai fázis kísérleteiben az everolimus képes a Herceptin kezeléssel szemben kialakult rezisztenciát megszüntetni (119-121). A ridaforolimus, más néven deforolimus orálisan és parenterálisan egyaránt hatékony mTOR gátló. Daganatellenes hatását számos klinikai fázis kísérletben vizsgálják előrehaladott, metasztatizáló – csont- és lágyszöveti sarcoma, nem kissejtes tüdőrák, endometrium carcinoma, prosztata carcinoma – daganatok esetében (122).

A klasszikus mTOR gátlók leggyakrabban jelentkező mellékhatásai a stomatitis – mely a betegek 40%-át érinti, és az alkalmazott dózistól függően eltérő súlyosságú formában fordul elő –, mucositis, bőrtünetek, és gyengeség. A legsúlyosabb mellékhatásuk az interstitialis pneumonitis, mely a betegek ~2-10%-ban jelentkezik, leggyakrabban a sirolimus, illetve everolimus kezeléssel összefüggésben. Kialakulásának háttérében T-sejt közvetített késői hiperszenzitív reakció állhat, mely szöveti destrukciót eredményez, és a tüdő kompenzáló, remodelling folyamatát az MTI-ok gátolják (123).

Az elsődleges mTOR gátló kezelések klinikai vizsgálatai során szerzett tapasztalatok, illetve az mTOR jelátviteli útvonal pontosabb feltérképezésének lehetősége rámutatott a klasszikus MTI kezelések határait. Az mTORC1 komplex szelektív gátlásával ugyanis megszűnhet a p70S6K által az IRS-1 felé közvetített negatív visszacsatolás, ami a jelút negatív szabályozásában vesz részt. Az IRS-1 az aktiváló jelet egyrészt a PI3K/AKT, másrészt a RAS/RAF/MEK/ERK útvonal felé közvetíti, összességében a sejt túlélését támogatva (124-126). Ezek a mechanizmusok is magyarázhatják a klasszikus mTOR gátlókkal szemben jelentkező rezisztencia kialakulását. Ezek alapján új generációs mTOR gátlók fejlesztését, preklinikai és klinikai vizsgálatait kezdték el, melyek az mTORC1/mTORC2 komplexeket (mTORK), vagy kettős gátlóként az mTORC1 és mTORC2 komplexek mellett, a PI3K vagy AKT működését is negatívan szabályozzák. Az mTOR katalitikus egységének ATP kompetitív gátlói, az mTORC1 és az mTORC2 komplex funkcióját is képesek befolyásolni, *in vitro* humán leukémia sejtekben hatékonyabbnak bizonyultak rapamycinnél a proliferáció gátlásban, apoptózis indukcióban (127, 128). A kettős gátlók az mTOR, valamint a PI3K vagy AKT katalitikus egységéhez kapcsolódnak, és *in vitro* jelentős proliferációgátló és daganatellenes hatásukat mutatták ki daganat sejtekben, *in vivo* a tumor növekedését gátolták (129-131). A folyamatban lévő, illetve az mTOR gátlók hatékonyságát bizonyító lezárult fázis kísérleteket a 4. táblázat foglalja össze.

4. táblázat. Klasszikus és új generációs mTOR gátlók klinikai vizsgálatai. (mTORKI – mTOR komplex gátló; GVHD – graft versus host betegség; tpx – transzplantáció; met. – metasztatizáló; MM – myeloma multiplex; WM – Waldenström macroglobulinaemia; NSCLC – nem kis sejtes tüdődaganat. # – vizsgálat száma még le nem zárult vizsgálatok esetében: ¹NCT01743560; ²NCT01317615; ³NCT00698243; ⁴NCT00731263; ⁵NCT01058707; ⁶NCT01118689; ⁷NCT00620594, ⁸NCT00777699; ⁹NCT00742105; ¹⁰NCT00485719; ¹¹NCT00777699; ¹²NCT00704080; ¹³NCT01082068; ¹⁴NCT00854126, ¹⁵NCT00854152; ¹⁶NCT00972686; ¹⁷NCT00927823; ¹⁸NCT00940498.

klasszikus mTOR gátló	Célfehérje	Alkalmazási mód	Vizsgálat típusa, daganattípus, vizsgálatyszám
Sirolimus, rapamycin	mTORC1	per os	Pilot vizsgálat graft kilökődés megelőzése vese tpx (132), fázis II. graft kilökődés megelőzése máj tpx (133), GVHD perifériás őssejt tpx (134)
Temsirolimus, CCI779	mTORC1	per os/iv.	világos sejtes veserák (135), fázis III. köpenysejtes lymphoma előrehaladott eseteiben (136)
Everolimus, RAD001	mTORC1	per os	Fázis III. met. világos sejtes veserák (137), fázis III. előrehaladott pancreas eredetű neuroendokrin daganat (138), fázis II. met. emlődaganat (139), fázis IV. emlődaganat ^{1#} , tüdődaganat ^{2#}
Ridaforolimus, AP23573	mTORC1	per os/iv.	fázis III. metasztatizáló csont- és lágyrész sarkoma (140), fázis II. relabáló, refrakter hematológiai malignitások (68)
új generációs mTOR gátló			
OSI-027	mTORKI	per os	fázis I. szolid daganatok, lymphoma ^{3#}
AZD8055	mTORKI	per os	fázis I./II. előrehaladott szolid daganatok, lymphoma (141) ^{4#}
PP242, INK-128	mTORKI	per os	fázis I. előrehaladott szolid daganatok ^{5#} , relabáló MM, WM ^{6#}
NVP-BEZ235	mTORKI, PI3K	per os	fázis I./II. előrehaladott szolid daganatok ^{7#} , emlődaganat ^{8#}
NVP-BGT226	mTORKI, PI3K	per os	fázis I./II. előrehaladott szolid daganatok (142), emlődaganat ^{9#}
XL765	mTORKI, PI3K	per os	fázis I. szolid daganatok ^{10#} , NSCLC ^{11#} , glioma ^{12#} , emlődaganat ^{13#}
GDC-0980	mTORKI, PI3K	per os	fázis I. NHL ^{14#} , szolid daganatok ^{15#}
GSK2126458	mTORKI, PI3K	per os	fázis I. szolid daganatok, lymphoma ^{16#}
PF-04691502	mTORKI, PI3K	per os	fázis I. szolid daganatok ^{17#}
PKI-587	mTORKI, PI3K	iv.	fázis I. szolid daganatok ^{18#}

1.3.3.1. mTOR gátlás akut lymphoid leukémiában

A köpenysejtes lymphomában szenvedő betegek eredményes mTOR gátló kezelését követően, ALL-ben is számos vizsgálat kezdődött az MTI-ok daganatellenes hatásának feltérképezésére. A preklinikai vizsgálatokban többen kimutatták a rapamycin *in vitro* antiproliferatív, apoptózis indukáló, és *in vivo* – humán ALL-es xenograft modellekben – tumorméret csökkentő és túlélést növelő hatását (49, 143). Emellett az MTI-ok szinergista apoptózis indukáló hatását tudták igazolni a konvencionálisan alkalmazott kemoterápiás szerekkel történő kombinációs kezelésekből (50, 65, 69). Az mTOR gátlók hatékonyak lehetnek a rossz prognózisú ALL-es betegeknél általánosan jelentkező methotrexate, kortikoszteroid, illetve a – Philadelphia pozitív ALL-es betegeknél megfigyelhető – tirozin-kináz gátló kezeléssel szemben kialakuló rezisztencia leküzdésében, melyek kialakulásának hátterében az mTOR fokozott aktivitása állhat (144). A preklinikai vizsgálatok eredményei alapján elkezdődtek a klinikai vizsgálatok, melyekben kimutatták az önmagukban, illetve kombinációban alkalmazott mTOR gátló kezelések alkalmazásának hatékonyságát refrakter, valamint relabáló hematológiai betegségekből (68, 145). Gyermekkori ALL-ben az elmúlt években indult el számos klinikai vizsgálat, mely az MTI-ok hatását vizsgálja a konvencionálisan alkalmazott kemoterápiával kombinációban, a terápiára nem reagáló, vagy relabáló betegek esetében. Lezárult fázis kísérlet még nem jelent meg gyermekkori ALL-ben mTOR gátló kezeléssel kapcsolatban. Sikertelen azonban kimutatni egy fázis I/II kísérletben az allogén hemopoetikus őssejtátültetés során alkalmazott sirolimus jótékony hatását graft versus host betegség profilaxisában (146). Gyermekkori ALL-ben az mTOR gátló kezelések folyamatban lévő fázis vizsgálatait az 5. táblázat foglalja össze.

5. táblázat. Fázis vizsgálatok mTOR gátlókkal gyermekkori ALL-ben (met. malignitás – metasztatikus malignitás; it. mtx – intrathecalis methotrexate; L-asp – L-asparaginase; CVAD – cyclophosphamide, vincristin, doxorubicin, dexamethasone; ara-c – cytosin-arabinoside; pred – prednisolon; dextr – dexrazoxane; bev – bevacizumab; doxil – liposzomális doxorubicin; mit – mitoxantrone-hydrochloride; # – vizsgálat száma: ¹NCT00068302; ²NCT00957320; ³NCT01162551; ⁴NCT01658007; ⁵NCT00968253; ⁶NCT01523977; ⁷NCT00761644; ⁸NCT01403415.

Szer neve	Vizsgálat típus	Bevételi mód	Betegek életkor (év)	Kombináció
	kezdet (év)		betegségtípus	
Sirolimus	Fázis I./2003# ¹	per os	<21, refrakter/relabáló ALL/AML/NHL	ált. kezelés
Sirolimus	Fázis I./II. 2009 (146)	per os	ALL/GVHD megelőzése allogén HSCT	tacrolimus, methotrexate
Sirolimus	Fázis I./2009# ²	per os	<21, refrakter/relabáló ALL/NHL	L-asp
Sirolimus	Fázis II./2010# ³	per os	<25, refrakter/relabáló ALL/NHL	mtx
Sirolimus	Pilot projekt/2012# ⁴	per os	<30, relabáló ALL/LL	ált. kezelés
Everolimus	Fázis I./II./2009# ⁵	per os	≥10, refrakter/relabáló ALL	Hiper-CVAD
Everolimus	Fázis I./II./2009# ⁵	per os	≥10, refrakter/relabáló ALL	mtx, ara-c
Everolimus	Fázis I./2012# ⁶	per os	1.5-21, relabáló ALL	pred, vin, L-asp, dox, dexra
Temsirolimus	Fázis I./2008# ⁷	iv.	≥12, előrehaladott/met. malignitás	bev, doxil
Temsirolimus	Fázis I./2011# ⁸	iv.	1-21, relabáló ALL/NHL	dex, mit, vin, L-asp, it. mtx

1.4. MikroRNS-ek

A mikroRNS-ek (miRNS; miR) rövid, 16-29 nukleotid hosszúságú, nem-kódoló RNS molekulák, melyek a génextpresszió szabályozásában vesznek részt (147, 148). Elsőként a *Caenorhabditis elegans* differenciálódását szabályozó *lin-4* (1993-ban), majd a *let-7* (2000-ben) miRNS-eket fedezték fel (149). Napjainkban a különböző fajokból ismert miRNS-ek száma 20 ezer fölé emelkedett. Jelenleg több, mint 2000 humán miRNS-t különböztetünk meg (150). A miRNS-eket kódoló nukleotid szakaszok leggyakrabban a gének intronjaiban, vagy a 3' UTR (untranslated) fehérjévé át nem íródó régiójában, illetve a genom nem-kódoló részén klaszterekben helyezkednek el (149).

Az érett miRNS kialakulása többlépcsős folyamat, először RNS-polimeráz II segítségével a primer miRNS (pri-miR) átírása történik, majd ebből a Drosha (RNáz III típusú endonukleáz) jellegzetes hajtű szerkezetű (~60-110 nukleotid hosszú) pre-miR-eket hasít le. A pre-miR-eket az exportin-5 (Ran-GTPáz) a sejtmagból a citoplazmába juttatja, ahol a Dicer (RNáz III típusú endonukleáz) a miRNS duplexet hasítja. A képződő duplex (miRNS: miRNS*) egyik szálából keletkezik az érett miRNS, mely a RISC (RNS-indukált csendesítő komplex – Argonaute fehérjék pl. PAZ, PIWI alkotják) komplexbe épül (151). A miRNS-ek az 5' végükön található 6-8 nukleotid hosszúságú „seed” régió segítségével kapcsolódnak a cél mRNS 3' végéhez, majd az adott mRNS lebontását, a transláció gátlását eredményezik (152, 153). Kimutatták, hogy a miRNS-ek deadeniláció- és destabilizáció révén is képesek a mRNS expressziót csökkenteni.

1.4.1. MikroRNS tumorbiológiai jelentősége

Az első bizonyított kapcsolatot miRNS-ek expressziójának megváltozása és malignus betegség kialakulása között krónikus lymphoid leukémia (CLL) esetében mutatták ki. A miR 15 és miR 16-1 expressziójának csökkenése a BCL-2 fehérje expressziójának fokozódásához vezet, ami a sejtek túlélését támogatja (154-156). A miR 15 és miR 16-1, a CLL-es betegek 50%-ában deletált 13q14 régióban található, így funkcióvesztése ezekben az esetekben a BCL-2 overexpresszióját, a sejtek apoptózissal szembeni fokozott védettségét segíti.

Egyre több szolid tumorban és hematológiai daganat esetében írják le különböző miR-ek megváltozott expressziós szintjét, illetve az adott daganattípusban jelentőséggel bíró gén expressziójának negatív korrelációját bizonyos miR-ek expressziójával (157-160). Hatásuk alapján megkülönböztetnek onkogén tulajdonságú ún. oncomiR-eket és tumorszupresszor

funkciójú anti-oncomiR-eket. Az oncomiR-ek pl. tumorszupresszor gének célfehérjéinek expresszióját gátolják, daganatsejtekben ennek megfelelően fokozott expressziójuk jellemző. Az anti-oncomiR-ek daganatsejtekben alacsonyan expresszálódnak, ezáltal képtelenek az onkogének vagy más célfehérjék expresszió szabályozásában játszott szerepüket ellátni.

1.4.2. MikroRNS-ek expressziója hematológiai malignitásokban, ALL-ben

A miRNS expresszió változások számos hematológiai daganat (AML, ALL, CLL, DLBCL, BL, B-, NK/T-sejtes lymphomák) esetében is leírásra kerültek. Ezek közül az expressziós eredmények közül mutat be néhányat a következő táblázat (6. táblázat) (150, 161-166).

6. táblázat. Hematológiai malignitások kialakulásában szerepet játszó miRNS-ek és potenciális célmolekuláik. (DLBCL: diffúz, nagy B-sejtes lymphoma; BL: Burkitt lymphoma; ALCL: aplasztikus nagy sejtes lymphoma; MM: myeloma multiplex; MALT: extranodális marginális zóna lymphoma, APL: akut promyelocytás leukémia) (150, 161-166).

miRNS	Malignitás	Potenciális célmolekula
let-7	AML, Hodgkinlymphoma	RAS, c-Myc, PRDM1
124a	AML, ALL	CEBP α , CDK6
125	DLBCL, ALL, AML	IRF4, PRDM1, TNFAIP3
135a	Hodgkinlymphoma	JAK2
155	DLBCL, BL, AML	SMAD5, PIK3R1, SHIP, c-Myc
15a/16	CLL, B-ALL, ALCL, MM	BCL2, MCL1, CDK6, HIF1 α , ciklinD1
17-92	ALL, DLBCL, BL	BIM, PTEN, E2F1
181	AML, CLL	AID, BCL2, CD69, TCR α
21	B-, NK/T-sejtes lymphoma	PDCD4, PTEN, STAT3
221/222	AML, ALL, CLL	KIT
223	MALT, APL, AML	MEF2C, LMO2, NFIA, CEBP α , E2A, E2F1
29a	AML, CLL	TCL1
34a	B-sejteslymphoma	MYC, FOXP1

Munkámban gyermekkori ALL-es mintákban tanulmányoztam bizonyos miRNS-ek expresszióját, ezért az ALL-ek esetében eddig megjelent miRNS adatokat foglalom össze a következőkben:

Az egyik első, az ALL-ek miRNS expresszió vizsgálatával foglalkozó tanulmány ALL-ben fokozott miR 128a, miR 128b, és alacsony miR 223, let 7b expressziót mutatott ki. Eredményeik szerint az ALL-ek és AML-ek miRNS expressziós profilja jelentősen eltér (167, 168). Más eredmények szerint a miRNS profil meghatározása a különböző genetikai háttérű és más-más kezelési lehetőségeket igénylő, eltérő prognózisú ALL altípusok elkülönítését

teheti lehetővé. Az eddig megjelent ALL miRNS expresszió vizsgálatok alapján alacsony, illetve fokozott expressziót mutató miRNS-eket a 7. táblázat foglalja össze (167-176).

7. táblázat. Humán akut lymphoid leukémiát, illetve alcsoportjait jellemző miRNS expresszió. (Félkövér betűvel több munkacsoport által leírt miR-ek vannak feltüntetve) (167-176).

Vizsgált sejtek	Fokozottan expresszáló miRNS	Alacsonyan expresszáló miRNS
ALL	128a, 128b, 142-3p , 150, 181 , 193, 204, 218, 222, 30e-5p, 331, 339	let-7, 100 , 125b, 127, 132, 135b, 139, 143, 150, 196b , 199, 223 , 373, 451
Normál csontvelői	143, 145, 223	
CD34 +	127, 146, 221, 25, 26, 299-5p, 411, 520	
ALL alcsoport		
hyperdiploid	151, 222, 30b, 331, 545, 98, 511, 660, 361-3p, 374a, 532-5p, 501-5p	100
ETV6-RUNX1	let-7c, 99a, 100 , 125b, 126, 372, 383, 629	213, 221, 361-5p
E2A-PBX1	425, 708	126, 146a, 545, 24, 29a, 511, 365, 30d, 193a
T-ALL	148, 190, 196b, 342-3p, 424, 450, 503, 542-5p	191, 151, 425-3p, 425-5p, 222, 708 , 132
BCR-ABL1		103, 1226, 148b, 203, 210, 345, 301, 324-5p, 331, 484, 93
MLL-ALL	133a, 17-92, 183, 196	let-7 , 151-5p, 192, 193, 194, 20b, 203, 30e-5p, 34b, 372, 497, 582, 708

Bizonyos miRNS-ek expresszióját összefüggésbe hozták az ALL-es betegek jó-, illetve rossz prognózisával. Kimutatták, hogy a miR 16 fokozott expressziója korrelál a rossz prognózisra utaló cytogenetikai eltérések jelenlétével, a magas fehérvérsejtszámmal, valamint a rövidebb túlélési idővel (177). Ehhez hasonlóan a miR 100 alacsony expressziója és a magas (>50G/L) fehérvérsejtszám között ugyancsak összefüggést találtak (174). A BCR-ABL1 fúziós fehérjét expresszáló, rossz prognózisú Ph+ALL betegek esetében alacsony a miR 203 expresszió. Kimutatták, hogy a miR 203 expresszió fokozásával az ABL1-, illetve a BCR-ABL1 fúziós fehérje szintje csökkenthető (175), ennek a miRNS-nek tehát szerepe van az ABL1 expresszió gátlásában. Más eredmények szerint a miR 146a és miR 181a/c expressziója a rövidebb, a miR 221 expressziója a hosszabb túléléssel mutat összefüggést (178). Egy miRNS array vizsgálat alapján multivariancia analízissel független prognosztikai

tényezőként kiválasztott 14 miRNS (jó prognózissal – miR 10a, miR 134, miR 214, miR 484, miR 572, miR 580, miR 624, miR 627 –, és rossz prognózissal – miR 33, miR 215, miR 369-5p, miR 496, miR 518d, miR 599 – összefüggésbe hozható miRNS-ek) expressziójának vizsgálata alapján jó- és rossz prognózisú ALL-es betegcsoportot tudtak elkülöníteni (172). Jelenleg még nem rendelkezünk olyan markerekkel, melyek viszonylag korán képesek lennének jelezni a recidívát. Relapszusban bizonyos miRNS-ek (miR 708, miR 223, miR 23, let-7) szignifikánsan alacsonyabb, más miRNS-ek (miR 181, miR 708, miR 130b) szignifikánsan emelkedett szintjét detektálták a komplett remisszióban lévő betegekhez viszonyítva. Emellett a miR 223, miR 27a és miR 708 fokozott expressziója jól korrelált a hosszabb relapszus-mentes túléléssel is (179). ALL központi idegrendszeri recidívájának megjelenésével párhuzamosan kimutattak fokozottan (miR 7, miR 198, miR 633), és alacsonyan (miR 126, miR 345, miR 222, miR 551a) expresszálódó miRNS-eket a központi idegrendszeri érintettséget nem mutató recidív ALL-es betegekhez viszonyítva (180).

A kemoterápiával szembeni rezisztencia okainak meghatározása és áttörése alapvető fontosságú a terápia rezisztens betegek esetében. Bizonyos miRNS-ek expressziójának meghatározása gyermekkori ALL-es betegek esetében (miR 18a, miR 532, miR 218, miR 625, miR 193a, miR 638, miR 550, miR 633) segíthet a 8. napi szteroid válasz előrejelzésében (180, 181). Egy in vitro vizsgálatban dexamethasone rezisztens ALL sejtek szteroid érzékenysége növelhető volt a miR 128b és miR 221 expressziójának fokozásával (182). Egy másik vizsgálatban – 397 miRNS expresszióját vizsgálták gyermekkori ALL-es betegek esetében – bizonyos miRNS-eket összefüggésbe hoztak a vincristin (miR 99a, miR 100, miR 125b, miR 126, miR 625), daunorubicin (miR 99a, miR 100, miR 125b, miR 126), methylprednisolon (miR 625), valamint L-asparaginase (miR 454) rezisztencia kialakulásával (183). Ezek az eredmények bizonyos miRNS-ek expresszió változásának a kemoterápiával szembeni rezisztencia kialakulásában játszott szerepére hívják fel a figyelmet.

1.4.3. Saját munkánkban vizsgált miRNS-ek

Munkánk során olyan miRNS-ek expresszió vizsgálatát végeztük el a több év alatt gyűjtött ALL-es mintákban, amelyeket korábbi irodalmi adatok alapján választottunk ki. Vizsgáltuk a **miR 21 és miR 155 expresszióját**. Ezek a legismertebb oncomiR-ek. A miR 21 fokozott expresszióját számos daganattípusban (vastagbél-daganat (159), emlő-daganat (158), tüdő-daganat (160), petefészek-daganat (157)), illetve hematológiai malignitásban (B-sejtes lymphomában, ALCL-ben, NK/T-sejtes lymphomában, myeloma multiplexben (150))

igazolták. Legfontosabb célmolekulái a PTEN tumorszupresszor gén (154, 184) a PDCD4, illetve a STAT3 (185). A miR 155 fokozott expresszióját szolid tumorok mellett (vastagbél-daganat, emlő-daganat és tüdő-daganat) (186), hematológiai malignitásokban (DLBCL, CLL, Hodgkin-lymphoma, Burkitt lymphoma) is kimutatták (187). Alapvető szerepe lehet a B-, illetve a CD4+ T-sejtek fejlődésében. MiR 155-öt fokozottan expresszáló transzgen egerekben nagy malignitású, B-sejtes lymphoma alakult ki (188). Szekvencia homológia alapján feltételezhető potenciális célmolekulái a c-Myc, Smad5, PIK3R1 (a PI3K negatív szabályozója) és SHIP1 (165, 188-192).

A további miRNS-eket elsősorban hematológiai malignitásokban folytatott korábbi vizsgálatok eredményei alapján választottuk. A **miR 16** csökkent expresszióját különböző hematológiai malignitásokban (CLL, ALL, ALCL, myeloma multiplex) mutatták ki (187, 193). Feltételezhetően negatívan szabályozza a sejtnövekedést és a sejtciklust a BCL2 és TIAM1 fehérjék gátlása révén (156, 193-195). További fontos célmolekulái lehetnek az MCL1, CDK6, HIF1 α és ciklinD1 (156, 196, 197). A **miR 24** a sejtciklus fontos szabályozója, fokozott expressziója gátolja a sejtek proliferációját, és G2/S blokkot okoz (198). Feltételezhetően szerepe lehet a hematopoiesisben is, mivel fokozott expressziója a CD34+ hematopoetikus őssejtek differenciálódását gátolja (150). Kimutatták alacsony expresszióját TCF3-PBX1 transzlokációt [t(1;19)(q23;q13)] hordozó pre-B-ALL-es betegek esetében (199). A tumorszupresszor **miR 29b** alacsonyabb expresszióját AML-ben, osteosarcomában és kissejtes tüdő-daganatban mutatták ki (200-202). Potenciális célmolekulája az MCL-1, mely az antiapoptotikus BCL-2 család tagja (203). Expressziójának *in vitro* fokozásával – a MCL-1 fehérje expressziójának gátlása révén – myeloma multiplexben, illetve – az ABL1, BCR/ABL1 gátlása révén – CML-ben apoptózist indukál (204, 205). A **miR 128b** fokozott expresszióját kimutatták akut lymphoid leukémiában, és nem kissejtes tüdő-daganatok sugárkezelésre érzékeny csoportjában (169, 206). Csökkent expresszióját akut myeloid leukémiában (167) és a rossz prognózisú, MLL-AF4 ALL-ben (207) is leírták. A **miR 142-3p** fokozott expresszióját kimutatták humán T- és B-ALL sejtvonalakban, illetve ALL-ben és AML-ben szenvedő betegek esetében (208, 209). A miR 142-3p potenciális targetjei egyrészt a T sejtek proliferációjában – cAMP, PKA, GR α – (208), másrészt a monocyta és granulocyta sejtek szabályozásában – TAB1 és a MAP3K7 binding protein 2 – (210) vesznek részt. A **miR 223** egy hematopoetikus szövet specifikus miRNS, mely a lymphoid sejtekben alacsonyan, a myeloid sejtvonalakban fokozottan expresszálódik (167). Emellett a granulocyták érésében alapvető szerepet játszik. Potenciális célmolekulái az E2F1 (166), az

LMO2 (211), a MEF2C (212), a NFIA, aCEBP α (213) és az E2A (214). AML-ben az AML1/ETO onkoprotein csökkenti a miR 223 szintjét, ezáltal a sejtek differenciációja gátlódik (215) (8. táblázat).

8. ábrázat. Általunk vizsgált miRNS-ek és potenciális célmolekuláik irodalmi adatok alapján. (↓– alacsony, ↑– fokozott expresszió).

Vizsgált miRNS	Lehetséges cél molekulák	Előfordulás
miRNS 16	BCL2, TIAM1, CDK6, HIF1 α és ciklinD1	↓ hematológiai daganatok (187, 193)
miRNS 21	PTEN, PDCD4, STAT3	↑ vastagbél-daganat (159), emlő-daganat (158), tüdő-daganat (160), petefészek-daganat (157), hematológiai malignitások (150)
miRNS 24	MAPK foszfatáz-7, JNK2, p38 kináz	↓ TCF3-PBX1 transzlokációt hordozó pre-B-ALL (216)
miRNS 29b	MCL-1, ABL1, BCR/ABL1	↓ AML, osteosarcoma, tüdő-daganat (200-202)
miRNS 128b	EGFR, PTEN	↓ AML (167), MLL-AF4 (207) ↑ ALL (169), NSCLC sugárérzékeny csoportja (206)
miRNS 142-3p	cAMP, PKA, GR α , TAB1, MAP3K7 binding protein 2	↑ humán B-, T-ALL, AML (208, 209)
miRNS 155	c-myc, PIK3R1, Smad5, SHIP1	↑ vastagbél-daganat, emlő-daganat és tüdő-daganat (186), hematológiai malignitások (DLBCL, CLL, Hodgkin-lymphoma) (187)
miRNS 223	E2F1, LMO2, MEF2C, NFIA, CEBP α , E2A	↓ ALL (167) ↑ AML (217), MALT (214)

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az mTOR aktivitás daganatbiológiai és célzott terápia jelentőségével számos vizsgálat foglalkozik. Ennek ellenére bizonyos daganattípusokban, gyermekkori daganatokban, így gyermekkori akut lymphoid leukémiák esetében még nagyon kevés adat áll rendelkezésünkre a leukémia sejtek egyedi mTOR aktivitásáról és annak jelentőségéről. Munkám céljai között ezért szerepelt:

1. Az mTOR jelátviteli útvonal aktivitásának jellemzése gyermekkori ALL-ben
2. Az ALL-es betegekből izolált leukémia sejtek mTOR aktivitásának és a betegek prognózisának, egyéb terápia, klinikai adatainak összehasonlító vizsgálata
3. Az mTOR gátló rapamycin hatásának vizsgálata sejtvonalakban és izolált primer ALL sejtekben *in vitro*

Vizsgálatainkban a rendelkezésre álló gyermekkori ALL mintákban és humán ALL sejtvonalakban bizonyos miRNS-ek expresszió vizsgálatát is elvégeztem, hogy meghatározzuk:

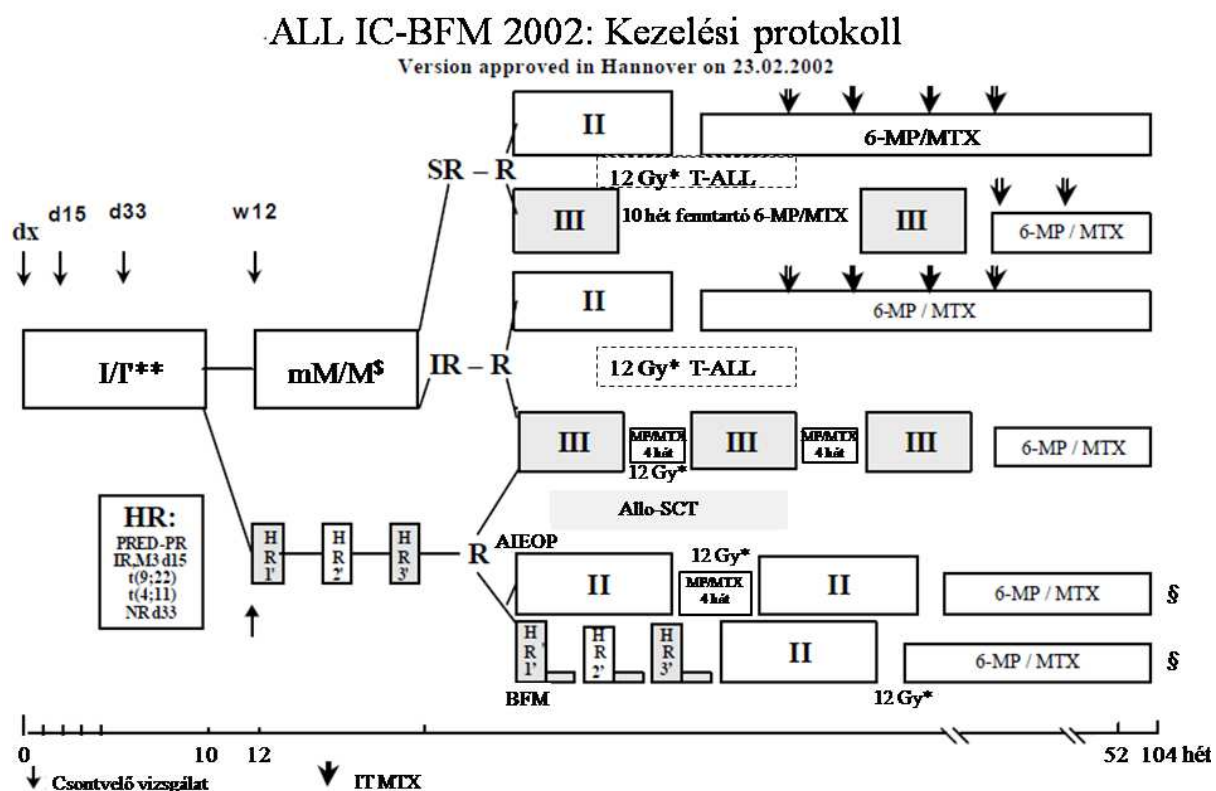
1. Adott lymphomák vagy más tumorok esetében megváltozott expressziót mutató miRNS-ek expresszióját és annak összefüggéseit a betegek klinikai és prognosztikai adataival
2. Milyen változások mutathatók ki a miRNS-ek expressziójában a kezelés hatékonyságának követése közben.

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Betegek

A Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekgyógyászati Klinika Hematológiai osztályán – 2008 januárja és 2012 decembere között – kezelt gyermekkori akut lymphoid leukémiás betegek (n=79) csontvelői és perifériás vér mintáinak (n=372) gyűjtése a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben indult el. A diagnózis felállítása a protokollnak megfelelően, a klinikai kép, a sejtmorfológia, áramlási citometria, cytogenetika és molekuláris genetikai vizsgálatok alapján történt. A gyűjtött minták egy része – hiányzó 0. napi/diagnosztikus minták, alacsony izolált lymphoblast szám a diagnosztikus vagy a követéses mintákban – alkalmatlan volt kísérletek elvégzésére, statisztikai értékelésre. Összességében így 25 beteg esetében a kezelés minden fázisából; a diagnóziskor (0. napi, kezeletlen minta) és a protokoll szerinti kemoterápia különböző fázisaiból (15. napi, 33. napi, és protokoll M előtti időpontokból) tudunk mintákat (n=100) gyűjteni és értékelni. További 28 beteg esetében a diagnózis megállapításakor gyűjtött-, egy beteg esetében pedig csak relapsusból származó mintákat használtuk fel kísérleteinkhez.

Az mTOR jelátviteli útvonal aktivitásának, a miRNS-ek expressziójának meghatározásához, valamint a statisztikai értékeléshez összesen 53 primer ALL-es beteg (44 BCP-ALL, 9 T-ALL; 16 nő, 37 férfi) csontvelői- és perifériás vér mintáit használtuk fel. A betegek átlagéletkora a diagnózis megállapításakor 6.3 év volt (1.8 – 16.4 év). A betegek prognózisának megítélése a kezelési protokollban meghatározott, és az alábbiakban felsorolt prognosztikai faktorok alapján történt: a diagnóziskor meghatározott fehérvérsejtszám, életkor, 8. napi szteroid válasz (abszolút blaszt szám a perifériás vérben), csontvelői blaszt százalékos aránya a kezelés 15. és 33. napján, rossz prognózisra utaló genetikai eltérés jelenléte. Ezek alapján 21 (40%) beteg az alacsony (SR), 23 beteg (43%) a közepes (IR) és 9 beteg (17%) a magas rizikójú (HR) betegcsoportba került. A betegek többségének kezelése az ALL IC-BFM 2002 protokollnak megfelelően történt. Két beteget az ALL IC BFM 2009, egy beteget pedig az ALL BFM 95 protokoll szerint kezelték. Az alkalmazott protokollok között a vizsgálatunk szempontjából jelentős eltérések nem voltak sem a rizikócsoportokba sorolás, sem a kemoterápiás kezelés tekintetében. Az eltérő prognosztikai csoportba tartozó betegek (SR, IR, HR) a terápiás protokoll SR, IR vagy HR ága alapján különböző intenzitású kezelésben részesültek (6. ábra).



6. ábra. Kezelési protokoll gyermekkori ALL-ben. Protokoll I** – DNR 30 mg/m² x2, csak az alacsony rizikójú (SR) BCP-ALL betegek esetében; § – BCP-ALL-ben: MTX 2g/m²/24 óra x4, T-ALL: MTX 5g/m²/24 óra x4; * – Koponyabesugárzás (12/18 Gy) a központi idegrendszeri státusz figyelembevételével, csak T-ALL-es betegek esetében; § – nincs randomizált vizsgálat, mely kimutatta volna az AIEOP és BFM protokollok kezelési hatékonysága közötti különbségeket, a magas rizikójú betegek kezelése a 95-ös protokollban szerzett tapasztalatok alapján történik (ALL IC BFM 2002: Protocol).

Vizsgálatainkban a betegek prognózisának – jó- és rossz prognózis – megítélése a kezelési protokollban leírt prognosztikai faktorok alapján és a betegek utánkövetése során észlelt esetleges relapszus figyelembe vétele alapján történt. A betegek átlagos követési ideje a diagnózistól számítva 28.44 hónap (1.5 – 55.2 hónap) volt. A követési idő alatt öt beteg meghalt: négyen a betegség progressziójában, egy beteg pedig a csontvelő-transzplantációt követően transzplantációs szövődményben. Azok a betegek, akik a kezelésre jól reagáltak és a követési idő alatt remisszióban voltak, a jó prognózisú csoportba kerültek. Azokat a kezdetben – a prognosztikai faktorokat figyelembe véve – jó prognózisúknak ítélt betegeket, akiknél a követési idő alatt relapszus jelentkezett, vagy a betegség progrediált, retrospektívan

a rossz prognózisú betegcsoportba soroltuk. Három beteg került ilyen módon a rossz prognózisú csoportba, a megfigyelési időszak alatt jelentkező relapszus miatt. Összesen tehát 40 jó- és 13 rossz prognózisú beteg esetében történtek a statisztikai vizsgálatok. A prognózis besorolás alapján a betegek 75%-a jó prognózissal rendelkezett. A prognózis meghatározásában fontos szerepet játszó faktorokat vizsgálva a jó prognózisú csoportba került az életkor alapján (≤ 6 év) a betegek 62%-a, kezdeti fehérvérsejtszám alapján (≤ 20 G/l) a betegek 57%-a, immunfenotípus alapján (B-ALL) a betegek 83%-a, a 8. napi szteroid válasz alapján (jó válasz) a betegek 70%-a, és a genetikai vizsgálatok eredménye alapján (normál, hyperdiploid) a betegek 90%-a. A blasztoz cytotenetikai és molekuláris genetikai vizsgálatát követően öt beteg esetében mutattak ki rossz prognózisra utaló genetikai eltéréseket: két betegnél Philadelphia kromoszómát (t[9;22], BCR/ABL), egy betegnél ABL amplifikációt, egy másik esetben RUNX1 amplifikációt, valamint egy másik betegnél p16 deléciót. Az első négy beteg kezelése a magas rizikójú (HR) kezelési ág alapján történt, az ötödik beteg a kezelési protokoll közepes rizikójú (IR) kezelési ága alapján meghatározott kezelésben részesült. Jó prognózisra utaló genetikai eltérések 24 beteget jellemeztek: 20 betegnél hyperdiploiditást-, négy betegnél ETV6/RUNX1 fúziót mutattak ki. A 24 betegnél nem találtunk genetikai eltérést, vagy a talált eltérés prognózissal való összefüggése jelenleg még nem ismert. Az 53 beteg legfontosabb klinikai és laboratóriumi adatait az 9. táblázat foglalja össze (az 54. beteg esetében csak relapszusból származó mintát tudtunk felhasználni kísérleteinkhez, ezért a statisztikai értékelésből kihagytuk). A mintákat az érintett személyek felvilágosítása után, az ő beleegyezésükkel vettük (*TUKEB engedélyszám: 53/2011*).

9. táblázat. Gyermekkori ALL-es betegek klinikai adatainak összefoglaló táblázata. * – a betegek életkora (év) a diagnózis megállapításakor; ** – a betegek neme F – nő; M – férfi; *** – kariotípus vizsgálatok beleértve a G-sávozást és FISH analízist (ETV6/RUNX1, BCR/ABL, MLL, CEP9/p16 próbák); # – 21-es triszómia; & – jelenlegi állapot a vizsgálat lezáródásakor; §: a kezdeti prognózis besorolás során jó prognózisúnak ítélt betegek, akiknél a követési időszak alatt a betegség progressziója, vagy relapszus jelentkezett, ezért retrospektív módon kerültek a rossz prognózisú betegcsoportba; SR – alacsony, IR – közepes, HR – magas rizikójú csoport.

Beteg szám	Életkor* (év) nem**(F/M)	Típus	Csontvelői blaszt % (0. nap)	WBC 10 ⁹ /L	Immunfenotípus	Kariotípus ***	Prognózis	Csontvelői blaszt % (15. nap)	Csontvelői blaszt % (33. nap)	Protokoll	Jelen állapot &
1	14.6/M	T	80%	20.56	pre-T, késői kortikális	normál	jó	0%	<1%	IR	remisszió
2	16.4/M	T	98%	218.00	pre-T	ampl. ABL	rossz	78%	6.30%	HR	halálozás (korai remisszió, betegség progresszió)
3	4.5/M	T	90%	500.16	pre-T, pro-T sejt fenotípussal	normál	rossz	80%	10%	HR	remisszió (transzplantációt követően)
4	4.3/M	T	97%	19.35	pre-T, késői kortikális CD1a neg.	normál	jó	3%	0%	IR	remisszió
5	2.6/M	T	98%	164.12	pre-T	normál	rossz	2.0%	0%	HR	remisszió
6	11.2/M	T	90%	144.00	pre-T	normál	jó	0%	0%	IR	remisszió
7	5.5/F	T	95%	271.54	pre-T, kortikális	normál	jó	<1%	0%	IR	remisszió
8	6/F	T	70%	40.3	pre-T, késői kortikális	normál	jó	<0.3%	<0.3%	IR	remisszió
9	3.5/M	T	95%	121.48	pre-T	ETV6/RUNX1 fúzió	jó	3,7%	1.20%	IR	remisszió
10	8/M	BCP	68%	2.05	pre-B, common	normál	jó	0.03%	0%	IR	remisszió
11	3/M	BCP	90%	53.86	pre-B	BCR/ABL fúzió	rossz	<1%	0%	HR	halálozás (TX, korai relapszus, betegség progresszió)
12	4.6/M	BCP	90%	18.18	pre-B, common	hyperdiploid	jó	0%	0.4%	SR	remisszió
13	2.8/M	BCP	90%	6.20	pre-B	hyperdiploid	jó	1.4%	0%	SR	remisszió
14	3.3/M	BCP	90%	94.90	pre-B	hyperdiploid	jó	0%	0%	SR	remisszió
15	4.2/F	BCP	85%	6.50	pre-B	hyperdiploid	jó	0%	0%	SR	remisszió

Táblázat folytatása.

16	1.9/F	BCP	75%	11.40	pre-B	normál	jó	0%	0%	SR	remisszió
17	2/M	BCP	85%	89.30	pre-B	hyperdiploid	rossz	5.8%	0%	HR	remisszió
18	10.3/F	BCP	90%	44.83	pre-B	ETV6/RUNX1 fúzió, del. ETV6	jó	0%	0.10%	IR	remisszió
19	9.3/M	BCP	100%	13.81	pre-B	BCR/ABL fúzió	rossz	5.20%	0%	HR	halálozás (transzplantációhoz kapcsolódó mortalitás)
20	4.16/F	BCP	95%	216.3	pre-B	del. p16#	rossz	10%	0%	IR	halálozás (betegség progresszió)
21	2.5/M	BCP	100%	119.8	pre-B	hyperdiploid	jó	0%	0%	IR	remisszió
22	8/M	BCP	91%	6.22	pre-B common	hyperdiploid#	jó	<1%	0%	SR	remisszió
23	4.8/F	BCP	90%	6.1	pre-B common, CD13 expresszióval	hyperdiploid	jó	<1%	0%	SR	remisszió
24	4.08/F	BCP	100%	17.37	pre-B, common	hyperdiploid	jó	0.35%	0%	SR	remisszió
25	4.8/M	BCP	91%	3.53	pre-B	hyperdiploid	jó	1.80%	0.14%	SR	remisszió
26	5/M	BCP	60%	3.4	pre-B, common	ETV6/RUNX1 fúzió, del. ETV6	jó	0.45%	0.03%	SR	remisszió
27	5/M	BCP	78%	1.9	pre-B common	normál	jó	1%	1%	SR	remisszió
28	6.5/M	BCP	62%	6.53	pre-B common	normál	rossz	0.60%	0%	HR	remisszió
29	6/F	BCP	87%	6.61	pre-B common	hyperdiploid	jó	4.70%	0%	SR	remisszió
30	11.7/M	BCP	73%	39.1	pre-B common	normál	rossz §	4.60%	0%	IR	késői relapszus (KIR), remisszió
31	14.5/M	BCP	91%	3.57	pre-B common	normál	rossz §	0%	0%	IR	halálozás (korai relapszus, betegség progresszió)
32	11.6/M	BCP	92%	66.76	pre-B common	normál	rossz §	6%	0%	IR	késői relapszus, remisszió
33	4/M	BCP	67%	19.59	pre-B common	normál	jó	2.90%	0%	IR	remisszió
34	2.16/M	BCP	100%	3.01	pre-B	ETV6/RUNX1 fúzió	jó	12.00%	0%	IR	remisszió
35	2.8/F	BCP	80%	7.1	pre-B common	hyperdiploid	jó	0%	0%	SR	remisszió
36	2/M	BCP	90%	6.87	pre-B common	hyperdiploid	jó	0%	0%	SR	remisszió
37	9.6/M	BCP	>90%	9.39	pre-B common	ampl. RUNX1	rossz	9.50%	0%	HR	remisszió

Táblázat folytatása.

38	6.75/M	BCP	94%	46.87	pre-B common	hyperdiploid	jó	0.30%	0%	IR	remisszió
39	2/M	BCP	95%	42.71	pre-B common	normál	jó	0.40%	0%	IR	remisszió
40	9.25/F	BCP	66%	3.9	pre-B	normál	jó	0.08%	0%	SR	remisszió
41	1.8/M	BCP	79%	115.4	pre-B common	normál	jó	0.17%	0%	IR	remisszió
42	3.75/F	BCP	81%	107.7	pre-B common, CD13 expresszióval	normál	jó	0.02%	0%	SR	remisszió
43	10/M	BCP	91.60%	11.6	pre-B	hyperdiploid	jó	1.50%	0%	IR	remisszió
44	15.6/M	BCP	100%	5.97	pre-B common	hyperdiploid	jó	0%	0%	IR	remisszió
45	10.9/M	BCP	75%	62.0	pro-B	normál	jó	<1%	0%	IR	remisszió
46	2.2/F	BCP	84.50%	8.71	pre-B common	hyperdiploid	jó	<0,03%	0%	SR	remisszió
47	16/M	BCP	100%	102	pre-B	hyperdiploid	jó	0.16%	0%	IR	remisszió
48	6.6/F	BCP	>90%	6.9	pre-B common	normál	jó	0.15%	0%	SR	remisszió
49	3.7/M	BCP	87%	34.24	pre-B common	normál	rossz	1.45%	0%	HR	remisszió
50	5/M	BCP	80%	15.57	pre-B common	normál	jó	0%	0%	SR	remisszió
51	4.2/F	BCP	73%	6.07	pre-B common, CD13 expresszióval	hyperdiploid	jó	0.03%	0%	SR	remisszió
52	3.2/F	BCP	96.60%	10.88	pre-B common	normál	jó	0.16%	0%	SR	remisszió
53	6.75/M	BCP	73%	6.7	pre-B common	hyperdiploid	jó	0.12%	0%	IR	remisszió
54	2/M	BCP	80%	6.92	pre-B common	normál	rossz §	0.04%	0%	SR	halálozás (késői relapszus, betegség progresszió)

3.2. Primer ALL-es sejtek izolálása

A lymphoblastokat gyermekkori ALL betegek csontvelői és perifériás vér mintáiból-, a normál perifériás mononukleáris sejteket egészséges, illetve nem leukémiás donorok alvadásgátolt (Na-heparin/EDTA-s) perifériás vérből izoláltuk sűrűség gradiens centrifugálást követően (Histopaque 1077, Sigma Aldrich, St. Louis, MO). A normál B-sejteket MACS CD19 mágneses mikrogyöngyökkel – a gyártó leírásának megfelelően – (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) egészséges donorok tonsilla palatinájából-, a normál T-sejteket nylon fiberrel (Wako Chemicals) Wohler és mtsi leírása alapján (218) egészséges donorok perifériás vérből nyertük ki. A sejteket a további felhasználásig -70°C -on tároltuk.

3.3. Sejtvonalak, tenyésztés, kezelés

Az *in vitro* vizsgálatokhoz humán ALL-es sejtvonalakat [Nalm6 (prekurzor B-sejtes leukémia), Mn60 (akut B-ALL-ből előállított B-sejtes leukémia), Jurkat (akut T sejtes leukémia), CEM (akut T sejtes lymphoid leukémia)], promyelocitás leukémia sejtvonalat (HL60), humán lymphoma sejtvonalakat [KMH2 (Hodgkin-lymphoma), BHD1 (diffúz, nagy B-sejtes lymphoma)] (10. táblázat), valamint gyermekkori akut lymphoid leukémiás betegek primer leukémia sejtjeit használtuk fel. A sejteket 25 és 75 cm³ térfogatú tenyésztő flaskában tenyésztettük 37°C-on, 5% CO₂-t tartalmazó légkörben, 10-20% foetalis borjúsérumot (Sigma, Gibco), 0,03% L-glutamint (Sigma), és 100 µg/ml streptomycint (Sigma) tartalmazó RPMI-1640 médiumban (Sigma, Gibco). A primer ALL sejtek esetében az előbbieken tárgyalt tenyésztési feltételeket nem esszenciális aminosavak (1%, Sigma) hozzáadásával egészítettük ki. A BHD1 sejtvonal esetében az előbbi médiumtól eltérően Iscove's MDM (Gibco) és RPMI-1640 médiumok 1:4 arányú keverékét alkalmaztuk. Vizsgálatainkban a növekedés exponenciális fázisában levő sejteket használtunk.

A kezelésekhöz megfelelő sejtszámra ($2-4 \cdot 10^5/\text{ml}$, – rövidtávú ALL kultúrák esetében – $5 \cdot 10^6/\text{ml}$) hígítottuk a sejtenyészetet, és plate-en (6, 24, 48, 96 lyukú) vagy flaskában (25, 75 cm³ térfogatú) mTORC1 gátló rapamycinnel (50 ng/ml, Rapamycin, Sigma) és a konvencionális kemoterápiában használatos szerekkel kezeltük 0-72 órán keresztül: methotrexate (20 nM, Methotrexate-Teva, Pharmachemie BV, Haarlem, Nederland), cytosin-arabioside (10 ng/ml, Alexan, Ebewe Pharma GmbH, Unterach, Austria), doxorubicin (100 nM, Doxorubicin „Ebewe”, Ebewe Pharma), vincristin (3 nM, Vincristin liquid, Richter Gedeon Nyrt., Budapest, Hungary), etoposide (10 nM, Etoposide-Teva, Pharmachemie BV,

Haarlem, Nederland), methyl-prednisolon (100 nM, Methyl-prednisolon-Human, TEVA, Debrecen, Hungary) és cyclophosphamide (500 nM, Endoxan, Baxter Oncology GmbH, Halle, Germany). Három független kísérletet végeztünk, és mindig legalább három párhuzamos mintát vizsgáltunk.

10. táblázat. A vizsgálatokban használt sejtvonalak.

Sejtvonal	Daganattípus	Eredet
Nalm6	prekurzor B-sejtes leukémia	ACC 128 klón, German Tissue Collection of Microorganisms and Cell Culture (DSMZ)
Mn60	akut B-sejtes leukémia	ACC 138 klón, DSMZ
Jurkat	akut T sejtes leukémia	E6-1 klón, American Type Culture Collection (ATCC)
CEM	akut T sejtes leukémia	#82112105 klón, European Collection of Cell Culture ECACC
HL60	promyelocitás leukémia	CCL-240 klón, ATCC
KMH2	Hodgkin lymphoma	ACC 8 klón, DSMZ
BHD1	Diffúz, nagy B-sejtes lymphoma	Prof. Dr. Peter Möller (Patológiai Intézet, Universität Ulm, Németország)

3.4. Áramlási citometria

A sejtek kezelése során az apoptózis vizsgálatokat Mihalik és mtsi (219) leírása alapján végeztük. A sejteket -20 °C-on tárolt, 70%-os etanolban fixáltuk szobahőmérsékleten. Lúgos extrakciót (200 mM Na₂HPO₄, pH 7,4), RNáz-t (100 µg/ml, Sigma), valamint propidium-jodid (1mg/ml, 95-98%, Sigma) festést alkalmaztunk. Az apoptózis vizsgálatok FACScan áramlási citométeren (BD Biosciences), CellQuest™ (BD) szoftver segítségével történtek (mintánként 10-20000 sejtet mértünk). Az apoptotikus – alacsony DNS tartalmú, szubG1 populáció (220) – sejtek százalékos arányát WinList (Verity Software House) szoftver segítségével mutattuk ki.

3.5. Western-blot

A sejteket először lízis pufferben (1 millió sejt/100 µl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 10 mM NaF, 1 mM PMSF, 0,5 mM Na-O-vanadát, 10 µg/ml leupeptid, 10% glicerol) lizáltuk, a lizátumot 30 percig jégen tartottuk, majd 20 percig 20000 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk. A felülúszóból Qubit fluorométer (Invitrogen) segítségével meghatároztuk a minták fehérjekoncentrációját. A lizátumokat 6-merkaptóetanolt tartalmazó Laemmli puffer (BioRad) 1:1 arányban felforraltuk, majd 10 percig jégen tartottuk. A

fehérjéket SDS-poliakrilamid gélen (10-12,5-15%-os) elektroforézis segítségével választottuk el, majd PVDF membránra (BioRad) blottoltuk. Blokkolást követően a membránokat az elsődleges antitestekkel – anti-foszfo-mTOR (1:1000, p-mTOR, Ser2448), anti-foszfo-S6 (1:1000, p-S6, Ser235/236), anti-foszfo-p70S6K (1:1000, p-p70S6K, Thr389) (Cell Signaling) – inkubáltuk 4°C-on, egy éjszakán át. Másodlagos előhívó rendszerként Vectastain Elite ABC kit-et (Vector Laboratories, Burlingame, CA, US) alkalmaztunk. A kemilumineszcens előhíváshoz ECL szubsztrátot használtunk (ECL Western Blotting Substrate, Pierce) és a membránokat Kodak Image Station 4000 MM kamerával (Eastman Kodak) fényképeztük le. A membránokat ezt követően levetkőztettük (Re-Blot Strong; Chemicon) és anti- β -aktin antitesttel (1:2500, Sigma) is előhívtuk, így ellenőrizve az azonos fehérjemennyiséget, a minták összehasonlíthatóságát.

3.6. ELISA vizsgálat

Az azonos sejtszámot tartalmazó mintákhoz (izolált B- és T sejtek, PMNC, humán ALL és lymphoma sejtvonalak, perifériás vér és csontvelői izolált primer ALL sejtek) 1 mM PMSF-et tartalmazó lízis puffert (1 millió sejt/100 μ l, Cell Lysis Buffer, Cell Signaling) adtunk, a lizátumot 30 percig jégen tartottuk, közben többször vortexeltük, majd 20 percig 20000 rpm fordulatszámmal 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszók fehérjemennyiségét Qubit fluorométer (Invitrogen, Carlsbad, CA, US) segítségével határoztuk meg, és különböző minták esetében mindig azonos mennyiségű fehérjét használtunk vizsgálatainkban. A p-mTOR, a p-S6, és a p-4EBP1 fehérjék detektálása szendvics ELISA kitek (p-mTOR, R&D System; PathScan p-S6 Ribosomal Protein, Ser235/236; PathScan p-4EBP1, Thr37/Thr46, Cell Signaling) alkalmazásával történt, a gyártó utasításának megfelelően: a hígított mintákat (100 μ l/minta, Sample Diluenttel történő 1:1 arányú hígítás) 96 lyukú plate-re pipettáztuk, és 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk. Az antitesttel (Detection Antibody, 37°C, 60 perc) történő inkubációt követően a detektálás HRP-konjugált anti-egér IgG másodlagos antitest (HRP-Liked Secunder Antibody, 37°C, 30 perc) alkalmazásával-, a vizualizálás TMB szubsztráttal (TMB Substrate, 37°C, 10 perc) történt. Az abszorpciót és optikai denzitást (OD) 450 nm hullámhosszon mértük. Pozitív kontrollként a p-mTOR, p-S6 és p-4EBP1 fehérjéket fokozottan expresszáló sejtvonalat (KMH2) használtunk, melyből minden vizsgálatunkban hígítási sort készítettünk.

3.7. Immuncitokémia

A vizsgálat során a metanolban fixált citospin lemezeket az endogén peroxidáz blokkolást (perjódsva – 10 perc; Na-borohidrid – 10 perc; hidrogén-peroxidáz (30%) és metanol 1:1 arányú keveréke – 20 perc) követően, lószérummal (3% – 30 perc) is blokkoltuk. Majd elsődleges ellenanyagokkal inkubáltuk 4 °C-on egy éjszakán át az alábbi hígításokban: anti-p-ERK – 1:25, anti-foszfo-mTOR – 1:25, anti-foszfo-p70S6K – 1:25, anti-foszfo-S6 – 1:100, anti-foszfo-4EBP1 – 1:100 (Cell Signaling). A detektálás Novolink polimer rendszerrel történt (Novocastra) a gyártó leírásának megfelelően, a reakció kimutatására DAB szubsztrát-kromogén (3,3'-diaminobenzidine) rendszert használtunk (Dako, Glostrup, Denmark). Hematoxolin háttérfestést követően a lemezek értékelése két független patológus segítségével történt. A festődés alapján gyenge, közepesen erős, és erős értékelést használtunk. Pozitív kontrollként olyan lymphoma sejtvonalakat alkalmaztunk (KMH2, BHD1), melyek a kérdéses fehérjét a munkacsoport korábbi vizsgálataiban erősen expresszálják.

Bizonyos esetben – újonnan diagnosztizált ALL-es betegek csontvelői sejtjeiben – indirekt jelölt, fluoreszcens immuncitokémiai vizsgálatot is végeztünk a p-S6 és p-4EBP1 aktivitás kimutatására folyadék fázisban. A vizsgálatokhoz 2 millió sejtet használtunk fel mintánként, és jelöltünk anti-foszfo-S6 vagy anti-foszfo-4EBP1 ellenanyagokkal (1:100, Cell Signaling). Ezt követően biotinilált anti-nyúl IgG másodlagos ellenanyagot (1:200, Vector Laboratories) és fluoreszcens festéket (1:50, Qdot 705 sztreptavidin konjugát, Invitrogen) alkalmaztunk. A mérések FACSCalibur áramlási citométeren (BD Biosciences) történtek, az adatokat CellQuest (BD Biosciences) szoftverrel értékeltük.

3.8. MikroRNS izolálás, cDNS átírás

A lymphoma és ALL sejtvonalakból, valamint primer ALL sejtekből mirVana™ miRNA izoláló kittel (Ambion, St. Austin, US) izoláltuk a miRNS-eket, és a mintákat használatig -70 C-on tároltuk. A cDNS átírás Mastercycler personal gép segítségével (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) történt TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, és Taqman MicroRNA Assay Kit-ekben található stem-loop RT primerek [(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), Applied Biosystems, Foster City, CA, US) (11. táblázat)]

alkalmazásával, a protokollnak megfelelően. A reverz transzkripcióhoz a következő ciklusparamétereket alkalmaztuk: ciklus: 16 °C 30 perc, 42 °C 30 perc, 85 °C 5 perc.

3.9. Valós idejű PCR

A miRNS-ek amplifikációjához TaqMan Gene Expression Master Mix-et (Applied Biosystems) és TaqMan MicroRNA Assay Kitekben található TM-primereket (miR-16, 21, 24, 29b, 128b, 142-3p, 155, 223, Applied Biosystems) használtunk (11. táblázat). A reakció 96-os plate-en zajlott 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) készüléken, a következő ciklusparaméterek alkalmazásával: 95°C 10 perc, [95°C 15 másodperc, 60°C 1 perc] x 50 ciklus. Három párhuzamos mintával dolgoztunk és a miRNS expresszió relatív értékét a belső kontrollként szolgáló RNU6B szintjéhez (Applied Biosystems) normalizáltuk, melyet gyakran alkalmaznak referenciaként hematológiai daganatok miRNS vizsgálataiban (221, 222). Az eredményeket Ct (threshold cycle) értékek formájában kaptuk meg. Az adatokat 7500 software v.1.3.0-, és DataAssist v.2.0 program (Applied Biosystems) segítségével értékeltük. Egészséges donorok perifériás véréből izolált mononukleáris sejtek (PMNC), T-sejtek, valamint tonsilla palatinából izolált B-sejtek miRNS expresszióját összehasonlítottuk, melyben nem találtunk szignifikáns különbséget. A további vizsgálatainkban ezért perifériás mononukleáris sejtek expressziójához viszonyítottunk, melyet 100%-nak, azaz 1-nek tekintettük az összehasonlításokban. Nem leukémiás és akut lymphoid leukémiás betegek perifériás vér és csontvelői mononukleáris sejtjeinek miRNS expresszióját összehasonlítva, ugyancsak nem 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.

11. táblázat. A vizsgált miRNS-ek primer szekvenciája.

Vizsgált miRNS	5' - 3' szekvencia	5' - 3' szekvencia	3' - 5'szekvencia
	RT-primer	PCR-primer (forward)	PCR-primer (reverz)
hsa-miR-16	cctttgaggttggtactacggcgccaatat	acctttgaggttggtactacgg	gtgcagtagcagcacgtaaat
hsa-miR-21	cactgtctagcacgacactaatcaacatcag	ccactgtctagcacgacactaa	gccaggcatagcttatcagactg
hsa-miR-24	gcacatgactcgtagatagcggctgttcctg	cgacatgactcgtagatagcgg	tgcgtggctcagttcagc
hsa-miR-29b	caagccctagtattcctcgacaacactgatt	gcaagccctagtattcctcgac	agctccgtatagcaccatttgaaa
hsa-miR-128b	catccggctatgctattggaaagagacc	cctcatccggctatgctattg	tggcgtcacagtgaaccg
hsa-miR-142-3p	cttgcatagtgcgcgtaataatccataaagt	ccttgcatagtgcgcgtaataa	ggaatccctgtaggtttcctact
hsa-miR-155	ccagaaaccgatcagagtgtcccctatca	ttccagaaaccgatcagagtgt	cgccatgtttaatgctaactgta
hsa-miR-223	aggcgtcgagcttaatgtcggggattttg	tctaggcgtcgagcttaatgtc	cgtagccctgtagttgtcaa

3.10. Statisztika

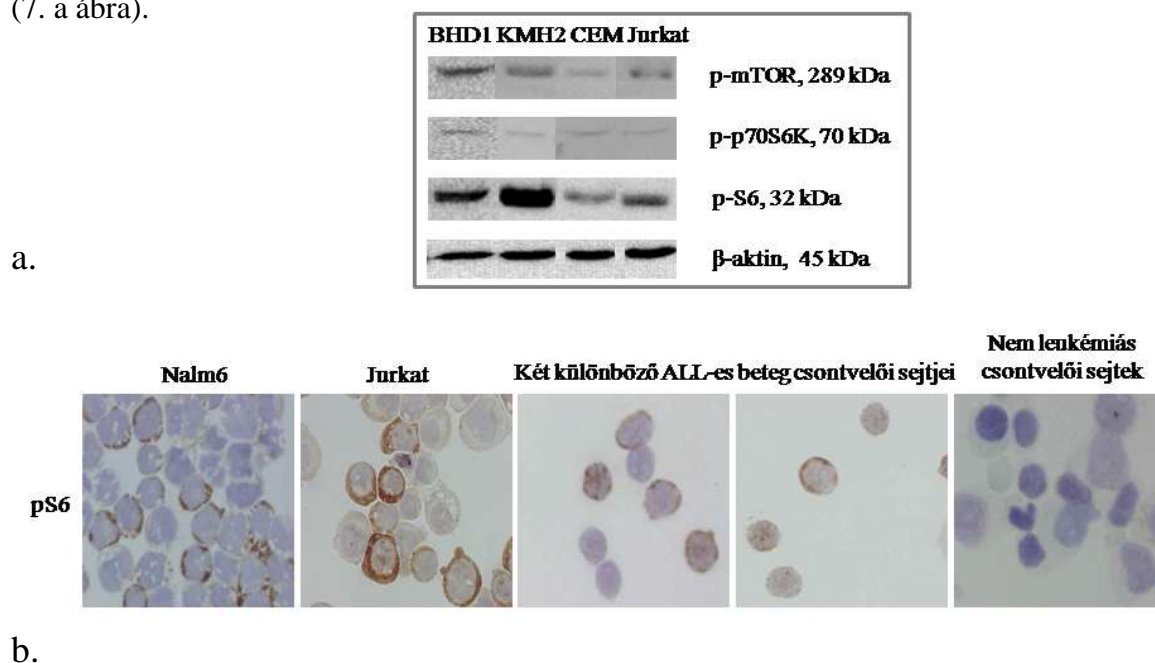
Az adatok kiértékelése normál eloszlás esetében kétmintás párosított t-próbával (Statistica 9.0) történt, ha a minta eloszlása nem mutatott normál eloszlást Mann-Whitney U tesztet (Statistica 9.0) alkalmaztunk. A kategorikus változók összehasonlításához Chi² és Fisher-féle exakt teszteket használtunk. A Chi² teszt elvégzésének feltétele, hogy minden alkategóriában megfelelően nagy esetszám legyen. Ahol ez nem teljesül, ott alkalmaztuk a Fisher-féle exakt tesztet. Az ELISA OD cutoff érték-, illetve a miRNS 128b relatív expressziós határérték meghatározása – a betegek prognózisát figyelembe véve – ROC analízissel történt, kovariancia vizsgálat (SPSS) segítségével. A teljes, illetve relapszus mentes túlélés vizsgálatához Kaplan-Meier-féle túlélési analízist alkalmaztunk. A túlélési intervallumok meghatározásánál a teljes túlélés esetében a diagnózis megállapításától a halál bekövetkeztéig, míg a relapszus mentes túlélés meghatározásánál a relapszusig eltelt időt vettük figyelembe. Az mTOR aktivitását jelző p-4EBP1 értékek túlélésre kifejtett hatását egyes prognosztikai csoportokban log-rank teszt segítségével vizsgáltuk. Különböző prognosztikai faktorok multivariancia analíziséhez Cox regressziós modellt használtunk. A p-4EBP1 és miR 128b expresszió közötti korreláció vizsgálatához Spearmann-féle korreláció analízist alkalmaztunk. Az elemzést SPSS 15.1 (SPSS Inc.), illetve Stat Soft STATISTICA 9.0 szoftverekkel végeztük. Statisztikailag szignifikánsnak a p<0,05 értéket tekintettük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az mTOR jelátviteli útvonal aktivitásának vizsgálata

4.1.1. Az mTOR jelátviteli útvonal aktivitásának vizsgálata humán ALL sejtvonalakban és izolált gyermekkori ALL sejtekben

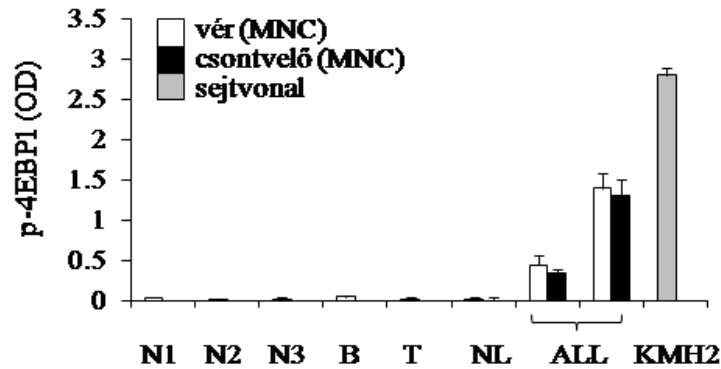
Az mTOR jelátviteli útvonal aktivitásának meghatározásához a p-mTOR, a p-S6, a p-p70S6K és a p-4EBP1 fehérjék mennyiségét vizsgáltuk Western blot, immuncitokémiai, ELISA, valamint áramlási citometriai módszerekkel. Vizsgálatainkhoz pozitív kontrollként a KMH2 és BHD1 – Hodgkin, illetve DLBCL – sejtvonalat használtuk ismert magas mTOR aktivitásuk miatt. Western blot-tal az mTOR aktív (p-mTOR) formájának, valamint az mTOR direkt (p-p70S6K) és indirekt (p-S6) célmolekuláinak mennyiségét mutattuk ki. T-ALL sejtvonalakban (CEM, Jurkat) igazoltuk a p-mTOR, p-p70S6K és p-S6 fehérjék expresszióját, mely a lymphoma sejtvonalaknál (KMH2, BHD1) tapasztalt expressziónál alacsonyabb volt (7. a ábra).



7. ábra. mTOR aktivitás függő foszforilált fehérjék expressziója humán sejtvonalakban és izolált gyermekkori ALL sejtekben (Western blot, immuncitokémia). a. A p-mTOR, p-p70S6K és p-S6 fehérjék expressziója lymphoma (BHD1: diffúz, nagy B-sejtes lymphoma; KMH2: Hodgkin-lymphoma) és T-ALL sejtvonalakban (CEM, Jurkat) – Western blot. b. A p-S6 immuncitokémia Nalm6 (B-ALL), Jurkat (T-ALL) sejtekben és ALL-es és nem leukémiás mintákból származó izolált csontvelői mononukleáris sejtekben (immuncitokémia; DAB festés – barna reakció, 400x).

Immuncitokémiával citospin lemezeken humán B- és T-ALL sejtvonalak mellett, gyermekkori ALL-es betegek csontvelői sejtjeiben is detektáltuk az mTOR jelátviteli útvonal aktivitását jelző foszforilált célmolekulák fokozott expresszióját. Gyermekkori ALL-es betegek csontvelői mintáiban (n=7) egyénekenként változó mértékű p-S6 expressziót detektáltunk (7. b ábra).

Az mTOR jelátviteli útvonal aktivitását jelző fehérjék expresszióját gyermekkori ALL-es betegek (n=21) csontvelői mintáiban ELISA-val is meghatároztuk. Három különböző ELISA kitet – p-mTOR, p-4EBP1, p-S6 – próbáltunk ki, melyek közül a p-mTOR kit nem működött megfelelően. Így további vizsgálatainkban az mTOR kináz két fontos célmolekulájának, a p-4EBP1-nek és a p-S6-nak az expresszióját határoztuk meg humán ALL sejtvonalakban, valamint primer ALL sejtekben. Az mTOR jelátviteli útvonal aktivitását megvizsgáltuk egészséges donorok (n=3) perifériás vérből izolált mononukleáris sejtekben (PMNC), tonsilla palatinából izolált B-, és perifériás vérből izolált T-sejtekben, illetve nem leukémiás vér- és csontvelői mononukleáris sejtekben is. Nem találtunk szignifikáns különbséget az mTOR aktivitásban az egyes normál lymphoid sejtek és a vérből vagy csontvelőből izolált mononukleáris sejtek esetében, ezért a továbbiakban eredményeinket a PMNC-ek OD értékeinek átlagához viszonyítottuk, melyet 100%-nak (azaz 1-nek) tekintettünk az összehasonlításban. Szignifikáns különbséget ugyanazon személy (leukémiás vagy nem leukémiás) egyidejű perifériás vér- és csontvelői mintáinak p-S6 és p4EBP1 expressziójában sem tapasztaltunk, így vizsgálatainkban mindkét típusú mintát felhasználhattuk. Pozitív kontrollnak a magas mTOR aktivitású KMH2 (Hodgkin-lymphoma) sejtvonalat használtuk (p-4EBP1 OD: 2.8 ± 0.01 ; pS6 OD: 0.37 ± 0.02) (8. ábra). Az ALL sejtvonalakban (T-ALL – Jurkat, CEM; B-ALL – Nalm6, Mn60) a normál lymphoid sejtekhez viszonyítva, szignifikánsan emelkedett p-S6 (5,9 – 21,2x) és p-4EBP1 (63,5 – 77,6x) fehérje expressziót detektáltunk (12. táblázat).



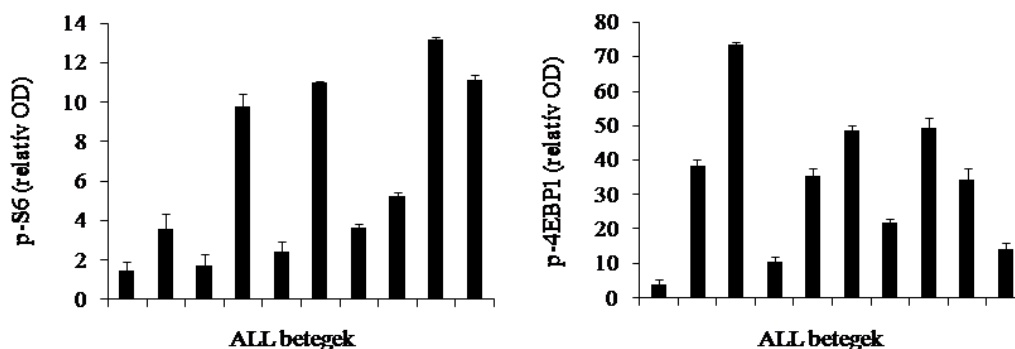
8. ábra. p-4EBP1 expresszió vizsgálata normál lymphoid- és ALL sejtekben (ELISA). A p-4EBP1 OD értékek ábrázolása kontroll perifériás mononukleáris sejtekben (N1, N2, N3), normál B- és T-sejtekben (B, T), nem leukémiás beteg (NL)-, illetve gyermekkori ALL-es betegek vér- és csontvelői sejtjeiben (reprezentatív beteg minták), valamint a pozitív kontrollként használt KMH2 sejtvonalban. (OD – optikai denzitás; MNC – mononukleáris sejtek; PMNC – perifériás mononukleáris sejtek; KMH2 – Hodgkin lymphoma sejtvonal).

12. táblázat. mTOR aktivitás függő foszforilált fehérjék (p-S6 és p-4EBP1) fokozott expressziója humán ALL sejtvonalakban (ELISA). p-S6 és p-4EBP1 relatív expressziója T-ALL (Jurkat, CEM) és B-ALL (Nalm6, Mn60) sejtvonalakban. (A relatív OD értékek kiszámításánál a normál PMNC sejtek expressziójához viszonyítottunk, melyet 1-nek tekintettük. OD – optikai denzitás; PMNC – perifériás mononukleáris sejtek).

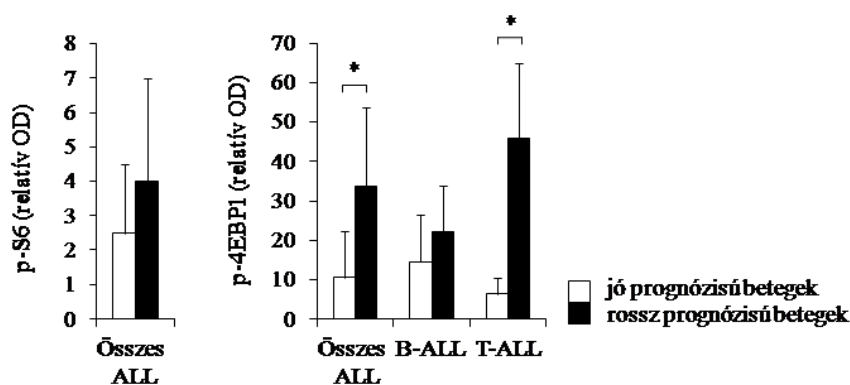
Sejtvonal	p-S6		p-4EBP1	
	OD	relatív OD	OD	relatív OD
Jurkat	0,397	19,85x	2,537	63,425x
CEM	0,118	5,9x	3,102	77,55x
Nalm6	0,323	16,15x	3,063	76,575x
Mn60	0,423	21,15x	2,895	72,375x
PMNC	0.02	1x	0.04	1x

A gyermekkori ALL-es betegek (n=21) diagnosztikus mintáiban (vér- és csontvelői minták is) betegenként eltérő, ugyanazon beteg esetében a kétféle mintában szignifikánsan nem különböző, emelkedett p-S6 (1,45-13,2x) és p-4EBP1 (4-73,3x) expressziót tudunk

kimutatni ELISA-val. Ez az ALL sejtek fokozott mTOR aktivitására utal (9. a ábra). A gyermekkori ALL minták esetében tapasztalt mTOR aktivitás különbségek és az ALL sejtípusának, az adott betegek prognózisának (jó- és rossz prognózis) összefüggését vizsgálva azt találtuk, hogy a p-4EBP1 magasabb expressziós értékei szignifikánsan összefüggnek a rosszabb prognózissal, ez az összefüggés a T-ALL-es betegeknél kifejezettebben jelentkezett (prognózis besorolás lásd. módszerek fejezet) (9. b ábra).



a.



b.

9. ábra. p-S6 és p-4EBP1 fokozott expressziója gyermekkori ALL sejtekben (ELISA). a.

A p-S6 és p-4EBP1 fehérjék relatív expressziója ugyanazon ALL-es betegek (n=10) csontvelői mintáiból izolált leukémia sejtekben (p-S6 – 1,45-13,2-szeres, p-4EBP1 – 4-73,3-szoros aktivitás a normál lymphoid sejtekhez viszonyítva). b. A p-S6 és p-4EBP1 expresszió relatív OD értékei gyermekkori ALL-es betegek jó- és a rossz prognózisú betegcsoportjaiban. (A relatív OD értékek kiszámításánál a kontroll PMNC sejtek expressziójához viszonyítottunk, melyet 1-nek tekintettük. A prognózis besorolást lásd a módszerek fejezetnél. OD – optikai denzitás; * p<0,05).

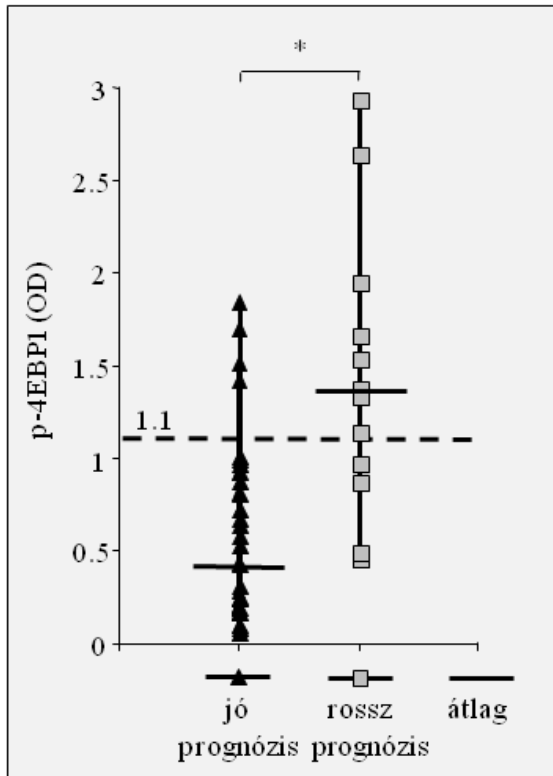
4.1.2. Gyermekkori ALL-es betegek mTOR aktivitásának és klinikai adatainak összefüggése

Az mTOR aktivitás és a prognózis összefüggésének vizsgálatához az esetek számát bővítettük, és 49 beteg 0. napi, ELISA vizsgálattal meghatározott p-4EBP1 expresszió értékét használtuk fel. A betegek prognózisát figyelembe véve szignifikáns összefüggést tudtuk kimutatni a p-4EBP1 mennyisége, és a betegek prognózis szerinti megoszlása között. A rossz prognózisú betegek 0. napi csontvelői mintáiban szignifikánsan magasabb volt az mTOR aktivitást jelző p-4EBP1 fehérje expressziója a jó prognózisú betegcsoporthoz viszonyítva. Eredményeink alapján p-4EBP1 ELISA esetében meghatároztunk egy OD értéket (OD: 1.1), mely alapján a betegeket jó (OD<1.1) és rossz (OD>1.1) prognózisú betegcsoportba sorolhattuk. Ennek az értéknek a specificitását (89%), és szenzitivitását (67%) ROC analízissel határoztuk meg. Az 1.1-es cutoff OD érték 27,5-szeres p-4EBP1 expresszió fokozódást jelent a normál PMNC sejtekhez viszonyítva (10. ábra).

Az 1.1 p4EBP1 OD értéknél alacsonyabb illetve magasabb expresszióval jellemzett betegcsoportok klinikai adatait (életkor, nem, sejtípus, 8. napi szteroid válasz, fehérvérsejtszám, kariotípus, prognózis, jelenlegi állapot) tovább vizsgáltuk. Mindkét sejtípusban (B- és T-ALL) szignifikáns összefüggést tudunk kimutatni az 1.1 OD értéknél magasabb p-4EBP1 expresszióknak megfelelő magasabb mTOR aktivitás és a betegek rossz prognózisa, rossz 8. napi szteroid válasza, valamint a nem hiperdiploid kariotípusa között. A betegek túlélési adatait megvizsgálva kimutattuk, hogy a meghatározott 1.1-nél alacsonyabb p-4EBP1 OD értékek szignifikáns összefüggést mutatnak a relapszus mentes túléléssel. További klinikai adatokkal nem találtunk szignifikáns összefüggést (13. táblázat). Kaplan-Meier görbe segítségével ábrázoltuk az mTOR aktivitás és a betegek túlélési idejének összefüggését. Az 1.1 OD értéknél alacsonyabb p-4EBP1 értékekkel, alacsonyabb mTOR aktivitással jellemezhető betegek (n=37) teljes, és relapszus mentes túlélése szignifikánsan jobb volt az 1.1 OD értéknél magasabb p-4EBP1 értéket mutató, magasabb mTOR aktivitással jellemzett betegekhez (n=12) viszonyítva (p=0.00012; p=0.00032). A betegeket a vizsgálat befejezéséig követtük, az átlagos követési idő 31.02 hónap (8 – 55.2 hónap) volt (11. ábra).

Multivariancia analízissel vizsgáltuk általános prognosztikai faktorok – életkor, nem, immunfenotípus, kezdeti fehérvérsejtszám – valamint az mTOR aktivitás prognózissal összefüggő relatív rizikóját. Kimutattuk, hogy a fokozott mTOR aktivitást jelző magas (1.1<) p4EBP1 OD érték – önmagában, egyéb változóktól függetlenül – szignifikánsan növeli a

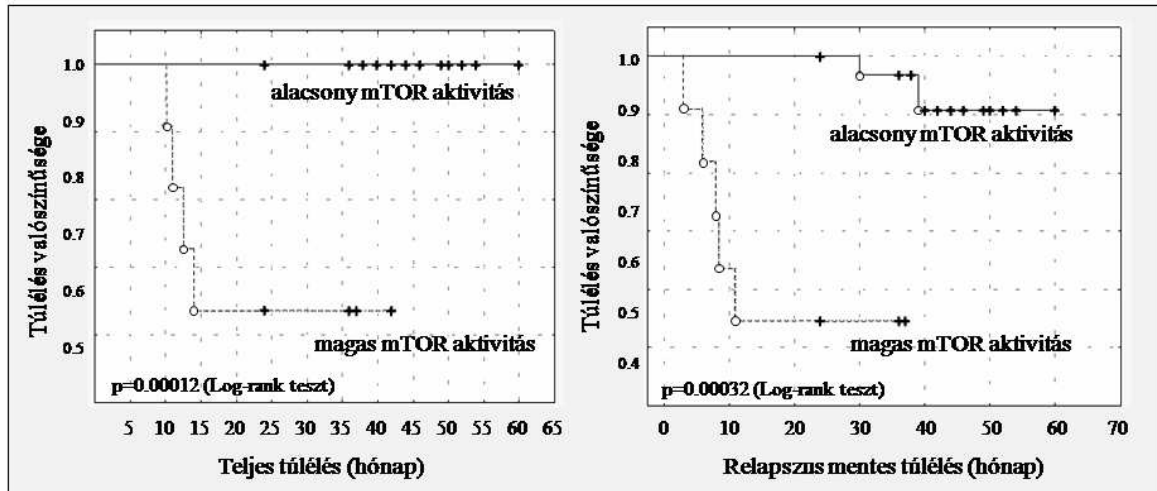
rossz prognózis-, a relapszus és a rossz terápiás válasz előfordulásának rizikóját (37-szeres rizikó az alacsony mTOR aktivitással rendelkező betegcsoporthoz viszonyítva) (14. táblázat).



10. ábra. p-4EBP1 expresszió jó- és rossz prognózisú ALL-es betegek csontvelői sejtjeiben (ELISA). A jó (n=37) és a rossz prognózisú (n=12) ALL-es betegek p-4EBP1 OD értékei szignifikánsan különböztek egymástól. A meghatározott p-4EBP1 OD cutoff érték az alacsonyabb (jó prognózis) és magasabb (rossz prognózis) mTOR aktivitású betegcsoport között 1.1 volt. (A prognózis besorolást lásd a módszerek fejezetnél; OD – optikai denzitás; * p<0,05).

13. táblázat. Gyermekkori akut lymphoid leukémiás betegek (n=49) klinikai adatainak és mTOR aktivitásának összefüggése. § – a p-4EBP1 ELISA OD cutoff érték (OD=1.1) alapján történő besorolás; # – életkor a diagnózis megállapításakor; ** – a hyperdiploid csoportba soroltunk két beteget, akiknél ETV6/RUNX1 fúziót mutattak ki; *** – prognózis meghatározása lásd módszerek; & – a betegek állapota a vizsgálat befejezéséig. (SR – alacsony, IR – közepes, HR – magas rizikójú kezelési ág; TX – transzplantáció; TRM – transzplantációhoz kapcsolódó halálozás; ϕ – Fisher exakt és χ^2 tesztek; π – szignifikáns korreláció az mTOR aktivitással).

	összes eset	%	alacsony mTOR aktivitás§	%	magas mTOR aktivitás§	%	p
ALL betegek száma (%)	49	100	38	79	11	21	
Életkor #							
6 éves vagy >	29	59	23	79	6	21	0,722 χ
6 éves <	20	41	15	75	5	25	
Nem							
nő	15	31	14	93	1	7	0,137 ϕ
férfi	34	69	24	71	10	29	
Immunfenotípus							
pre-T	8	16	4	50	4	50	
pre-B	41	84	34	83	7	17	0,063 ϕ
Szteroid válasz, π							
jó válasz a 8. napon	40	81	35	88	5	12	
rossz válasz a 8. napon	9	19	3	33	6	67	<<0,05 χ
Fehérvérsejtszám							
20 G/l vagy >	21	43	17	81	4	19	
20 G/l <	28	57	21	75	7	25	0,737 ϕ
Kariotípus **, π							
normál	24	49	24	71	7	29	
hyperdiploid	21	43	20	95	1	5	<0,05 χ
rossz prognózisra utaló genetikai eltérések	4	8	1	25	3	75	
Prognózis ***, π							
jó	37	76	33	89	4	11	<<0,05 ϕ
rossz	12	24	4	33	8	67	
Jelenlegi állapot &, π							
betegség mentes remisszó SR	21	43	20	95	1	5	
IR	16	33	13	81	3	19	
HR	5	10	3	60	2	40	<<0,05 χ
remisszió (relapszust követően vagy TX)	3 - 2 IR; 1HR	6	2	67	1	33	
elhalálozás (progressziót követően vagy TRM)	4 - 1 IR; 3HR	8	0	0	4	100	



a.

b.

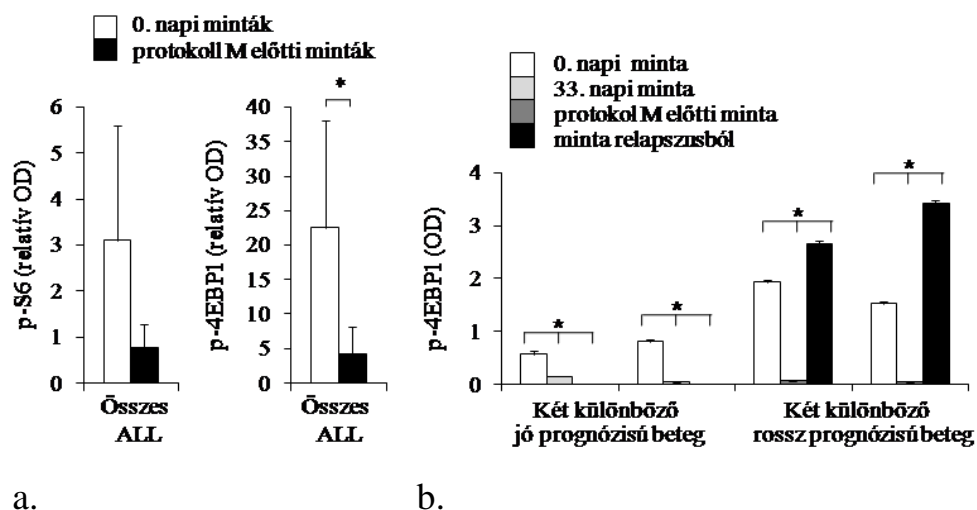
11. ábra. mTOR aktivitás összefüggése a gyermekkori ALL-es betegek túlélésével (Kaplan-Meier görbe). a. A teljes és b. relapszus mentes túlélést ábrázoltuk. A betegek alacsony (n=37), illetve magas (n=12) mTOR aktivitással rendelkező betegcsoportba történő besorolása 1.1-es p-4EBP1 cutoff OD értéknél. (o – komplett események; + – nem teljes adatok; $p < 0.05$; Log-rank teszt).

14. táblázat. Független prognosztikai tényezők multivariancia analízise gyermekkori ALL-ben. Az életkor, a nem, az immunfenotípus, a fehérvérsejtszám, valamint az mTOR aktivitás prognózissal való összefüggése. # – a betegek mTOR aktivitás szerinti besorolása az 1.1-es p-4EBP1 cutoff OD értéknél. (RR – relatív rizikó; 95% CI – 95% konfidencia intervallum; na – nem alkalmazható; π – szignifikáns korreláció).

Prognosztikai faktorok	RR (95% CI)	p
Életkor évben ($\leq 6 \sim > 6$)	0.204 (0.025-1.65)	0.136
Nem (nő ~ férfi)	na	1.
Immunfenotípus (B ~ T)	5.148 (0.429-61.8)	0.196
Fehérvérsejtszám ($\leq 20 \text{G/l} \sim > 20 \text{G/l}$)	0.249 (0.025-2.48)	0.236
mTOR aktivitás (alacsony ~ magas) #, π	37.07 (2.552-538.51)	0.0081

4.1.3. Az mTOR aktivitás vizsgálata a kezelés közben gyűjtött követéses ALL mintákból izolált mononukleáris sejtekben

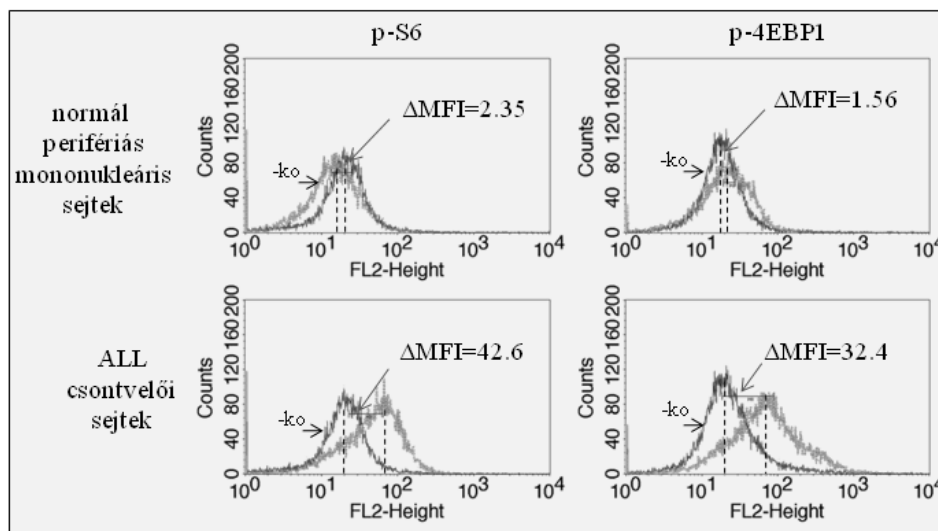
21 beteg mintáiban vizsgáltuk az mTOR aktivitás függő foszforilált fehérjék p-S6 és p-4EBP1 expresszióját ELISA-val. Valamennyi vizsgált esetben (prognózistól függetlenül) a p-S6 és p-4EBP1 expresszió csökkent a kezelés 3. hónapjára, a lymphoblasztok egyidejű csökkenésével. A jó prognózisú, alacsonyabb kezdeti mTOR aktivitással ($OD < 1.1$) rendelkező betegek esetében a p-4EBP1 expresszió a kezelés alatti követéses mintákban lecsökkent (a kezelés előtti mintákhoz viszonyítva), és a két éves követési idő alatt sem emelkedett. A kezdeti magas ($OD > 1.1$) p-4EBP1 expressziót mutató, később rossz prognózisú betegek esetében a p-4EBP1 fehérje expressziója ugyan szignifikánsan csökkent a kezelés 3. hónapjára, relapszusban azonban a kezdeti érték fölé emelkedett, jelezve a magas mTOR aktivitással rendelkező ALL sejtek megjelenését és arányának növekedését a mintákban (12. ábra).



12. ábra. mTOR aktivitás függő foszforilált fehérjék expressziójának változása a kezelés során gyűjtött ALL-es minták mononukleáris sejtjeiben (ELISA). **a.** A p-S6 és p-4EBP1 fehérjék mennyisége a 0. napi és a protokoll M előtti mintákban **b.** A p-4EBP1 expresszió két jó- és két rossz prognózisú beteg 0. napi, 33. napi, protokoll M előtti, valamint relapszusból származó mintáiban. (A relatív OD értékek megadásakor a normál PMNC sejtek expressziójához viszonyítottunk; OD – optikai denzitás; * $p < 0,05$).

4.1.4. Az mTOR aktivitás kimutatása gyermekkori ALL-es mintákban áramlási citometriával

ELISA eredményeink alapján felmerült az mTOR aktivitás meghatározásának jelentősége más módszerekkel is. Az ALL rutin diagnosztikájában CD markerek és intracelluláris fehérjék expressziójának meghatározása a tipizálás és követés során áramlási citometriával történik. Áramlási citometriai vizsgálatainkban indirekt fluoreszcens festéssel jelölten p-S6 és p-4EBP1 ellenanyagok segítségével vizsgáltuk az mTOR aktivitás függő foszforilált fehérjék mennyiségét. A vizsgált gyermekkori ALL-es csontvelői mintákban (n=3) a fokozott p-4EBP1 és p-S6 expressziót ezzel a módszerrel is ki tudtuk mutatni, az átlagos fluoreszcencia intenzitás változás (ΔMFI) – a nem leukémiás, kontroll sejtekhez viszonyítva – 15-20 szoros volt (13. ábra).

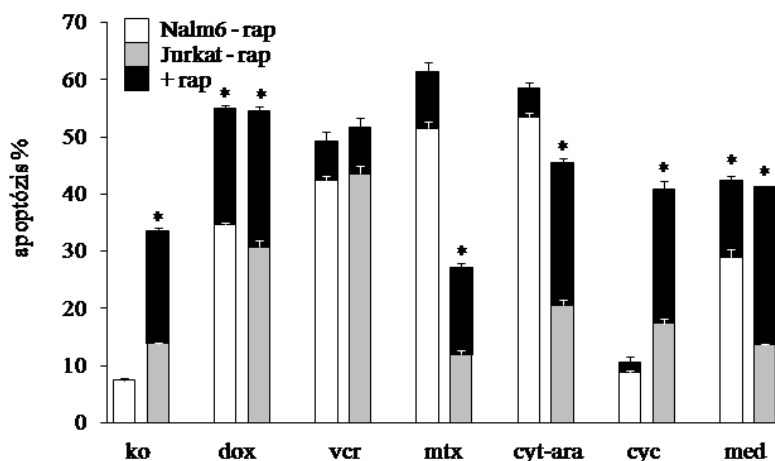


13. ábra. p-4EBP1 és a p-S6 expresszió vizsgálat eredménye egy ALL-es beteg és egy egészséges kontroll személy mintájában (áramlási citometria). A hisztogrammon a p-S6 és p-4EBP1 expressziójának áramlási citometriai vizsgálat eredménye látható normál PMNC és akut lymphoid leukémiás beteg csontvelői sejtjeiben. A p-S6 és p-4EBP1 expresszió mértékét a negatív kontrollhoz (-ko) viszonyítva, a fluoreszcencia intenzitás különbségeként (ΔMFI) adtuk meg. A különbségek (ΔMFI) a normál perifériás mononukleáris sejteknél 2.35 (p-S6), és 1.56 (p-4EBP1), a bemutatott ALL-es esetben 42.6 (p-S6), illetve 32.4 (p-4EBP1). (PMNC – perifériás mononukleáris sejtek; ΔMFI – fluoreszcencia intenzitás különbsége).

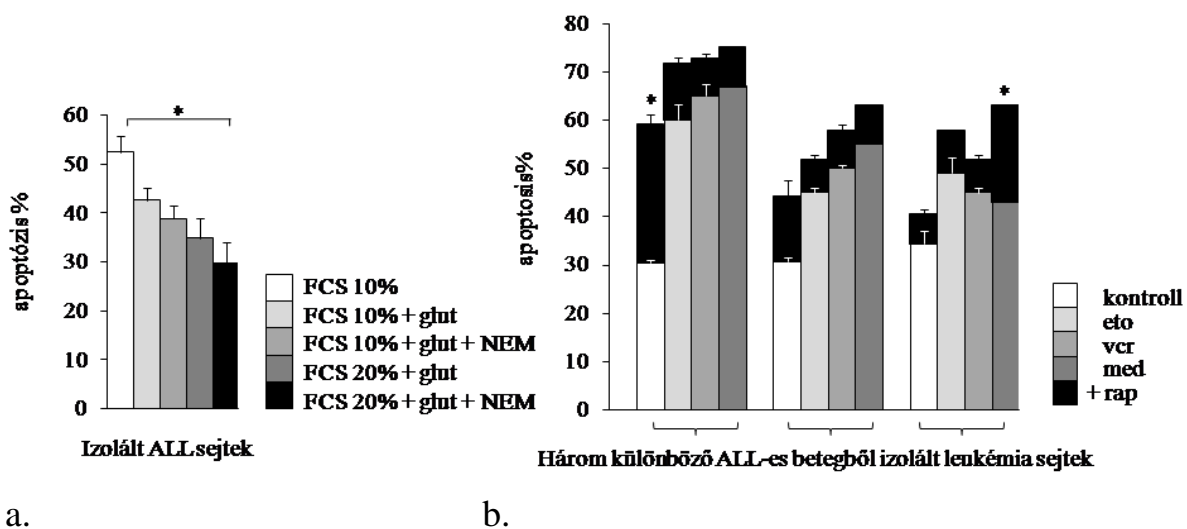
4.1.5. A rapamycin apoptózis indukáló hatása kemoterápiás szerekkel humán ALL sejtekben

In vitro vizsgáltuk a rapamycin apoptózis indukáló hatását ALL sejtekben, önmagában, vagy kemoterápiás szerekkel kombinációban. Beállítottuk a különböző kemoterápiás szerek olyan minimális koncentrációját, melyek apoptózis indukáló hatása még fokozható. Kísérleteinkben humán ALL sejtvonalakat (B-ALL – Nalm6, Mn60; T-ALL – Jurkat, CEM) kezeltünk (24-72 óra) konvencionálisan alkalmazott, ismert szerek alacsony dóziséval (doxorubicin, vincristin, methotrexate, cytosin-arabinoside, cyclophosphamide vagy methyl-prednisolon), rapamycinnel és kombinációjukkal. A Nalm6, Mn60 és CEM sejtvonalak esetében a 72 órás rapamycin kezelés antiproliferatív hatását tudtuk kimutatni, míg Jurkat sejtvonalnál a proliferációgátlás mellett, a spontán apoptózis mértéke is emelkedett. A kombinációs kezeléseknél a legérzékenyebb, Jurkat és a Nalm6 sejtvonalak esetében a rapamycin minden alkalmazott kemoterápiás szer apoptotikus hatását fokozta (szignifikánsan a Nalm6 sejtvonalban csak a doxorubicin és a methyl-prednisolon hatását) (14. ábra). Az Mn60 és CEM sejtvonalak esetében ennél kisebb mértékű érzékenységet találtunk, az Mn60 sejtvonal esetében a rapamycin fokozta a cytosin-arabinoside, etoposide és methyl-prednisolon apoptózis indukáló hatását, míg a CEM sejtvonal esetében ez a hatás csak a methyl-prednisolonnal kombinációban volt megfigyelhető.

Gyermekkori ALL-es betegek izolált leukémia sejtjeit – újonnan diagnosztizált (n=3), illetve relabáló (n=2) betegek – rövid ideig, 24 órán keresztül kezeltük. Izolált primer leukémia sejtek spontán apoptózisának mértéke 30-50% is lehet 24-48 óra tenyésztés után. Ezt próbáltuk csökkenteni a tenyésztési feltételek optimalizálásával – 20%-os FSC, 0,03% L-glutamin, nem esszenciális aminosavak hozzáadása – (15. a ábra). A legoptimálisabb feltételek kiválasztása után az izolált ALL sejtek 24 órás tenyésztését követően 30,7 – 60,5% spontán apoptózist tapasztaltunk. Vizsgálatainkban a rapamycin és a rapamycin kombinációs kezeléseket (doxorubicin, etoposide, vincristin, methotrexate, methyl-prednisolon, cytosin-arabinoside, cyclophosphamide) apoptotikus hatásait teszteltük *in vitro*. A rapamycin a kemoterápiás szerek hatását különböző mértékben fokozta (10 – 91%). Két beteg esetében (1 újonnan diagnosztizált, 1 relabáló beteg) a rapamycin és a kombinációs kezeléseket apoptózis indukáló hatása nem volt szignifikáns (<10%), három beteg esetében (2 újonnan diagnosztizált, 1 relabáló beteg) a rapamycin önmagában is fokozta az apoptózist, és növelte az etoposide, vincristin és methyl-prednisolon apoptózis indukáló hatását (15. b ábra).



14. ábra. Rapamycin kombinációs kezelések *in vitro* apoptózis indukáló hatása humán ALL sejtvonalakban (áramlási citometria). Rapamycin és kemoterápiás szerek 72 órás kezelése Nalm6 (B-ALL) és Jurkat (T-ALL) sejtekben. (ko – kezeletlen kontroll; dox – doxorubicin, 100 nM; vcr – vincristin, 3 nM; mtx – methotrexate, 20 nM; cyt-ara: – cytosin-arabinoside, 10 ng/ml, cyc – cyclophosphamide, 500 nM; med – methyl-prednisolon, 100 nM; rap – rapamycin, 50 ng/ml. (* szignifikáns apoptózis fokozódás, $p < 0,05$).



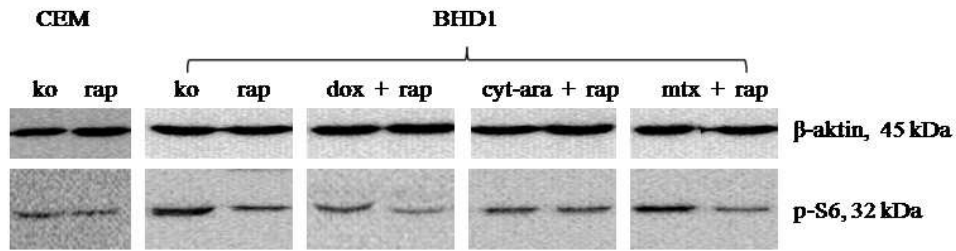
15. ábra. Gyermekkori ALL sejtek short-term tenyésztése és kezelése rapamycinnel és kemoterápiás szerekkel. **a.** Izolált gyermekkori ALL sejtek tenyésztési feltételeinek beállítása (FCS – foetalis borjúsérum; glut – L-glutamin; NEM – nem esszenciális aminosavak). **b.** Az etoposide (eto, 10 nM), vincristin (vcr, 3 nM), és methyl-prednisolon (med, 100 nM) rapamycin (rap, 50 ng/ml) 24 órás kombinációs kezelésének apoptózis indukáló hatása gyermekkori ALL-es betegekből ($n=3$) izolált leukémia sejtjeikben. (* $p < 0,05$).

4.1.6. A rapamycin csökkenti az mTOR aktivitás függő foszforilált fehérjék mennyiségét humán ALL és lymphoma sejtekben

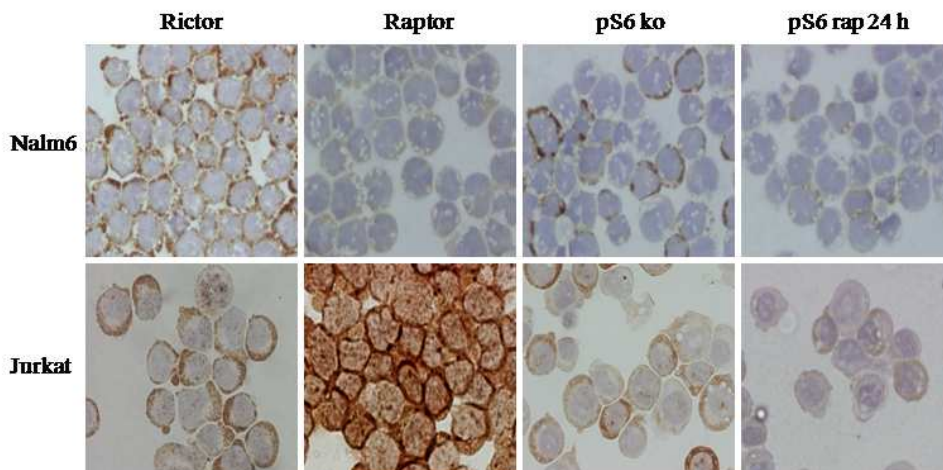
A rapamycin és különböző kombinációs kezelések mTOR aktivitásra gyakorolt hatását a célfehérjék foszforilált formáinak mennyiségi vizsgálatával követtük Western blot, immuncitokémia és ELISA segítségével humán ALL és lymphoma sejtekben. Western blot-tal humán T-ALL sejtvonalak (CEM) esetében az *in vitro* rapamycin kezelést (48 óra) követően nem tudtunk jelentős p-S6 expresszió csökkenést kimutatni. A BHD1 (kontroll lymphoma) sejtvonala esetében azonban, a rapamycin önmagában és kombinációban is – doxorubicin, cytosin-arabinoside, methotrexate – csökkentette az mTOR aktivitás függő p-S6 fehérje expresszióját (16. ábra).

Humán ALL sejtvonalakban (Nalm6 és Jurkat) immuncitokémiával vizsgáltuk a rapamycin (24 óra) kezelés mTOR jelátviteli útvonal aktivitásának változására kifejtett hatását és az mTOR komplexeket alkotó fehérjék (Raptor, Rictor) mennyiségét. Az mTOR aktivitást jelző p-S6 expresszió mindkét vizsgált sejtvonalonban csökkent a kezelés hatására. A rapamycin kezelés (72 óra) apoptózis indukáló hatását Jurkat sejtekben figyeltük meg, a Nalm6 kevésbé volt érzékeny (csak proliferációgátló hatás, ld. 14. ábra, 59. oldal). A két komplex mennyiségére utaló Rictor és Raptor expresszióban ezzel összefüggő eltérést tapasztaltunk. Nalm6 sejtekben alacsony Raptor és magas Rictor, míg a Jurkat sejtekben magas Raptor és alacsonyabb Rictor expressziót mutattunk ki. A kevésbé érzékeny Nalm6 sejtekre tehát az mTORC2 komplex, míg a rapamycin érzékeny Jurkat sejtekre az mTORC1 komplex magasabb expressziója jellemző (17. ábra).

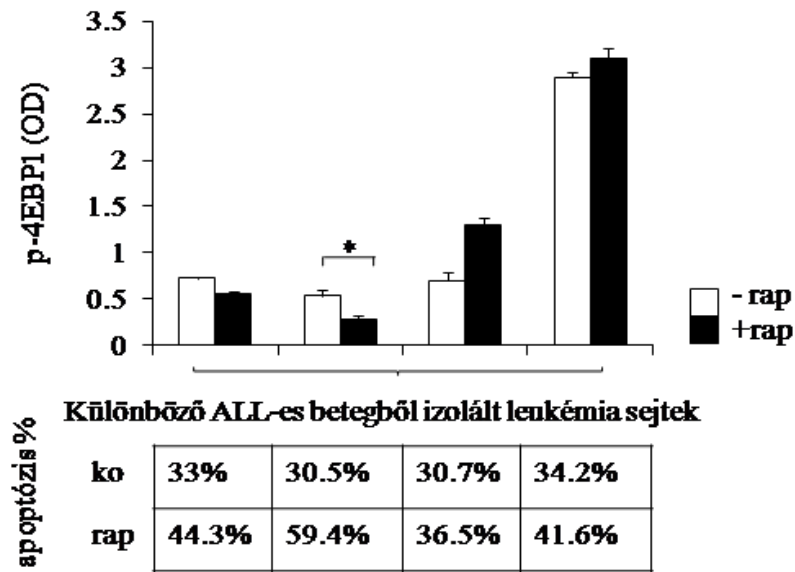
Gyermekekori ALL-es betegek (n=4) izolált csontvelői sejtjeinek *in vitro* rapamycin (24 óra) kezelését követően – az apoptózis indukció meghatározásával párhuzamosan –, vizsgáltuk a p-4EBP1 expresszió változását ELISA-val. Két esetben (jó prognózisú betegek mintái) a 24 órás rapamycin kezelést követően a p-4EBP1 expresszió lecsökkent, egyidejűleg az apoptózis emelkedett. Két másik esetben (rossz prognózisú – egy primer ALL-es, és egy relabáló eset) a rapamycin kezelést követően a p4EBP1 expresszió nem csökkent, hanem növekedett, és apoptózis szintjének emelkedése sem volt szignifikáns (18. ábra).



16. ábra. p-S6 fehérje expressziójának változása rapamycin- és kombinációs kezeléseket követően humán ALL és lymphoma sejtekben (Western blot). Az *in vitro* 48 órás rapamycin kezelés csökkentette a p-S6 fehérje mennyiségét leukémia (CEM) és lymphoma (BHD1) sejtvonalba. (ko – kezeletlen kontroll; rap – rapamycin, 50 ng/ml; dox – doxorubicin, 200 nM; cyt-ara – cytosin-arabinoside, 10 ng/ml; mtx – methotrexate, 50nM).



17. ábra. Rictor, Raptor expressziója és a rapamycin kezelés hatása az mTOR aktivitásra (p-S6) humán ALL sejtvonalakban (immuncitokémia). Rictor és Raptor fehérjék expressziójának, valamint a 24 órás rapamycin (50 ng/ml) kezelés p-S6 expresszióra kifejtett hatásának vizsgálata leukémia sejtvonalakban – immuncitokémia. (ko – kezeletlen kontroll; rap – rapamycin; immuncitokémia; DAB festés – barna reakció, 400x).



18. ábra. Rapamycin érzékenység különbségei gyermekkori ALL sejtekben *in vitro* (ELISA, apoptózis mérés áramlási citometriával). p-4EBP1 expresszió (ELISA OD értékek) és az apoptotikus sejtek %-a kezeletlen és rapamycin (24 óra, 50 ng/ml) kezelt izolált humán ALL sejtekben (A vizsgálatokhoz használt leukémia sejtek az első 3 esetben primer ALL-es betegekből, az utolsó esetben relapszusos mintából származtak; OD – optikai denzitás; ko – kezeletlen kontroll; rap – rapamycin; * $p < 0,05$).

4.2. MikroRNS expresszió vizsgálatok

4.2.1. MiRNS expresszió vizsgálatok humán leukémia sejtvonalakban

Vizsgálatainkban kontrollként a BHD1 (DLBCL: diffúz, nagy B-sejtes lymphoma) sejtvonalat használtuk, melyben – a DLBCL-ekben leírt irodalmi adatoknak megfelelően (223) – magas miR 16, miR 21, miR 24, miR 29b, miR 128b, miR 142-3p és miR 155, valamint alacsony miR 223 expressziót mutattunk ki.

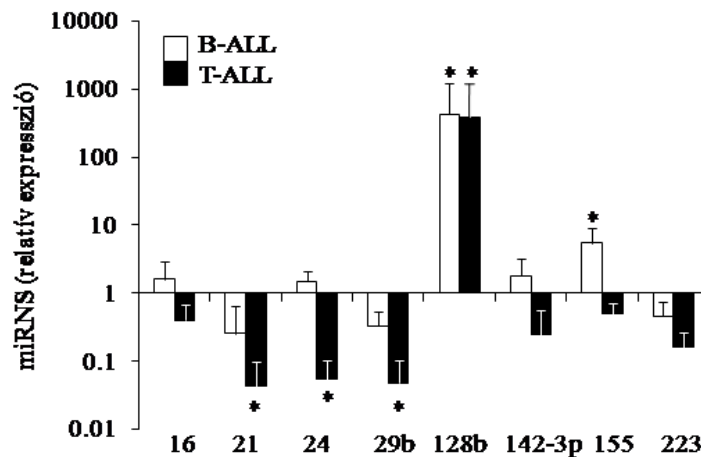
Meghatároztuk izolált PMNC sejtek, B- és T-sejtek, valamint párhuzamosan perifériás vérből és csontvelőből (2 éves követés után nem leukémiás minták) izolált MNC sejtek miRNS (miR 16, 21, 24, 29b, 128b, 142-3p, 155, 223) expresszióját real time PCR-rel. A minták miRNS expressziója nem tért el szignifikánsan (15. táblázat), így vizsgálatainkban a leukémia sejtek miR expresszióját humán perifériás mononukleáris sejtek expressziójához viszonyítottuk.

Promyelocytás leukémia sejtvonalban (HL60) hét vizsgált miRNS alacsonyan expresszáldott, még a miR 128b esetében is csak mérsékelt expresszió fokozódást tudtunk kimutatni (2.9x). A humán ALL sejtvonalakat a miR 128b szignifikáns overexpressziója jellemezte, a CEM, Jurkat és Nalm6 sejtvonalak esetében a miR 128b igen jelentősen fokozott expresszióját (>500x) detektáltuk. Az „oncomiR”-ként jól ismert miR 21 és miR 155 közül a miR 21 egyik vizsgált leukémia sejtvonalban sem mutatott expresszió fokozódást, a miR 155 jelentősebb expressziója csak a CEM (T-ALL) sejtvonalban tudtuk kimutatni. A T-ALL-es sejtvonalakat a miR 16 overexpressziója jellemezte, míg a B-ALL sejtvonalakban a miR 223 alacsony, csökkent expressziója volt jellemző (15. táblázat).

Gyermekkori ALL-es betegek (n=24) diagnosztikus, kezeletlen mintáinak miRNS expressziójában, B- és T-ALL-ben eltéréseket figyeltünk meg. Mindkét sejtípusban a miR 29b [0.19x (0.001-1.05)], valamint – a sejtvonalakhoz hasonlóan – a miR 21 [0.15x (0.003-0.73)] és miR 223 [0.31x (0.003-1.56)] alacsony expresszióját detektáltuk, míg a miR 128b minden esetben szignifikánsan fokozott expressziót mutatott [409x (17.3-1048)]. A miR 155 mérsékelt emelkedett expressziója csak a B-ALL-es betegek sejtjeit jellemezte [5.5x (0.54-11.7)] (19. ábra).

15. táblázat. miRNS-ek expressziója izolált normál lymphoid sejtekben, perifériás vér-és csontvelői mintákban és leukémia sejtvonalakban (real-time PCR). Az adott miRNS (miR 16, 21, 24, 29b, 128b, 142-3p, 155, 223) expressziójának mértékét izolált PMNC sejtek expressziójához viszonyítva (1) adtuk meg izolált normál B- és T-sejtekben, nem leukémiás (NL), és gyermekkori ALL-es beteg (ALL) perifériás vér (v) és csontvelői (csv) mononukleáris sejteiben, valamint leukémia sejtvonalakban. (* p<0,05).

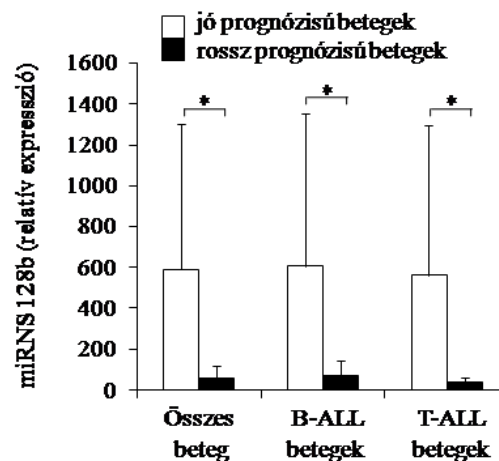
Vizsgált miRNS	Normál lymphoid sejtek			NL	ALL	Kontroll	Leukémia sejtvonalak				
	PMNC	B-sejt	T-sejt	v/csv	v/csv	BHD1 (DLBCL)	HL60 (PML)	CEM (T-ALL)	Jurkat (T-ALL)	Mn60 (B-ALL)	Nalm6 (B-ALL)
16	1	1.5	0.6	1.2/1	0.9/0.8	36*	0.9	7*	17*	1.9	2.8
21	1	1.4	1.1	0.4/0.7	0.06*/0.03*	51*	0.3	0.3	0.5	0.09*	0.5
24	1	0.5	0.9	0.8/0.4	0.2/0.1	12*	1.2	0.6	1.2	0.11*	0.4
29b	1	1.2	1.4	0.2/0.4	0.1/0.04*	131*	1.9	1.9	15*	0.98	0.38
128b	1	1.9	2.3	1.1/1.3	107*/130*	106*	2.9	677*	1286*	21.3*	1814*
142-3p	1	1.1	1.6	0.5/0.7	0.4/0.3	48*	1.5	3.9	19.1*	0.9	2.4
155	1	1.3	1.8	1.8/1.6	2.1/3.5*	945*	0.8	21.5*	0.003*	0.9	0.009*
223	1	1.2	1.9	2.4/2.2	0.1/0.03*	0.4	0.01*	2.2	0.8	0.1	0.02*



19. ábra. miRNS-ek relatív expressziója gyermekkori ALL-es betegek diagnosztikus csontvelői mintáiban (real-time PCR). miR-ek relatív expressziója B- és T-ALL-es betegek (n=15, illetve 9) 0. napi csontvelői mintáiban normál PMNC-hez viszonyítva, melyek expresszióját 1-nek tekintettük az összehasonlításban. (* p<0,05).

4.2.2. Gyermekkori ALL-es betegek miR 128b expressziójának és klinikai adatainak, prognosztikai tényezőinek vizsgálata

A vizsgált ALL-es betegek csontvelői MNC sejtjeiben szignifikánsan magasabb miR 128b expressziót mutattunk ki. Vizsgáltuk a jó- és rossz prognózisú betegcsoport miR 128b expressziójának különbségeit. A jó prognózisú betegek 0. napi mintáinak csontvelői sejtjeiben (mind B-, mind T-ALL-ben) szignifikánsan magasabb miR 128b expressziót detektáltunk a rossz prognózisú betegekhez viszonyítva (20. ábra). A betegek prognózisát és miR 128b expresszióját figyelembe véve, ROC analízissel meghatároztunk (szenzitivitás: 75%, specificitás: 87.5%) egy relatív expressziós értéket (80-szoros relatív expresszió normál PMNC sejtekhez viszonyítva), mely alapján a betegeket magasabb ($80x<$, $n=16$) és alacsonyabb ($80x>$, $n=8$) miR 128b expresszióval rendelkező betegcsoportba soroltuk. A felosztás alapján tovább elemeztük a betegek klinikai adatainak (életkor, nem, sejtípus, 8. napi szteroid válasz, fehérvérsejtszám, kariotípus, prognózis, jelenlegi állapot) és a magasabb vagy alacsonyabb miR128b expresszióknak az összefüggését. Szignifikáns korrelációt mutattunk ki az alacsonyabb ($80x>$) miR 128b expresszió és a betegek rossz prognózisa, illetve rossz 8. napi szteroid válasza között. Kimutattuk továbbá, hogy a betegek relapszus mentes túlélése szignifikánsan összefügg a magasabb miR 128b expresszióval (16. táblázat).



20. ábra. miR 128b expresszió jó- és rossz prognózisú ALL-es betegek mintáiban (real-time PCR). Jó- ($n=16$) és rossz ($n=8$) prognózisú B- és T-ALL-es betegek csontvelői mintáinak relatív miR 128b expressziója. (A prognózis besorolást lásd a módszerek fejezetnél; az összehasonlításban a normál lymphoid sejtek expressziójához viszonyítottunk; * $p<0,05$).

16. táblázat. Gyermekkori akut lymphoid leukémiás betegek (n=24) klinikai adatainak és miR 128b expressziójának vizsgálata. § – a betegek relatív miR128b expresszió (magas>80x>alacsony) alapján történő besorolása; # – életkor a diagnózis megállapításakor; ** – a hyperdiploid csoportba soroltunk két beteget, akiknél ETV6/RUNX1 fúziót mutattak ki; *** – prognózis meghatározása lásd módszerek; & – a betegek állapota a vizsgálat befejezéséig. (SR – alacsony, IR – közepes, HR – magas rizikójú kezelési ág; TX – transzplantáció; TRM – transzplantációhoz kapcsolódó halálozás; ϕ – Fisher exakt és χ^2 tesztek; π - szignifikáns korreláció miR 128b expresszióval).

	összes eset	%	alacsony miR 128b exp.§	%	magas miR 128b exp.§	%	p
ALL betegek száma (%)	24	100	8	33	16	67	
Életkor #							
6 éves vagy >	17	71	5	47	12	53	0,647 ϕ
6 éves <	7	29	3	43	4	57	
Nem							
nő	6	25	1	17	5	83	0,621 ϕ
férfi	18	75	7	39	11	61	
Immunfenotípus							
pre-T	9	37.5	3	33.3	6	66.7	1 ϕ
pre-B	15	62.5	5	33.3	10	66.7	
Szteroid válasz, π							
jó válasz a 8. napon	17	75	3	88	14	12	0.001 χ
rossz válasz a 8. napon	7	25	6	33	1	67	
Fehérvérsejtszám							
20 G/l vagy >	9	37.2	3	33.3	6	66.7	1 ϕ
20 G/l <	15	62.5	5	33.3	10	66.7	
Kariotípus **							
normál	10	41.7	3	30	7	70	
hyperdiploid	10	41.7	2	20	8	80	0.137 χ
rossz prognózisra utaló genetikai eltérések	4	16.6	3	75	1	25	
Prognózis ***, π							
jó	16	67	2	12.5	14	87.5	0.002 ϕ
rossz	8	33	6	75	2	25	
Jelenlegi állapot &, π							
betegség mentes remisszó SR	6	25	1	16.7	5	83.3	
IR	10	41.7	1	10	9	90	
HR	2	8.3	2	100	0	0	0.011 χ
remisszió (relapszust követően vagy TX)	2 - 1 IR; 1HR	8.3	1	50	1	50	
elhalálozás (progressziót követően vagy TRM)	4 - 1 IR; 3HR	16.7	3	75	1	25	

4.2.3. *Perifériás vérből és csontvelőből izolált MNC sejtek miRNS expresszió változásának vizsgálata a betegek követéses mintáiban*

Gyermekkori ALL-es betegek (n=24) diagnosztikus és a kemoterápiás kezelés során gyűjtött mintáiban – a kezelés hatására csökkenő lymphoblaszt arálynak megfelelően (0-10% csontvelői mononukleáris sejt) – a vizsgált miRNS-ek expressziója is megváltozott. Az alacsonyan expresszált miR-ek expressziójának emelkedését, míg az overexpresszált miRNS-ek expresszió csökkenését figyeltük meg a kezelés 33. napján, illetve a protokoll M előtti időpontban (17. táblázat).

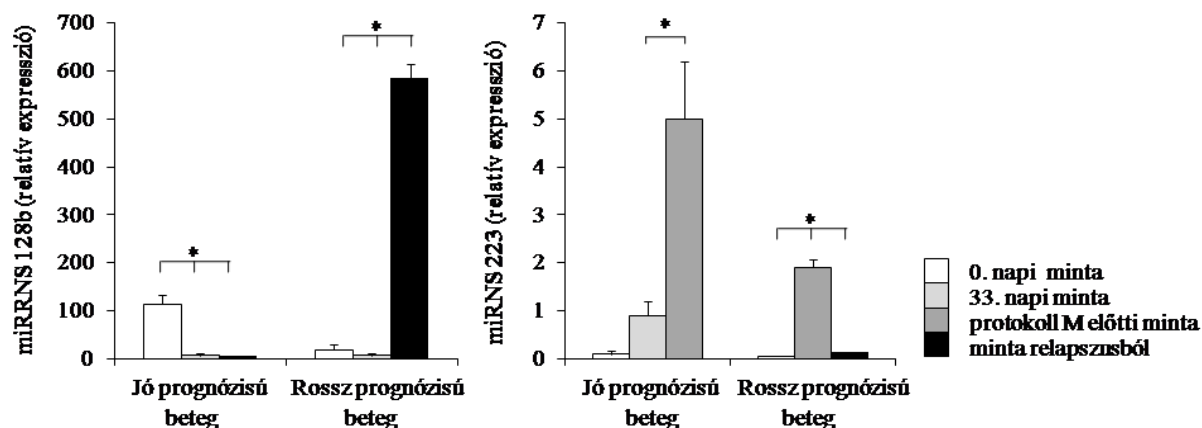
17. táblázat. miR-ek expressziójának változása a kezelés protokoll M előtti időpontjáig a kezelés előtti minták expressziójához viszonyítva. (↑/↓: <2x, ↑↑/↓↓: 3-100x, ↑↑↑/↓↓↓: 100-1000x változás a kiindulási expresszió mértékéhez képest).

Vizsgált miRNS	miRNS expresszió változás kemoterápia alatt	
	T-ALL	B-ALL
16	↑	↓
21	↑	↓
24	↑	↓
29b	↑	↓
128b	↓↓↓	↓↓↓
142-3p	↑	↓
155	↑	↓↓
223	↑↑	↑↑

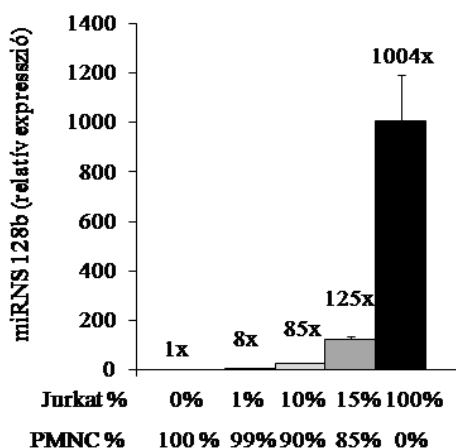
A relabáló betegek követéses (15. napi, 33. napi és protokoll M előtt, illetve relapszus esetén) mintáinak miR 128b és miR 223 expresszió változását is vizsgáltuk. A jó- és a rossz prognózisú betegek csontvelői sejteinek miR 128b expressziója szignifikánsan lecsökkent, a miR 223 expressziója szignifikáns emelkedést mutatott a protokoll M előtti időpontban a kezelés előtti mintákhoz viszonyítva. Jó prognózisú betegekben – ahol a betegség nem tért vissza – a miR-ek expressziója a két éves követési periódusban nem mutatott további változást, míg a rossz prognózisú, relabáló beteg csontvelői mintáinak miR 128b és miR 223 expressziója relapszusban – a csontvelői minták növekvő arányú leukémia sejteinek megfelelően – megváltozott, emelkedett (miR 128b), illetve csökkent (miR 223) (21. ábra).

Megfigyeltük, hogy relapszusban a csontvelői minták miR 128b expressziója a kezdeti magas miRNS expressziós érték fölé emelkedik. Megvizsgáltuk, hogy normál perifériás

mononukleáris sejtek (miR 128b gyakorlatilag nem expresszáló – PMNC) és humán T-ALL sejtek (miR 128b fokozottan expresszáló – Jurkat leukémia sejtvonala) különböző arányú keverékében milyen mértékű a miR 128b expressziója, a szignifikáns emelkedés mikor válik kimutathatóvá. Már humán ALL sejtek 1%-át tartalmazó sejtkeverékben szignifikánsan (8x) emelkedett miR 128b expressziót mutattunk ki. (22. ábra).



21. ábra. miR 128b és 223 relatív expressziójának változása gyermekkori ALL-es betegek követéses mintáiban a kemoterápia alatt (real-time PCR). A miR 128b és miR 223 expressziója reprezentatív jó- és rossz prognózisú betegek csontvelői mintáiban. (A miR-ek expresszióját normál lymphoid sejtekhez viszonyítottuk, melyek expresszióját 1-nek tekintettük az összehasonlításban; * $p < 0,05$).



22. ábra. A miR 128b relatív expressziójának változása humán ALL sejtek növekvő koncentrációjú keverékében (real-time PCR). PMNC és humán T-ALL sejtek (Jurkat sejtvonala, 1%, 10%, 15%, 100%) növekvő koncentrációjának megfelelően a miR 128b relatív expressziója fokozódott (8x, 85x, 125x, 1004x), a 100% PMNC sejtek expresszióját tekintettük 1-nek ebben az összehasonlításban.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. mTOR aktivitás vizsgálatok

Több munkacsoport beszámolt már humán ALL sejtvonalak- és izolált primer ALL sejtek magas mTOR aktivitásáról és a rapamycin *in vitro* apoptózis indukáló hatásáról (50, 67, 224). Gyermekkori ALL-ben az mTOR jelátviteli útvonal aktivitásának kvantitatív vizsgálatával kapcsolatban azonban még nem állnak rendelkezésre irodalmi adatok. Emellett az mTOR aktivitás, illetve az mTOR függő foszfo-fehérjék mennyiségének ELISA módszerrel történő meghatározásáról sincsenek adatok humán leukémia sejtekben. Mindössze egy közlemény számol be a p-p70S6K ELISA vizsgálattal meghatározott eredményeiről everolimussal kezelt vesetranszplantált betegek (n=15) perifériás mononukleáris sejtjeiben, melyet az mTOR gátlás meghatározására használtak (225).

Munkánk során meghatároztuk az mTOR jelátviteli útvonal aktivitását gyermekkori ALL-es betegek csontvelői mintáiban ELISA módszerrel. Az mTOR függő foszfofehérjék (p-4EBP1 és p-S6) expresszióját összehasonlítottuk normál lymphoid sejtekben, valamint izolált lymphoblastokban. Többféle ELISA kittel dolgoztunk, melyek közül a p-4EBP1 és p-S6 kit hatékonyan működött, és a kettő közül a betegek mintáinak feldolgozása, ismétléses vizsgálata során a p-4EBP1 kitet találtuk a legmegbízhatóbbnak. A p-4EBP1 fehérje mennyiségének mérése azért is előnyösebb, mert a 4EBP1 az mTOR direkt célfehérjéje, mennyiségének meghatározásával közvetlenül tudunk következtetni az mTOR aktivitásra. A p-S6 fehérje nemcsak az mTOR függő – p70S6 kináz – hanem az mTOR-tól független jelátviteli útvonalakon – PDK1, MAPK és SAPK – keresztül is tud foszforilálódni, és aktiválódni (108).

Eredményeink alapján a humán ALL- és lymphoma sejtvonalakat, valamint az ALL-es betegek 0. napi csontvelői mintáinak leukémia sejtjeit – fokozott p-4EBP1 expresszió által jelzett – magas mTOR aktivitás jellemzi. A kemoterápiás kezelés hatására az mTOR foszforilált célfehérjéinek – p-4EBP1 és p-S6 – expressziója jól reagáló ALL-es betegek csontvelői mintáiban gyakorlatilag a normál lymphoid sejtek szintjére csökkent. Relabáló betegek csontvelői mintáiban, a relapszus diagnosztizálása idején az mTOR aktivitás fokozódott, és az mTOR aktivitást jelző p-4EBP1 értéke a kezdeti, 0. napi minták expresszióját meghaladta. Különösen érdekes a rossz prognózisú betegek diagnosztikus csontvelői mintáinak szignifikánsan magasabb mTOR aktivitása a jó prognózis betegekhez viszonyítva.

ROC analízis segítségével meghatároztunk egy cutoff értéket ($OD=1.1$) a p-4EBP1 ELISA vizsgálatra, mely alapján a betegeket két csoportba tudtuk sorolni: az egyik csoportba tartoztak a magas ($OD>1.1$) p-4EBP1 értékkel rendelkező, azaz magas mTOR aktivitású betegek, míg a másik csoportba tartozó betegek mTOR aktivitása alacsony volt. Az általunk meghatározott cutoff érték – nagyobb esetszámú vizsgálatban történő validálást követően – a jövőben az ALL klinikailag is hasznos, egyszerűen meghatározható prognosztikai markere lehetne.

Az ELISA hátránya viszonylag magas sejt- és időigénye. Az mTOR függő foszfofehérjék expressziójának kimutatása a betegek diagnózisának megállapításakor, illetve a betegek utánkövetése során az ELISA-nál sokkal egyszerűbben alkalmazható, hatékonyabb módszerrel, áramlási citometria révén valósulhatna meg. Fontos megfigyelés, hogy a p-4EBP1 expressziója által meghatározott mTOR aktivitás nem tér el szignifikánsan ugyanazon beteg csontvelői és perifériás vér mononukleáris sejtjeiben. Magas kockázatú betegekben, akiknél a relapszus kockázata nagyobb, és ezáltal szorosabb követést igényelnek, perifériás vér mintákban is követhető lenne az mTOR aktivitás. Számos vizsgálat irányul a betegség recidívájának korai kimutatására, azonban ma még nincs olyan hatékony módszer, mely a recidívát korán képes lenne jelezni, és nem lenne olyan megterhelő a betegek számára, mint a csontvelő vizsgálat.

Több munkacsoport kezdte el vizsgálni az mTOR gátló (MTI) kezelés hatását gyermekkori ALL-ben (50, 69, 143). *In vitro* eredményeink megerősítik az mTOR gátlók lehetséges apoptózis indukáló hatását gyermekkori izolált ALL sejtjeiben. Számos klinikai vizsgálat van folyamatban az önmagában alkalmazott mTOR gátlók hatékonyságával kapcsolatban elsősorban relabáló hematológiai betegek kezelésében (pl. everolimus relabáló/refrakter NHL – fázis I; sirolimus relabáló/refrakter ALL/NHL – fázis I) (224). Gyermekkori ALL-ben eddig még ismert ilyen klinikai vizsgálat eredménye. Rheingold és mts-ai egy absztraktban számoltak be egy fázis I vizsgálatban relabáló/refrakter gyermekkori ALL-es betegeknél alkalmazott sirolimus jó tolerálhatóságáról. Egy másik publikációban gyermekkori ALL-ben allogén hematopoetikus őssejt átültetést követően a graft versus host betegség megelőzésében használt sirolimus (fázis I/II vizsgálat) biztonságos és hatékony alkalmazhatóságát írták le (146). Fouladi és mts-ai az everolimus (fázis I vizsgálat) maximálisan tolerálható dózisáról, dózis függő toxicitásáról, valamint farmakokinetikai és farmakogenetikai tulajdonságairól számolnak be refrakter és/vagy relabáló szolid tumoros gyermekeknél (66).

Napjainkban az önmagában alkalmazott mTOR gátlók hatásai mellett több vizsgálat indult el, mely az mTOR gátlók és különböző konvencionálisan alkalmazott kemoterápiás szerek (dexamethasone, doxorubicin, etoposide, asparaginase) kombinációjának hatását vizsgálja (65, 69, 226, 227). Irodalmi adatok szerint az mTOR gátlók kombinációs kezelése sokkal hatékonyabban indukálhatják apoptózist. Saját vizsgálati eredményeink is alátámasztják ezt, különösen a methyl-prednisolonnal való kombinációban, amit nemcsak sejtvonalakban, hanem gyermekekből származó ALL sejtekben is igazoltunk. A szteroid kezeléssel szemben kialakuló rezisztencia lényegesen rontja a betegek gyógyulási esélyeit. A sirolimus a szteroid rezisztens ALL-es sejtekben a szteroid érzékenységet képes visszaállítani, melynek hátterében valószínűleg a proapoptotikus – caspase-3, Bax, Bim – fehérjék expressziójának fokozása, illetve az antiapoptotikus MCL1 fehérje expressziójának gátlása állhat (69, 228, 229). Relapsusból származó izolált gyermekkori ALL-es beteg izolált leukémia sejtjeinek rövidtávú kezelése során igazoltuk, hogy a rapamycin szignifikánsan fokozza a methyl-prednisolon apoptózis indukáló hatását. A kombinációs kezelésekkel kapcsolatban számos klinikai vizsgálat van folyamatban, elsősorban relabáló hematológiai betegeknél (AML, magas rizikójú lymphomák) (118, 136, 224). Fontos megjegyezni, hogy a rapamycin és különböző citosztatikumok kombinációja *in vivo* hatásosabb lehet, mint *in vitro* a mikro környezet módosító hatása miatt.

Eredményeink fontos kérdéseket vetnek fel:

1. mi alapján tudjuk kiválasztani azokat a betegeket, akinél az mTOR gátló kezelés valóban hatékony lehet?
2. a kemoterápia rezisztencia, az alapbetegség relapszusa vagy a kezelés előtti igen magas alap mTOR aktivitás önmagában indokolhatná-e az mTOR gátló kezelést?

Eredményeink szerint a diagnóziskor meghatározott p-4EBP1 értéke alapján a rossz prognózisú betegek azonosíthatóak lehetnek, azonban további markerek szükségesek a betegcsoporton belül adott beteg esetében a rapamycin kezelés potenciális hatékonyságának előrejelzésére. Az TORC1 komplex magas aktivitása ugyanis nem jelenti szükségszerűen, hogy a beteg reagálni fog az mTOR gátló kezelésre (230). Eredményeink szerint az *in vitro* rapamycin kezelés nem minden esetben eredményezi az mTOR aktivitás csökkenését ALL-es betegek izolált leukémia sejtjeiben.

Ennek hátterében felmerülhet az mTORC1 gátlókkal (rapamycin és rapalog) szemben kialakuló rezisztencia szerepe, melynek patomechanizmusa még nem teljesen ismert. Feltételezhetően az mTORC2 komplex fokozott aktivitása, valamint az mTORC1 és mTORC2 komplexek arányának eltolódása játszhat szerepet kialakulásában. Az mTORC2 komplex fokozott expresszióját néhány daganattípusban (231, 232), illetve primer AML sejtekben kimutatták (233), amit nekünk is sikerült igazolnunk vizsgálatainkban diffúz, nagy B-sejtes lymphoma (DLBCL) rossz prognózissal összefüggésbe hozható aktivált B-sejtes típusában (230). Az újabb generációs mTORC1/mTORC2 komplex, valamint kettős gátlók – mTOR két komplexe mellett a PI3K vagy AKT gátlók – megoldást jelenthetnek az mTOR jelátviteli útvonal gátlására a rapamycin rezisztens esetekben. Biztatóak az eredmények humán leukémia sejtekben végzett klinikai vizsgálatokban (127, 229, 234).

Eredményeink alapján gyermekkori ALL-es betegek leukémia sejtjeit magas mTOR aktivitás jellemzi. Az aktivitás mértéke követhető a p-4EBP1 ELISA vizsgálat segítségével, mely hasznos módszerként szolgálhat a kezelés korai fázisában a rossz prognózisú betegek kiválasztásában. A magas mTOR aktivitással jellemezhető betegek, szorosabb követést igényelnek a relapszus megjelenésének szignifikánsan magasabb rizikója miatt. Az mTOR aktivitásának – az mTOR gátló- és kemoterápiás szerek kombinációjának alkalmazása során hasznosítható – hatását az ALL sejtek túlélésére *in vitro* vizsgálatainkban igazoltuk.

5.2. MiRNS expresszió vizsgálatok

Különböző daganatok esetében fokozottan expresszálódó oncomiR-ek közül a miR 21 és a miR 155 expresszióját vizsgáltuk. ALL esetében expressziójukkal kapcsolatban az irodalmi adatok nem egységesek (148, 235, 236). Saját vizsgálatainkban azokat az eredményeket tudtuk megerősíteni, melyek szerint a miR 21 fokozott expressziója nem jellemző ALL-ben (235). A miR 155 szabályozó funkcióinak fontos szerepét daganatbiológiai jelentőségén túl több közlemény is hangsúlyozza a T- és elsősorban a B-sejtek differenciációjában és funkcióiban (izotípusváltás és a memória sejtek kialakulása). Irodalmi adatok szerint overexpressziója B-ALL-ben nem jellemző, csak T-ALL-ben figyelhető meg mérsékelten emelkedett expressziója, de ezzel kapcsolatban is ellentmondásosak az adatok (178, 237). Saját eredményeinkben az egyik T-ALL sejtvonalon a miR 155 emelkedett expressziót mutatott, míg primer leukémia sejtek esetében csak B-ALL-ekben figyeltük meg enyhén emelkedett expresszióját, ami a miR 155 lehetséges szerepét támasztja alá B-lymphoid sejtek differenciációjának szabályozásában, B-ALL sejtekben annak zavarára

utalhat. A miR 24 szerepet játszhat a proliferáció (sejtciklus G2/M-nél) negatív szabályozásában. Expressziójának csökkenését korábban csak bizonyos B-ALL-ek esetében figyelték meg (216). Saját méréseink során expressziójának egyértelmű csökkenését tapasztaltuk T-ALL-ben, feltételezhetően funkciójának kiesése T-ALL sejtek proliferációjában is szerepet játszhat. Más munkacsoportok kimutatták a miR 16 fokozott expressziója és a rosszabb prognózis közötti összefüggést (177). Eredményeinkkel ezt megerősíteni nem tudtuk, mert az általunk vizsgált esetekben a miR 16 expressziójában szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk.

ALL relapszusban megfigyelhető miRNS expresszió változások vizsgálatát több munkacsoport is megkezdte (179, 180). Egyik közlemény szerint az alacsony miR 223 expresszió az ALL relapszusának lehetséges előjelzője lehet (179). Ennek magyarázata egyértelmű, ha az általunk kapott miR 223 expresszió eredményeket vesszük figyelembe, hiszen a miR 223 expresszió valamennyi primer ALL sejt esetében szinte kimutathatatlan. Ennek szintje követéses vizsgálataink alapján a kezelés hatására elért csontvelői remisszióban rendeződik. Mi is tapasztaltuk, hogy expressziójának csökkenése a betegség relapszusa során ismét kimutatható.

A legérdekesebb eredményünk az ALL-es sejtekben kimutatott igen nagymértékű miR 128b overexpresszió. Ennek mennyisége, hasonlóan a miR 223-hoz a kezelés során eléri a normál mononukleáris sejtekben levő szintet, de relapszuskor a diagnóziskor mért expresszió szintjét is meghaladja (vizsgálataink szerint 1% leukémiás sejt megjelenése a periférián már szignifikáns miR 128b expresszió változással jellemezhető.) A miR 128b-vel kapcsolatos adatainkat alátámasztják korábbi vizsgálatok (169, 178) eredményei. Azt is kimutattuk azonban, hogy összefüggés figyelhető meg a betegek jó prognózisa és a miR 128b overexpressziójának mértéke között. Minél magasabb az expresszió fokozódás, annál jobb a várható prognózis. Korábbi irodalmi adatok már beszámolnak a miR 128b expressziójának emelkedéséről, de az ALL-ek prognózisával mutatott összefüggését eddig még nem vizsgálták és nem mutatták ki. Különösen érdekes ez az eredményünk annak az irodalmi adatnak a tükrében, amely szerint MLL-AF4 transzlokációval rendelkező ALL sejtvonalonban a miR 128b expresszió fokozásával növelhető volt a sejtek glukokortikoid érzékenysége (182). Utóbbi és saját adataink, amely szerint az ALL sejtekben megfigyelt, jellemzően magas miR 128b összefügg a jó szteroid válasszal, korrelál a jó prognózissal, egyértelműen felvetik a miR 128b és a leukémia sejtek szteroid érzékenységeinek kapcsolatát.

Különböző miRNS-ek expresszió változásával kapcsolatos vizsgálataink eredményei segítségével sikerült olyan megváltozott miR expressziós szinteket kimutatnunk, amelyek az ALL-es betegek prognózisának, szteroid válaszában előrejelzését és bizonyos esetben akár a betegek remissziós státuszának szorosabb utánkövetését is segíthetik.

5.3. MiRNS expresszió és mTOR aktivitás vizsgálatok eredményeinek érdekes, további vizsgálatokat igénylő összefüggése

A vizsgálatainkba bevont miRNS-ek közül három esetében (miR 21, miR 223, miR 128b) irodalmi adatok alapján felmerülhet, hogy szerepet játszhatnak az mTOR útvonal, és a jelátviteli útvonal aktivitását szabályozó fehérjék expressziójának szabályozásában. Az mTOR jelátviteli útvonallal kapcsolatba hozható miR-ekkel egy 2013-as közlemény foglalkozik (238).

Vizsgálataink szerint mind az mTOR aktivitás mértéke, mind a miR 223 és miR 128b expresszió szintek összefüggést mutattak a gyermekkori ALL-es betegek prognózisával. Igazoltuk az ALL-es minták magas mTOR aktivitását, a miR 128b szignifikánsan fokozott, és a miR 223 alacsony expresszióját. Más sejttípusokban kapott eredmények alapján feltételezhető, hogy a fokozott miR 128b expresszió a PTEN gátlása révén, míg az alacsony miR 223 expresszió az IGFR szignál aktivitásának szabályozásán keresztül járulhat hozzá a magas mTOR aktivitáshoz. Alábbi összefüggéseket támasztja alá a vizsgált leukémia sejtek esetében a jó és rossz prognózisú betegek mTOR aktivitása és miR 128b expressziója közötti fordított irányú korreláció. Statisztikailag Spearman-féle korreláció vizsgálattal szignifikáns fordított irányú összefüggést tudunk kimutatni a magasabb mTOR aktivitást jelző p-4EBP1 OD (1.1<) értékek és az alacsonyabb (80x>) miRNS 128b expresszió szintek között. Természetesen ennek a lehetséges összefüggésnek az igazolásához további vizsgálatok szükségesek.

Munkánk során kapott eredményeink megerősítik az mTOR útvonal aktivitásának és szabályozási zavarainak jelentőségét gyermekkori ALL-ben. Eredményeink szerint az mTOR aktivitás mértéke fontos prognosztikai tényező lehet. A konvencionális terápiára rezisztens, relabáló betegek esetében, adataink alapján megfontolható mTOR gátló kezelés alkalmazása. Ilyen esetekben azonban az mTOR aktivitás, és a potenciális mTOR gátló kiválasztásához az aktivitásért felelős komplex(ek) (mTORC1, mTORC2) meghatározása is szükséges.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

I. *Jellemeztük az mTOR jelátviteli útvonal aktivitását és annak összefüggését a betegek prognózisával gyermekkori ALL sejtekben*

- Igazoltuk többféle módszerrel a humán ALL sejtvonalak és izolált gyermekkori ALL sejtek jellemzően magas mTOR aktivitását.
- Kimutattuk, hogy a rossz prognózisú ALL-es betegek leukémia sejtjeiben szignifikánsan magasabb az mTOR aktivitás, mint a jó prognózisú betegekében. Kimutattuk, hogy az ALL sejtek mTOR aktivitásának mértéke összefüggést mutat (szignifikáns korreláció) a rossz szteroid válasszal, és a nem hyperdiploid kariotípus jelenlétével.
 - Kimutattuk, hogy egy bizonyos mértéknél magasabb mTOR aktivitás független prognosztikai tényezőként növeli a rossz prognózis (rossz terápiás válasz és/vagy relapszus előfordulásának) rizikóját gyermekkori ALL-ben
 - Igazoltuk, hogy az mTOR aktivitás változása követi a betegek csontvelői mintáinak – hatékony kezelés hatására csökkenő, illetve relapszusban emelkedő – leukémia sejt arányát
 - Vizsgálatainkban igazoltuk, hogy perifériás vér mintákban ELISA-val vagy áramlási citometriával kimutatható az mTOR aktivitás, mely korrelál a csontvelői minták eredményeivel

II. *Vizsgáltuk az mTOR aktivitás szerepét humán ALL sejtek proliferációjában és túlélésében in vitro*

- Igazoltuk az mTOR aktivitást gátló rapamycin kezelés proliferációgátló, apoptózist indukáló hatásait humán ALL sejtvonalakban *in vitro*
- *In vitro* vizsgálatainkban igazoltuk, hogy az mTOR gátló kezelés képes fokozni a kemoterápiás szerek hatását humán ALL sejtekben

III. *Vizsgáltuk humán ALL sejtekben bizonyos miRNS-ek expresszióját és annak összefüggését a betegek prognózisával*

- Kimutattunk, hogy a humán daganatokban fokozottan expresszáldó „oncomiR” 21 és 155 overexpresszió a humán ALL sejteket nem jellemzi, míg a miR 128b overexpresszió, illetve miR 223 alacsony expressziója általánosan jellemző humán ALL sejtvonalakra és gyermekkori ALL sejtekre
- Igazoltuk, hogy a különböző ALL-es betegek sejtjeiben a miR 128b expressziójának mértéke összefüggést mutat a prognózissal, a szteroid válasszal és a túlélési adatokkal; szignifikánsan magasabb expressziója a jó prognózisú, jó szteroid választ mutató és hosszú relapszus mentes túlélésű ALL-es betegekben fordul elő, míg a rossz prognózisú betegek leukémia sejtjeire alacsonyabb miR 128b expresszió jellemző
- Igazoltuk, hogy a miR 128b és miR 223 expressziója – leukémia sejt specificitásuk révén – hatékonyan követi a csontvelői minták leukémia sejt arányának változását

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A modern terápiás lehetőségek gyermekkori ALL túlélési eredményeinek drámai javulását eredményezték. Ennek ellenére a betegek 20-25%-nak eredményes kezelése napjainkban is nehézségekbe ütközik. A kezelés fejlesztéséhez hozzájárulhatnak a célzott terápiás lehetőségek, melyek egyik potenciális célpontja lehet az mTOR jelátviteli út vonal. A fokozott mTOR aktivitás szerepe humán daganatok, köpenysejtes lymphomák kialakulásában, progressziójában ismert. Terápiás érzékenységgel összefüggő mikroRNS expressziós változásokról irodalmi adatok gyermekkori ALL-ben kevésbé ismertek.

Gyermekkori ALL-ben az mTOR aktivitás szerepét, és a betegek klinikai adataival való összefüggését vizsgáltuk. Igazoltuk, hogy a humán ALL sejteket magas mTOR aktivitás jellemzi és a magasabb mTOR aktivitás szignifikáns összefüggést mutat a rosszabb prognózissal. Statisztikai vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a magas mTOR aktivitás független prognosztikai tényező lehet a betegek prognózisának megítélésében. A betegek követéses csontvelői mintáiban igazolni tudtuk az mTOR aktivitás – hatékony kezelés hatására – csökkenő, illetve – relapszusban – emelkedő mértékét. Humán ALL sejtvonalakban és izolált gyermekkori ALL sejtekben az mTOR gátló rapamycin proliferációgátló és apoptózis indukáló hatását bizonyítottuk. A rapamycin kombinációban adva a kemoterápiás szerek apoptotikus hatását is fokozta.

MiRNS expressziós vizsgálatainkban humán ALL-re specifikus, fokozottan (miR 128b)-, és alacsonyán (miR 223) expresszálódó miR-eket tudtunk azonosítani. A magasabb miR 128b expresszió szignifikáns összefüggést mutatott a jó prognózissal. A miR 128b és miR 223 expresszió kimutatott változásai követték a kemoterápiás kezelés hatására csökkenő leukémia sejtek arányát csontvelői mintákban.

Munkánk során kapott eredményeink megerősítik az mTOR út vonal aktivitásának és szabályozási zavarainak jelentőségét gyermekkori ALL-ben. Az mTOR aktivitás mértéke prognosztikai tényezőként is alkalmazható lehet. Terápia rezisztens betegekben megfontolható az mTOR gátló kezelés alkalmazása. A potenciális mTOR gátló kiválasztásához azonban az mTOR aktivitás, és az aktivitásért felelős komplexek (mTORC1, mTORC2) arányának meghatározása is szükséges lehet.

8. SUMMARY

Modern treatment strategies have improved the prognosis of childhood ALL dramatically. However, treatment still fails in the case of 25-30% of the patients. Further improvement of treatment may depend on the development of targeted therapies. mTOR signal pathway could be a potential target. The role of increased mTOR activity and progression of human tumors, mantle cell lymphomas is known. The altered expression level of microRNA associated with chemotherapeutic drugs sensitivity in childhood ALL is less known.

In the present study, the role of mTOR activity and the correlation with clinical data was analysed in childhood ALL. We confirmed that human ALL cells are characterized by high mTOR activity, and the higher mTOR activity correlates significantly with poor prognosis. Statistical analysis demonstrated that the high activity of mTOR may be an independent prognostic factor in assessing the prognosis of patients. In the therapy follow-up, using bone marrow samples, we confirmed a decrease in mTOR activity as a result of effective treatment, and an increased mTOR activity at relapse. We confirmed that mTOR inhibitor rapamycin had antiproliferative and apoptotic effect in human ALL cell lines, as well as in isolated childhood ALL cells *in vitro*. We have also shown that rapamycin was able to augment the apoptotic effect of chemotherapeutic agents in combined therapies.

We identified human ALL specific, overexpressed (miR 128b) and downregulated (miR 223) miRNAs in miRNA expression measurements. The higher expression of miR 128b correlated significantly with good prognosis. The decreasing percentage of leukemia cells in bone marrow samples during chemotherapy was followed by changes in expression of miR 128b and miR 223.

Our results confirm the importance of the mTOR pathway activity and dysregulation in childhood ALL. mTOR activity level can also serve as a prognostic factor. The use of mTOR inhibitor may be considered for therapy resistant patients. However, for selecting the potential mTOR inhibitor, it may be necessary to determine the mTOR activity, and the complex(es) (mTORC1, mTORC2) responsible for the mTOR activity.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Plasschaert, S. L., Kamps, W. A., Vellenga, E., de Vries, E. G., and de Bont, E. S. (2004) Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia: a question of maturation?, *Cancer Treat Rev* 30, 37-51.
2. Torok, S., Borgulya, G., Lobmayer, P., Jakab, Z., Schuler, D., and Fekete, G. (2005) Childhood leukaemia incidence in Hungary, 1973-2002. Interpolation model for analysing the possible effects of the Chernobyl accident, *Eur J Epidemiol* 20, 899-906.
3. Kaatsch, P. (2010) Epidemiology of childhood cancer, *Cancer Treat Rev* 36, 277-285.
4. Pui, C. H., Campana, D., and Evans, W. E. (2001) Childhood acute lymphoblastic leukaemia--current status and future perspectives, *Lancet Oncol* 2, 597-607.
5. Iacobucci, I., Papayannidis, C., Lonetti, A., Ferrari, A., Baccarani, M., and Martinelli, G. (2012) Cytogenetic and molecular predictors of outcome in acute lymphocytic leukemia: recent developments, *Curr Hematol Malig Rep* 7, 133-143.
6. Pui, C. H., Mullighan, C. G., Evans, W. E., and Relling, M. V. (2012) Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there?, *Blood* 120, 1165-1174.
7. Pui, C. H., and Evans, W. E. (1998) Acute lymphoblastic leukemia, *N Engl J Med* 339, 605-615.
8. Pui, C. H., Robison, L. L., and Look, A. T. (2008) Acute lymphoblastic leukaemia, *Lancet* 371, 1030-1043.
9. Chessels, J. M., Swansbury, G. J., Reeves, B., Bailey, C. C., and Richards, S. M. (1997) Cytogenetics and prognosis in childhood lymphoblastic leukaemia: results of MRC UKALL X. Medical Research Council Working Party in Childhood Leukaemia, *Br J Haematol* 99, 93-100.
10. Pui, C. H., Carroll, W. L., Meshinchi, S., and Arceci, R. J. (2011) Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update, *J Clin Oncol* 29, 551-565.
11. Carroll, W. L., Bhojwani, D., Min, D. J., Raetz, E., Relling, M., Davies, S., Downing, J. R., Willman, C. L., and Reed, J. C. (2003) Pediatric acute lymphoblastic leukemia, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 102-131.
12. 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. (2008) Prognostic significance of

- molecular-cytogenetic abnormalities in pediatric T-ALL is not explained by immunophenotypic differences, *Leukemia* 22, 124-131.
13. Kebriaei, P., Anastasi, J., and Larson, R. A. (2002) Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification, *Best Pract Res Clin Haematol* 15, 597-621.
 14. Nachman, J. B., Heerema, N. A., Sather, H., Camitta, B., Forestier, E., Harrison, C. J., Dastugue, N., Schrappe, M., Pui, C. H., Basso, G., Silverman, L. B., and Janka-Schaub, G. E. (2007) Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia, *Blood* 110, 1112-1115.
 15. Schultz, K. R., Bowman, W. P., Aledo, A., Slayton, W. B., Sather, H., Devidas, M., Wang, C., Davies, S. M., Gaynon, P. S., Trigg, M., Rutledge, R., Burden, L., Jorstad, D., Carroll, A., Heerema, N. A., Winick, N., Borowitz, M. J., Hunger, S. P., Carroll, W. L., and Camitta, B. (2009) Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study, *J Clin Oncol* 27, 5175-5181.
 16. Salzer, W. L., Devidas, M., Carroll, W. L., Winick, N., Pullen, J., Hunger, S. P., and Camitta, B. A. (2010) Long-term results of the pediatric oncology group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1984-2001: a report from the children's oncology group, *Leukemia* 24, 355-370.
 17. Lee-Sherick, A. B., Linger, R. M., Gore, L., Keating, A. K., and Graham, D. K. (2010) Targeting paediatric acute lymphoblastic leukaemia: novel therapies currently in development, *Br J Haematol* 151, 295-311.
 18. Attarbaschi, A., Mann, G., Panzer-Grumayer, R., Rottgers, S., Steiner, M., Konig, M., Csinady, E., Dworzak, M. N., Seidel, M., Janousek, D., Moricke, A., Reichelt, C., Harbott, J., Schrappe, M., Gadner, H., and Haas, O. A. (2008) Minimal residual disease values discriminate between low and high relapse risk in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and an intrachromosomal amplification of chromosome 21: the Austrian and German acute lymphoblastic leukemia Berlin-Frankfurt-Munster (ALL-BFM) trials, *J Clin Oncol* 26, 3046-3050.
 19. Mullighan, C. G. (2012) Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia, *J Clin Invest* 122, 3407-3415.
 20. Meijerink, J. P., den Boer, M. L., and Pieters, R. (2009) New genetic abnormalities and treatment response in acute lymphoblastic leukemia, *Semin Hematol* 46, 16-23.
 21. Attarbaschi, A., Pisecker, M., Inthal, A., Mann, G., Janousek, D., Dworzak, M., Potschger, U., Ullmann, R., Schrappe, M., Gadner, H., Haas, O. A., Panzer-Grumayer,

- R., and Strehl, S. (2010) Prognostic relevance of TLX3 (HOX11L2) expression in childhood T-cell acute lymphoblastic leukaemia treated with Berlin-Frankfurt-Munster (BFM) protocols containing early and late re-intensification elements, *Br J Haematol* 148, 293-300.
22. Rakowski, L. A., Lehotzky, E. A., and Chiang, M. Y. (2011) Transient responses to NOTCH and TLX1/HOX11 inhibition in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma, *PLoS One* 6, e16761.
 23. Mullighan, C. G., Su, X., Zhang, J., Radtke, I., Phillips, L. A., Miller, C. B., Ma, J., Liu, W., Cheng, C., Schulman, B. A., Harvey, R. C., Chen, I. M., Clifford, R. J., Carroll, W. L., Reaman, G., Bowman, W. P., Devidas, M., Gerhard, D. S., Yang, W., Relling, M. V., Shurtleff, S. A., Campana, D., Borowitz, M. J., Pui, C. H., Smith, M., Hunger, S. P., Willman, C. L., and Downing, J. R. (2009) Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia, *N Engl J Med* 360, 470-480.
 24. Mullighan, C. G., Zhang, J., Harvey, R. C., Collins-Underwood, J. R., Schulman, B. A., Phillips, L. A., Tasian, S. K., Loh, M. L., Su, X., Liu, W., Devidas, M., Atlas, S. R., Chen, I. M., Clifford, R. J., Gerhard, D. S., Carroll, W. L., Reaman, G. H., Smith, M., Downing, J. R., Hunger, S. P., and Willman, C. L. (2009) JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9414-9418.
 25. Breit, S., Stanulla, M., Flohr, T., Schrappe, M., Ludwig, W. D., Tolle, G., Happich, M., Muckenthaler, M. U., and Kulozik, A. E. (2006) Activating NOTCH1 mutations predict favorable early treatment response and long-term outcome in childhood precursor T-cell lymphoblastic leukemia, *Blood* 108, 1151-1157.
 26. Larson Gedman, A., Chen, Q., Kugel Desmoulin, S., Ge, Y., LaFiura, K., Haska, C. L., Cherian, C., Devidas, M., Linda, S. B., Taub, J. W., and Matherly, L. H. (2009) The impact of NOTCH1, FBW7 and PTEN mutations on prognosis and downstream signaling in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group, *Leukemia* 23, 1417-1425.
 27. Gutierrez, A., Sanda, T., Grebliunaite, R., Carracedo, A., Salmena, L., Ahn, Y., Dahlberg, S., Neuberg, D., Moreau, L. A., Winter, S. S., Larson, R., Zhang, J., Protopopov, A., Chin, L., Pandolfi, P. P., Silverman, L. B., Hunger, S. P., Sallan, S. E., and Look, A. T. (2009) High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Blood* 114, 647-650.

28. Gutierrez, A., Sanda, T., Ma, W., Zhang, J., Grebliunaite, R., Dahlberg, S., Neuberg, D., Protopopov, A., Winter, S. S., Larson, R. S., Borowitz, M. J., Silverman, L. B., Chin, L., Hunger, S. P., Jamieson, C., Sallan, S. E., and Look, A. T. (2010) Inactivation of LEF1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Blood* 115, 2845-2851.
29. Gaynon, P. S. (2005) Childhood acute lymphoblastic leukaemia and relapse, *Br J Haematol* 131, 579-587.
30. Hogan, L. E., Meyer, J. A., Yang, J., Wang, J., Wong, N., Yang, W., Condos, G., Hunger, S. P., Raetz, E., Saffery, R., Relling, M. V., Bhojwani, D., Morrison, D. J., and Carroll, W. L. (2011) Integrated genomic analysis of relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia reveals therapeutic strategies, *Blood* 118, 5218-5226.
31. Robison, L. L. (2011) Late effects of acute lymphoblastic leukemia therapy in patients diagnosed at 0-20 years of age, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011, 238-242.
32. Rivera, G. K., Zhou, Y., Hancock, M. L., Gajjar, A., Rubnitz, J., Ribeiro, R. C., Sandlund, J. T., Hudson, M., Relling, M., Evans, W. E., and Pui, C. H. (2005) Bone marrow recurrence after initial intensive treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia, *Cancer* 103, 368-376.
33. Mertens, A. C., Liu, Q., Neglia, J. P., Wasilewski, K., Leisenring, W., Armstrong, G. T., Robison, L. L., and Yasui, Y. (2008) Cause-specific late mortality among 5-year survivors of childhood cancer: the Childhood Cancer Survivor Study, *J Natl Cancer Inst* 100, 1368-1379.
34. Fulbright, J. M., Raman, S., McClellan, W. S., and August, K. J. (2011) Late effects of childhood leukemia therapy, *Curr Hematol Malig Rep* 6, 195-205.
35. Nathan, P. C., Wasilewski-Masker, K., and Janzen, L. A. (2009) Long-term outcomes in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia, *Hematol Oncol Clin North Am* 23, 1065-1082, vi-vii.
36. Thorn, I., Forestier, E., Botling, J., Thuresson, B., Wasslavik, C., Bjorklund, E., Li, A., Lindstrom-Eriksson, E., Malec, M., Gronlund, E., Torikka, K., Heldrup, J., Abrahamsson, J., Behrendtz, M., Soderhall, S., Jacobsson, S., Olofsson, T., Porwit, A., Lonnerholm, G., Rosenquist, R., and Sundstrom, C. (2011) Minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a Swedish multi-centre study comparing real-time polymerase chain reaction and multicolour flow cytometry, *Br J Haematol* 152, 743-753.

37. Zou, L., Zhang, H., Du, C., Liu, X., Zhu, S., Zhang, W., Li, Z., Gao, C., Zhao, X., Mei, M., Bao, S., and Zheng, H. (2012) Correlation of SRSF1 and PRMT1 expression with clinical status of pediatric acute lymphoblastic leukemia, *J Hematol Oncol* 5, 42.
38. Bhojwani, D., Kang, H., Moskowitz, N. P., Min, D. J., Lee, H., Potter, J. W., Davidson, G., Willman, C. L., Borowitz, M. J., Belitskaya-Levy, I., Hunger, S. P., Raetz, E. A., and Carroll, W. L. (2006) Biologic pathways associated with relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study, *Blood* 108, 711-717.
39. Ismail, E. A., Mahmoud, H. M., Tawfik, L. M., Habashy, D. M., Adly, A. A., El-Sherif, N. H., and Abdelwahab, M. A. (2012) BIRC6/Apollon gene expression in childhood acute leukemia: impact on therapeutic response and prognosis, *Eur J Haematol* 88, 118-127.
40. Jiao, Y., Cui, L., Gao, C., Li, W., Zhao, X., Liu, S., Wu, M., Deng, G., and Li, Z. (2012) CASP8AP2 is a promising prognostic indicator in pediatric acute lymphoblastic leukemia, *Leuk Res* 36, 67-71.
41. Cleaver, A. L., Beesley, A. H., Firth, M. J., Sturges, N. C., O'Leary, R. A., Hunger, S. P., Baker, D. L., and Kees, U. R. (2010) Gene-based outcome prediction in multiple cohorts of pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study, *Mol Cancer* 9, 105.
42. Kuiper, R. P., Waanders, E., van der Velden, V. H., van Reijmersdal, S. V., Venkatachalam, R., Scheijen, B., Sonneveld, E., van Dongen, J. J., Veerman, A. J., van Leeuwen, F. N., van Kessel, A. G., and Hoogerbrugge, P. M. (2010) IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL, *Leukemia* 24, 1258-1264.
43. Wang, Y. H., Takanashi, M., Tsuji, K., Tanaka, N., Shiseki, M., Mori, N., and Motoji, T. (2009) Level of DNA topoisomerase IIalpha mRNA predicts the treatment response of relapsed acute leukemic patients, *Leuk Res* 33, 902-907.
44. O'Leary, M., Krailo, M., Anderson, J. R., and Reaman, G. H. (2008) Progress in childhood cancer: 50 years of research collaboration, a report from the Children's Oncology Group, *Semin Oncol* 35, 484-493.
45. Pui, C. H., Schrappe, M., Ribeiro, R. C., and Niemeyer, C. M. (2004) Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 118-145.

46. Mody, R., Li, S., Dover, D. C., Sallan, S., Leisenring, W., Oeffinger, K. C., Yasui, Y., Robison, L. L., and Neglia, J. P. (2008) Twenty-five-year follow-up among survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study, *Blood* 111, 5515-5523.
47. Brown, P., Levis, M., Shurtleff, S., Campana, D., Downing, J., and Small, D. (2005) FLT3 inhibition selectively kills childhood acute lymphoblastic leukemia cells with high levels of FLT3 expression, *Blood* 105, 812-820.
48. Brown, P., Levis, M., McIntyre, E., Griesemer, M., and Small, D. (2006) Combinations of the FLT3 inhibitor CEP-701 and chemotherapy synergistically kill infant and childhood MLL-rearranged ALL cells in a sequence-dependent manner, *Leukemia* 20, 1368-1376.
49. Brown, V. I., Fang, J., Alcorn, K., Barr, R., Kim, J. M., Wasserman, R., and Grupp, S. A. (2003) Rapamycin is active against B-precursor leukemia in vitro and in vivo, an effect that is modulated by IL-7-mediated signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15113-15118.
50. Avellino, R., Romano, S., Parasole, R., Bisogni, R., Lamberti, A., Poggi, V., Venuta, S., and Romano, M. F. (2005) Rapamycin stimulates apoptosis of childhood acute lymphoblastic leukemia cells, *Blood* 106, 1400-1406.
51. Gautschi, O., Heighway, J., Mack, P. C., Purnell, P. R., Lara, P. N., Jr., and Gandara, D. R. (2008) Aurora kinases as anticancer drug targets, *Clin Cancer Res* 14, 1639-1648.
52. Linger, R. M., DeRyckere, D., Brandao, L., Sawczyn, K. K., Jacobsen, K. M., Liang, X., Keating, A. K., and Graham, D. K. (2009) Mer receptor tyrosine kinase is a novel therapeutic target in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia, *Blood* 114, 2678-2687.
53. Batra, V., Maris, J. M., Kang, M. H., Reynolds, C. P., Houghton, P. J., Alexander, D., Kolb, E. A., Gorlick, R., Keir, S. T., Carol, H., Lock, R., Billups, C. A., and Smith, M. A. (2012) Initial testing (stage 1) of SGI-1776, a PIM1 kinase inhibitor, by the pediatric preclinical testing program, *Pediatr Blood Cancer* 59, 749-752.
54. Houghton, P. J., Morton, C. L., Kolb, E. A., Lock, R., Carol, H., Reynolds, C. P., Keshelava, N., Maris, J. M., Keir, S. T., Wu, J., and Smith, M. A. (2008) Initial testing (stage 1) of the proteasome inhibitor bortezomib by the pediatric preclinical testing program, *Pediatr Blood Cancer* 50, 37-45.

55. Goemans, B. F., Zwaan, C. M., Harlow, A., Loonen, A. H., Gibson, B. E., Hahlen, K., Reinhardt, D., Creutzig, U., Heinrich, M. C., and Kaspers, G. J. (2005) In vitro profiling of the sensitivity of pediatric leukemia cells to tipifarnib: identification of T-cell ALL and FAB M5 AML as the most sensitive subsets, *Blood* 106, 3532-3537.
56. Szegedi, I., Katona, K., Horvath, A., Molnar, A., Aradi, J., and Kiss, C. (2008) Bcl-2 antisense oligonucleotide inhibits the proliferation of childhood leukemia/lymphoma cells of the B-cell lineage, *Pathol Oncol Res* 14, 275-279.
57. Kano, Y., Akutsu, M., Tsunoda, S., Izumi, T., Kobayashi, H., Mano, H., and Furukawa, Y. (2007) Cytotoxic effects of histone deacetylase inhibitor FK228 (depsipeptide, formally named FR901228) in combination with conventional anti-leukemia/lymphoma agents against human leukemia/lymphoma cell lines, *Invest New Drugs* 25, 31-40.
58. Yanez, L., Bermudez, A., Richard, C., Bureo, E., and Iriando, A. (2009) Successful induction therapy with decitabine in refractory childhood acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia* 23, 1342-1343.
59. Hoelzer, D. (2011) Novel antibody-based therapies for acute lymphoblastic leukemia, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011, 243-249.
60. O'Brien, S. G., Guilhot, F., Larson, R. A., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., Cornelissen, J. J., Fischer, T., Hochhaus, A., Hughes, T., Lechner, K., Nielsen, J. L., Rousselot, P., Reiffers, J., Saglio, G., Shepherd, J., Simonsson, B., Gratwohl, A., Goldman, J. M., Kantarjian, H., Taylor, K., Verhoef, G., Bolton, A. E., Capdeville, R., and Druker, B. J. (2003) Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia, *N Engl J Med* 348, 994-1004.
61. Brown, P., Hunger, S. P., Smith, F. O., Carroll, W. L., and Reaman, G. H. (2009) Novel targeted drug therapies for the treatment of childhood acute leukemia, *Expert Rev Hematol* 2, 145.
62. Barrett, D., Brown, V. I., Grupp, S. A., and Teachey, D. T. (2012) Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling axis in children with hematologic malignancies, *Paediatr Drugs* 14, 299-316.
63. Chiarini, F., Fala, F., Tazzari, P. L., Ricci, F., Astolfi, A., Pession, A., Pagliaro, P., McCubrey, J. A., and Martelli, A. M. (2009) Dual inhibition of class IA phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin as a new

- therapeutic option for T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Cancer Res* 69, 3520-3528.
64. Crazzolara, R., Bradstock, K. F., and Bendall, L. J. (2009) RAD001 (Everolimus) induces autophagy in acute lymphoblastic leukemia, *Autophagy* 5, 727-728.
 65. Crazzolara, R., Cisterne, A., Thien, M., Hewson, J., Baraz, R., Bradstock, K. F., and Bendall, L. J. (2009) Potentiating effects of RAD001 (Everolimus) on vincristine therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Blood* 113, 3297-3306.
 66. Fouladi, M., Laningham, F., Wu, J., O'Shaughnessy, M. A., Molina, K., Broniscer, A., Spunt, S. L., LUCKETT, I., Stewart, C. F., Houghton, P. J., Gilbertson, R. J., and Furman, W. L. (2007) Phase I study of everolimus in pediatric patients with refractory solid tumors, *J Clin Oncol* 25, 4806-4812.
 67. Houghton, P. J., Morton, C. L., Kolb, E. A., Gorlick, R., Lock, R., Carol, H., Reynolds, C. P., Maris, J. M., Keir, S. T., Billups, C. A., and Smith, M. A. (2008) Initial testing (stage 1) of the mTOR inhibitor rapamycin by the pediatric preclinical testing program, *Pediatr Blood Cancer* 50, 799-805.
 68. Rizzieri, D. A., Feldman, E., Dipersio, J. F., Gabrail, N., Stock, W., Strair, R., Rivera, V. M., Albitar, M., Bedrosian, C. L., and Giles, F. J. (2008) A phase 2 clinical trial of deforolimus (AP23573, MK-8669), a novel mammalian target of rapamycin inhibitor, in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies, *Clin Cancer Res* 14, 2756-2762.
 69. Teachey, D. T., Sheen, C., Hall, J., Ryan, T., Brown, V. I., Fish, J., Reid, G. S., Seif, A. E., Norris, R., Chang, Y. J., Carroll, M., and Grupp, S. A. (2008) mTOR inhibitors are synergistic with methotrexate: an effective combination to treat acute lymphoblastic leukemia, *Blood* 112, 2020-2023.
 70. Barth, M., Raetz, E., and Cairo, M. S. (2012) The future role of monoclonal antibody therapy in childhood acute leukaemias, *Br J Haematol* 159, 3-17.
 71. Schmelzle, T., and Hall, M. N. (2000) TOR, a central controller of cell growth, *Cell* 103, 253-262.
 72. Bhaskar, P. T., and Hay, N. (2007) The two TORCs and Akt, *Dev Cell* 12, 487-502.
 73. Laplante, M., and Sabatini, D. M. (2012) mTOR signaling in growth control and disease, *Cell* 149, 274-293.
 74. Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Latek, R. R., Guntur, K. V., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D. M. (2003) GbetaL, a positive regulator of

- the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR, *Mol Cell* 11, 895-904.
75. Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., Kuehl, W. M., Gray, N. S., and Sabatini, D. M. (2009) DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival, *Cell* 137, 873-886.
 76. Wang, L., Harris, T. E., Roth, R. A., and Lawrence, J. C., Jr. (2007) PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding, *J Biol Chem* 282, 20036-20044.
 77. Pearce, L. R., Sommer, E. M., Sakamoto, K., Wullschleger, S., and Alessi, D. R. (2011) Protor-1 is required for efficient mTORC2-mediated activation of SGK1 in the kidney, *Biochem J* 436, 169-179.
 78. Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S. Y., Huang, Q., Qin, J., and Su, B. (2006) SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity, *Cell* 127, 125-137.
 79. Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M. N. (2006) TOR signaling in growth and metabolism, *Cell* 124, 471-484.
 80. Corradetti, M. N., and Guan, K. L. (2006) Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR?, *Oncogene* 25, 6347-6360.
 81. Shaw, R. J., and Cantley, L. C. (2006) Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth, *Nature* 441, 424-430.
 82. Lee, D. F., Kuo, H. P., Chen, C. T., Hsu, J. M., Chou, C. K., Wei, Y., Sun, H. L., Li, L. Y., Ping, B., Huang, W. C., He, X., Hung, J. Y., Lai, C. C., Ding, Q., Su, J. L., Yang, J. Y., Sahin, A. A., Hortobagyi, G. N., Tsai, F. J., Tsai, C. H., and Hung, M. C. (2007) IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway, *Cell* 130, 440-455.
 83. Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., Wang, C. Y., He, X., MacDougald, O. A., You, M., Williams, B. O., and Guan, K. L. (2006) TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth, *Cell* 126, 955-968.
 84. Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T. P., and Guan, K. L. (2008) Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response, *Nat Cell Biol* 10, 935-945.

85. Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E., and Shaw, R. J. (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint, *Mol Cell* 30, 214-226.
86. DeYoung, M. P., Horak, P., Sofer, A., Sgroi, D., and Ellisen, L. W. (2008) Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling, *Genes Dev* 22, 239-251.
87. Huang, S., and Houghton, P. J. (2003) Targeting mTOR signaling for cancer therapy, *Curr Opin Pharmacol* 3, 371-377.
88. Bracho-Valdes, I., Moreno-Alvarez, P., Valencia-Martinez, I., Robles-Molina, E., Chavez-Vargas, L., and Vazquez-Prado, J. (2011) mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused, *IUBMB Life* 63, 896-914.
89. Mamane, Y., Petroulakis, E., LeBacquer, O., and Sonenberg, N. (2006) mTOR, translation initiation and cancer, *Oncogene* 25, 6416-6422.
90. Duvel, K., Yecies, J. L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A. I., Souza, A. L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., Vander Heiden, M. G., MacKeigan, J. P., Finan, P. M., Clish, C. B., Murphy, L. O., and Manning, B. D. (2010) Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1, *Mol Cell* 39, 171-183.
91. Zhang, H. H., Huang, J., Duvel, K., Boback, B., Wu, S., Squillace, R. M., Wu, C. L., and Manning, B. D. (2009) Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway, *PLoS One* 4, e6189.
92. Cunningham, J. T., Rodgers, J. T., Arlow, D. H., Vazquez, F., Mootha, V. K., and Puigserver, P. (2007) mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex, *Nature* 450, 736-740.
93. Ganley, I. G., Lam du, H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., and Jiang, X. (2009) ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy, *J Biol Chem* 284, 12297-12305.
94. Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D. L., Vetrini, F., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M. C., Facchinetti, V., Sabatini, D. M., and Ballabio, A. (2012) A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB, *EMBO J* 31, 1095-1108.
95. Huang, J., Wu, S., Wu, C. L., and Manning, B. D. (2009) Signaling events downstream of mammalian target of rapamycin complex 2 are attenuated in cells and

- tumors deficient for the tuberous sclerosis complex tumor suppressors, *Cancer Res* 69, 6107-6114.
96. Gan, X., Wang, J., Su, B., and Wu, D. (2011) Evidence for direct activation of mTORC2 kinase activity by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, *J Biol Chem* 286, 10998-11002.
 97. Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., and Hall, M. N. (2011) Activation of mTORC2 by association with the ribosome, *Cell* 144, 757-768.
 98. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., and Sabatini, D. M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex, *Science* 307, 1098-1101.
 99. Oh, W. J., and Jacinto, E. (2011) mTOR complex 2 signaling and functions, *Cell Cycle* 10, 2305-2316.
 100. Bertrand, F. E., Spengeman, J. D., Shelton, J. G., and McCubrey, J. A. (2005) Inhibition of PI3K, mTOR and MEK signaling pathways promotes rapid apoptosis in B-lineage ALL in the presence of stromal cell support, *Leukemia* 19, 98-102.
 101. Inoki, K., Corradetti, M. N., and Guan, K. L. (2005) Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease, *Nat Genet* 37, 19-24.
 102. Cully, M., You, H., Levine, A. J., and Mak, T. W. (2006) Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis, *Nat Rev Cancer* 6, 184-192.
 103. LoPiccolo, J., Blumenthal, G. M., Bernstein, W. B., and Dennis, P. A. (2008) Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations, *Drug Resist Updat* 11, 32-50.
 104. Jotta, P. Y., Ganazza, M. A., Silva, A., Viana, M. B., da Silva, M. J., Zambaldi, L. J., Barata, J. T., Brandalise, S. R., and Yunes, J. A. (2010) Negative prognostic impact of PTEN mutation in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia* 24, 239-242.
 105. O'Neil, J., Grim, J., Strack, P., Rao, S., Tibbitts, D., Winter, C., Hardwick, J., Welcker, M., Meijerink, J. P., Pieters, R., Draetta, G., Sears, R., Clurman, B. E., and Look, A. T. (2007) FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors, *J Exp Med* 204, 1813-1824.
 106. Hales, E. C., Taub, J. W., and Matherly, L. H. (2014) New insights into Notch1 regulation of the PI3K-AKT-mTOR1 signaling axis: Targeted therapy of gamma-

- secretase inhibitor resistant T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Cell Signal* 26, 149-161.
107. Palomero, T., and Ferrando, A. (2009) Therapeutic targeting of NOTCH1 signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Clin Lymphoma Myeloma* 9 Suppl 3, S205-210.
 108. Jiang, B. H., and Liu, L. Z. (2008) Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment, *Drug Resist Updat* 11, 63-76.
 109. Vezina, C., Kudelski, A., and Sehgal, S. N. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle, *J Antibiot (Tokyo)* 28, 721-726.
 110. Cutler, C., and Antin, J. H. (2004) Sirolimus for GVHD prophylaxis in allogeneic stem cell transplantation, *Bone Marrow Transplant* 34, 471-476.
 111. Kahan, B. D. (2000) Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapamune US Study Group, *Lancet* 356, 194-202.
 112. Guba, M., von Breitenbuch, P., Steinbauer, M., Koehl, G., Flegel, S., Hornung, M., Bruns, C. J., Zuelke, C., Farkas, S., Anthuber, M., Jauch, K. W., and Geissler, E. K. (2002) Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor, *Nat Med* 8, 128-135.
 113. Dutcher, J. P. (2004) Mammalian target of rapamycin inhibition, *Clin Cancer Res* 10, 6382S-6387S.
 114. Fingar, D. C., and Blenis, J. (2004) Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression, *Oncogene* 23, 3151-3171.
 115. O'Reilly, K. E., Rojo, F., She, Q. B., Solit, D., Mills, G. B., Smith, D., Lane, H., Hofmann, F., Hicklin, D. J., Ludwig, D. L., Baselga, J., and Rosen, N. (2006) mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt, *Cancer Res* 66, 1500-1508.
 116. Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., Bagley, A. F., Markhard, A. L., and Sabatini, D. M. (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB, *Mol Cell* 22, 159-168.
 117. Hess, G., Smith, S. M., Berkenblit, A., and Coiffier, B. (2009) Temsirolimus in mantle cell lymphoma and other non-Hodgkin lymphoma subtypes, *Semin Oncol* 36 Suppl 3, S37-45.

118. Staehler, M., Haseke, N., Khoder, W., and Stief, C. G. (2010) Profile of temsirolimus in the treatment of advanced renal cell carcinoma, *Onco Targets Ther* 3, 191-196.
119. Hurvitz, S. A., Dalenc, F., Campone, M., O'Regan, R. M., Tjan-Heijnen, V. C., Gligorov, J., Llombart, A., Jhangiani, H., Mirshahidi, H. R., Tan-Chiu, E., Miao, S., El-Hashimy, M., Lincy, J., Taran, T., Soria, J. C., Sahmoud, T., and Andre, F. (2013) A phase 2 study of everolimus combined with trastuzumab and paclitaxel in patients with HER2-overexpressing advanced breast cancer that progressed during prior trastuzumab and taxane therapy, *Breast Cancer Res Treat* 141, 437-446.
120. Voss, M. H., Molina, A. M., and Motzer, R. J. (2011) mTOR inhibitors in advanced renal cell carcinoma, *Hematol Oncol Clin North Am* 25, 835-852.
121. Liu, E., Marincola, P., and Oberg, K. (2013) Everolimus in the treatment of patients with advanced pancreatic neuroendocrine tumors: latest findings and interpretations, *Therap Adv Gastroenterol* 6, 412-419.
122. Spreafico, A., and Mackay, H. J. (2013) Current Phase II clinical data for ridaforolimus in cancer, *Expert Opin Investig Drugs* 22, 1485-1493.
123. Albiges, L., Chamming's, F., Duclos, B., Stern, M., Motzer, R. J., Ravaud, A., and Camus, P. (2012) Incidence and management of mTOR inhibitor-associated pneumonitis in patients with metastatic renal cell carcinoma, *Ann Oncol* 23, 1943-1953.
124. Efeyan, A., and Sabatini, D. M. (2010) mTOR and cancer: many loops in one pathway, *Curr Opin Cell Biol* 22, 169-176.
125. Carracedo, A., Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Rojo, F., Salmena, L., Alimonti, A., Egia, A., Sasaki, A. T., Thomas, G., Kozma, S. C., Papa, A., Nardella, C., Cantley, L. C., Baselga, J., and Pandolfi, P. P. (2008) Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer, *J Clin Invest* 118, 3065-3074.
126. Zhang, H., Bajraszewski, N., Wu, E., Wang, H., Moseman, A. P., Dabora, S. L., Griffin, J. D., and Kwiatkowski, D. J. (2007) PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR, *J Clin Invest* 117, 730-738.
127. Janes, M. R., Limon, J. J., So, L., Chen, J., Lim, R. J., Chavez, M. A., Vu, C., Lilly, M. B., Mallya, S., Ong, S. T., Konopleva, M., Martin, M. B., Ren, P., Liu, Y., Rommel, C., and Fruman, D. A. (2010) Effective and selective targeting of leukemia cells using a TORC1/2 kinase inhibitor, *Nat Med* 16, 205-213.

128. Feldman, M. E., Apse, B., Uotila, A., Loewith, R., Knight, Z. A., Ruggero, D., and Shokat, K. M. (2009) Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2, *PLoS Biol* 7, e38.
129. Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. M., and Zhao, J. J. (2009) Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer, *Nat Rev Drug Discov* 8, 627-644.
130. Serra, V., Markman, B., Scaltriti, M., Eichhorn, P. J., Valero, V., Guzman, M., Botero, M. L., Lluch, E., Atzori, F., Di Cosimo, S., Maira, M., Garcia-Echeverria, C., Parra, J. L., Arribas, J., and Baselga, J. (2008) NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations, *Cancer Res* 68, 8022-8030.
131. Raynaud, F. I., Eccles, S., Clarke, P. A., Hayes, A., Nutley, B., Alix, S., Henley, A., Di-Stefano, F., Ahmad, Z., Guillard, S., Bjerke, L. M., Kelland, L., Valenti, M., Patterson, L., Gowan, S., de Haven Brandon, A., Hayakawa, M., Kaizawa, H., Koizumi, T., Ohishi, T., Patel, S., Saghir, N., Parker, P., Waterfield, M., and Workman, P. (2007) Pharmacologic characterization of a potent inhibitor of class I phosphatidylinositide 3-kinases, *Cancer Res* 67, 5840-5850.
132. Ponticelli, C. (2001) Sirolimus is effective for prevention of acute rejection in primary mismatched renal allograft recipients, *Transplant Proc* 33, 1031-1032.
133. Calmus, Y., and Durrbach, A. (2009) Everolimus de novo in liver transplantation, *Gastroenterol Clin Biol* 33 Suppl 4, S247-252.
134. Ho, V. T., Aldridge, J., Kim, H. T., Cutler, C., Koreth, J., Armand, P., Antin, J. H., Soiffer, R. J., and Alyea, E. P. (2009) Comparison of Tacrolimus and Sirolimus (Tac/Sir) versus Tacrolimus, Sirolimus, and mini-methotrexate (Tac/Sir/MTX) as acute graft-versus-host disease prophylaxis after reduced-intensity conditioning allogeneic peripheral blood stem cell transplantation, *Biol Blood Marrow Transplant* 15, 844-850.
135. Kwitkowski, V. E., Prowell, T. M., Ibrahim, A., Farrell, A. T., Justice, R., Mitchell, S. S., Sridhara, R., and Pazdur, R. (2010) FDA approval summary: temsirolimus as treatment for advanced renal cell carcinoma, *Oncologist* 15, 428-435.
136. Hess, G., Herbrecht, R., Romaguera, J., Verhoef, G., Crump, M., Gisselbrecht, C., Laurell, A., Offner, F., Strahs, A., Berkenblit, A., Hanushevsky, O., Clancy, J., Hewes, B., Moore, L., and Coiffier, B. (2009) Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma, *J Clin Oncol* 27, 3822-3829.

137. Motzer, R. J., Escudier, B., Oudard, S., Hutson, T. E., Porta, C., Bracarda, S., Grunwald, V., Thompson, J. A., Figlin, R. A., Hollaender, N., Kay, A., and Ravaud, A. (2010) Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma : final results and analysis of prognostic factors, *Cancer* 116, 4256-4265.
138. Yao, J. C., Shah, M. H., Ito, T., Bohas, C. L., Wolin, E. M., Van Cutsem, E., Hobday, T. J., Okusaka, T., Capdevila, J., de Vries, E. G., Tomassetti, P., Pavel, M. E., Hoosen, S., Haas, T., Lincy, J., Lebwohl, D., and Oberg, K. (2011) Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors, *N Engl J Med* 364, 514-523.
139. Bachelot, T., Bourgier, C., Cropet, C., Ray-Coquard, I., Ferrero, J. M., Freyer, G., Abadie-Lacourtoisie, S., Eymard, J. C., Debled, M., Spaeth, D., Legouffe, E., Allouache, D., El Kouri, C., and Pujade-Lauraine, E. (2012) Randomized phase II trial of everolimus in combination with tamoxifen in patients with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer with prior exposure to aromatase inhibitors: a GINECO study, *J Clin Oncol* 30, 2718-2724.
140. Demetri, G. D., Chawla, S. P., Ray-Coquard, I., Le Cesne, A., Staddon, A. P., Milhem, M. M., Penel, N., Riedel, R. F., Bui-Nguyen, B., Cranmer, L. D., Reichardt, P., Bompas, E., Alcindor, T., Rushing, D., Song, Y., Lee, R. M., Ebbinghaus, S., Eid, J. E., Loewy, J. W., Haluska, F. G., Dodion, P. F., and Blay, J. Y. (2013) Results of an international randomized phase III trial of the mammalian target of rapamycin inhibitor ridaforolimus versus placebo to control metastatic sarcomas in patients after benefit from prior chemotherapy, *J Clin Oncol* 31, 2485-2492.
141. Naing, A., Aghajanian, C., Raymond, E., Olmos, D., Schwartz, G., Oelmann, E., Grinsted, L., Burke, W., Taylor, R., Kaye, S., Kurzrock, R., and Banerji, U. (2012) Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of AZD8055 in advanced solid tumours and lymphoma, *Br J Cancer* 107, 1093-1099.
142. Markman, B., Tabernero, J., Krop, I., Shapiro, G. I., Siu, L., Chen, L. C., Mita, M., Melendez Cuero, M., Stutvoet, S., Birle, D., Anak, O., Hackl, W., and Baselga, J. (2012) Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of the oral phosphatidylinositol-3-kinase and mTOR inhibitor BGT226 in patients with advanced solid tumors, *Ann Oncol* 23, 2399-2408.
143. Teachey, D. T., Obzut, D. A., Cooperman, J., Fang, J., Carroll, M., Choi, J. K., Houghton, P. J., Brown, V. I., and Grupp, S. A. (2006) The mTOR inhibitor CCI-779

- induces apoptosis and inhibits growth in preclinical models of primary adult human ALL, *Blood* 107, 1149-1155.
144. Hirase, C., Maeda, Y., Takai, S., and Kanamaru, A. (2009) Hypersensitivity of Ph-positive lymphoid cell lines to rapamycin: Possible clinical application of mTOR inhibitor, *Leuk Res* 33, 450-459.
 145. Yee, K. W., Zeng, Z., Konopleva, M., Verstovsek, S., Ravandi, F., Ferrajoli, A., Thomas, D., Wierda, W., Apostolidou, E., Albitar, M., O'Brien, S., Andreeff, M., and Giles, F. J. (2006) Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies, *Clin Cancer Res* 12, 5165-5173.
 146. Pulsipher, M. A., Wall, D. A., Grimley, M., Goyal, R. K., Boucher, K. M., Hankins, P., Grupp, S. A., and Bunin, N. (2009) A phase I/II study of the safety and efficacy of the addition of sirolimus to tacrolimus/methotrexate graft versus host disease prophylaxis after allogeneic haematopoietic cell transplantation in paediatric acute lymphoblastic leukaemia (ALL), *Br J Haematol* 147, 691-699.
 147. Croce, C. M., and Calin, G. A. (2005) miRNAs, cancer, and stem cell division, *Cell* 122, 6-7.
 148. Wang, Y., and Lee, C. G. (2009) MicroRNA and cancer--focus on apoptosis, *J Cell Mol Med* 13, 12-23.
 149. Bartel, D. P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell* 116, 281-297.
 150. Lawrie, C. H. (2013) MicroRNAs in hematological malignancies, *Blood Rev* 27, 143-154.
 151. Munker, R., and Calin, G. A. (2011) MicroRNA profiling in cancer, *Clin Sci (Lond)* 121, 141-158.
 152. Zhao, H., Wang, D., Du, W., Gu, D., and Yang, R. (2010) MicroRNA and leukemia: tiny molecule, great function, *Crit Rev Oncol Hematol* 74, 149-155.
 153. He, L., and Hannon, G. J. (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation, *Nat Rev Genet* 5, 522-531.
 154. Mirnezami, A. H., Pickard, K., Zhang, L., Primrose, J. N., and Packham, G. (2009) MicroRNAs: key players in carcinogenesis and novel therapeutic targets, *Eur J Surg Oncol* 35, 339-347.
 155. Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., and

- Croce, C. M. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15524-15529.
156. Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Aqeilan, R. I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C. G., Kipps, T. J., Negrini, M., and Croce, C. M. (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13944-13949.
157. Iorio, M. V., Visone, R., Di Leva, G., Donati, V., Petrocca, F., Casalini, P., Taccioli, C., Volinia, S., Liu, C. G., Alder, H., Calin, G. A., Menard, S., and Croce, C. M. (2007) MicroRNA signatures in human ovarian cancer, *Cancer Res* 67, 8699-8707.
158. Iorio, M. V., Ferracin, M., Liu, C. G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Menard, S., Palazzo, J. P., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, G. A., Querzoli, P., Negrini, M., and Croce, C. M. (2005) MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer, *Cancer Res* 65, 7065-7070.
159. Cummins, J. M., He, Y., Leary, R. J., Pagliarini, R., Diaz, L. A., Jr., Sjoblom, T., Barad, O., Bentwich, Z., Szafranska, A. E., Labourier, E., Raymond, C. K., Roberts, B. S., Juhl, H., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Velculescu, V. E. (2006) The colorectal microRNAome, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3687-3692.
160. Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R. M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., Calin, G. A., Liu, C. G., Croce, C. M., and Harris, C. C. (2006) Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis, *Cancer Cell* 9, 189-198.
161. Chandra, P., Luthra, R., Zuo, Z., Yao, H., Ravandi, F., Reddy, N., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., and Jones, D. (2010) Acute myeloid leukemia with t(9;11)(p21-22;q23): common properties of dysregulated ras pathway signaling and genomic progression characterize de novo and therapy-related cases, *Am J Clin Pathol* 133, 686-693.
162. Sampson, V. B., Rong, N. H., Han, J., Yang, Q., Aris, V., Soteropoulos, P., Petrelli, N. J., Dunn, S. P., and Krueger, L. J. (2007) MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells, *Cancer Res* 67, 9762-9770.
163. Nie, K., Gomez, M., Landgraf, P., Garcia, J. F., Liu, Y., Tan, L. H., Chadburn, A., Tuschl, T., Knowles, D. M., and Tam, W. (2008) MicroRNA-mediated down-

- regulation of PRDM1/Blimp-1 in Hodgkin/Reed-Sternberg cells: a potential pathogenetic lesion in Hodgkin lymphomas, *Am J Pathol* 173, 242-252.
164. Navarro, A., Diaz, T., Martinez, A., Gaya, A., Pons, A., Gel, B., Codony, C., Ferrer, G., Martinez, C., Montserrat, E., and Monzo, M. (2009) Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma, *Blood* 114, 2945-2951.
 165. Kluiver, J., Haralambieva, E., de Jong, D., Blokzijl, T., Jacobs, S., Kroesen, B. J., Poppema, S., and van den Berg, A. (2006) Lack of BIC and microRNA miR-155 expression in primary cases of Burkitt lymphoma, *Genes Chromosomes Cancer* 45, 147-153.
 166. Pulikkan, J. A., Dengler, V., Peramangalam, P. S., Peer Zada, A. A., Muller-Tidow, C., Bohlander, S. K., Tenen, D. G., and Behre, G. (2010) Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia, *Blood* 115, 1768-1778.
 167. Mi, S., Lu, J., Sun, M., Li, Z., Zhang, H., Neilly, M. B., Wang, Y., Qian, Z., Jin, J., Zhang, Y., Bohlander, S. K., Le Beau, M. M., Larson, R. A., Golub, T. R., Rowley, J. D., and Chen, J. (2007) MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19971-19976.
 168. Zhu, Y. D., Wang, L., Sun, C., Fan, L., Zhu, D. X., Fang, C., Wang, Y. H., Zou, Z. J., Zhang, S. J., Li, J. Y., and Xu, W. (2011) Distinctive microRNA signature is associated with the diagnosis and prognosis of acute leukemia, *Med Oncol*.
 169. Zanette, D. L., Rivadavia, F., Molfetta, G. A., Barbuzano, F. G., Proto-Siqueira, R., Silva-Jr, W. A., Falcao, R. P., and Zago, M. A. (2007) miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia, *Braz J Med Biol Res* 40, 1435-1440.
 170. Ju, X., Li, D., Shi, Q., Hou, H., Sun, N., and Shen, B. (2009) Differential microRNA expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, *Pediatr Hematol Oncol* 26, 1-10.
 171. Schotte, D., Chau, J. C., Sylvester, G., Liu, G., Chen, C., van der Velden, V. H., Broekhuis, M. J., Peters, T. C., Pieters, R., and den Boer, M. L. (2009) Identification of new microRNA genes and aberrant microRNA profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia* 23, 313-322.
 172. Schotte, D., De Menezes, R. X., Moqadam, F. A., Khankahdani, L. M., Lange-Turenhout, E., Chen, C., Pieters, R., and Den Boer, M. L. (2011) MicroRNA

- characterize genetic diversity and drug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia, *Haematologica* 96, 703-711.
173. Fulci, V., Colombo, T., Chiaretti, S., Messina, M., Citarella, F., Tavolaro, S., Guarini, A., Foa, R., and Macino, G. (2009) Characterization of B- and T-lineage acute lymphoblastic leukemia by integrated analysis of MicroRNA and mRNA expression profiles, *Genes Chromosomes Cancer* 48, 1069-1082.
 174. de Oliveira, J. C., Scrideli, C. A., Brassesco, M. S., Morales, A. G., Pezuk, J. A., Queiroz Rde, P., Yunes, J. A., Brandalise, S. R., and Tone, L. G. (2012) Differential miRNA expression in childhood acute lymphoblastic leukemia and association with clinical and biological features, *Leuk Res* 36, 293-298.
 175. Bueno, M. J., Perez de Castro, I., Gomez de Cedron, M., Santos, J., Calin, G. A., Cigudosa, J. C., Croce, C. M., Fernandez-Piqueras, J., and Malumbres, M. (2008) Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression, *Cancer Cell* 13, 496-506.
 176. Mi, S., Li, Z., Chen, P., He, C., Cao, D., Elkahloun, A., Lu, J., Pelloso, L. A., Wunderlich, M., Huang, H., Luo, R. T., Sun, M., He, M., Neilly, M. B., Zeleznik-Le, N. J., Thirman, M. J., Mulloy, J. C., Liu, P. P., Rowley, J. D., and Chen, J. (2010) Aberrant overexpression and function of the miR-17-92 cluster in MLL-rearranged acute leukemia, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3710-3715.
 177. Kaddar, T., Chien, W. W., Bertrand, Y., Pages, M. P., Rouault, J. P., Salles, G., Ffrench, M., and Magaud, J. P. (2009) Prognostic value of miR-16 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia relationships to normal and malignant lymphocyte proliferation, *Leuk Res* 33, 1217-1223.
 178. Wang, Y., Li, Z., He, C., Wang, D., Yuan, X., Chen, J., and Jin, J. (2010) MicroRNAs expression signatures are associated with lineage and survival in acute leukemias, *Blood Cells Mol Dis* 44, 191-197.
 179. Han, B. W., Feng, D. D., Li, Z. G., Luo, X. Q., Zhang, H., Li, X. J., Zhang, X. J., Zheng, L. L., Zeng, C. W., Lin, K. Y., Zhang, P., Xu, L., and Chen, Y. Q. (2011) A set of miRNAs that involve in the pathways of drug resistance and leukemic stem-cell differentiation is associated with the risk of relapse and glucocorticoid response in childhood ALL, *Hum Mol Genet* 20, 4903-4915.
 180. Zhang, H., Luo, X. Q., Zhang, P., Huang, L. B., Zheng, Y. S., Wu, J., Zhou, H., Qu, L. H., Xu, L., and Chen, Y. Q. (2009) MicroRNA patterns associated with clinical

- prognostic parameters and CNS relapse prediction in pediatric acute leukemia, *PLoS One* 4, e7826.
181. Xu, L., Liang, Y. N., Luo, X. Q., Liu, X. D., and Guo, H. X. (2011) [Association of miRNAs expression profiles with prognosis and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia], *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 32, 178-181.
 182. Kotani, A., Ha, D., Hsieh, J., Rao, P. K., Schotte, D., den Boer, M. L., Armstrong, S. A., and Lodish, H. F. (2009) miR-128b is a potent glucocorticoid sensitizer in MLL-AF4 acute lymphocytic leukemia cells and exerts cooperative effects with miR-221, *Blood* 114, 4169-4178.
 183. Schotte, D., De Menezes, R. X., Akbari Moqadam, F., Khankahdani, L. M., Lange-Turenhout, E., Chen, C., Pieters, R., and Den Boer, M. L. (2011) MicroRNA characterize genetic diversity and drug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia, *Haematologica* 96, 703-711.
 184. Yamanaka, Y., Tagawa, H., Takahashi, N., Watanabe, A., Guo, Y. M., Iwamoto, K., Yamashita, J., Saitoh, H., Kameoka, Y., Shimizu, N., Ichinohasama, R., and Sawada, K. (2009) Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia, *Blood* 114, 3265-3275.
 185. Loffler, D., Brocke-Heidrich, K., Pfeifer, G., Stocsits, C., Hackermuller, J., Kretzschmar, A. K., Burger, R., Gramatzki, M., Blumert, C., Bauer, K., Cvijic, H., Ullmann, A. K., Stadler, P. F., and Horn, F. (2007) Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer, *Blood* 110, 1330-1333.
 186. Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R. L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C. C., and Croce, C. M. (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2257-2261.
 187. Lawrie, C. H. (2007) MicroRNAs and haematology: small molecules, big function, *Br J Haematol* 137, 503-512.
 188. Costinean, S., Zanesi, N., Pekarsky, Y., Tili, E., Volinia, S., Heerema, N., and Croce, C. M. (2006) Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7024-7029.

189. Rai, D., Kim, S. W., McKeller, M. R., Dahia, P. L., and Aguiar, R. C. (2010) Targeting of SMAD5 links microRNA-155 to the TGF-beta pathway and lymphomagenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3111-3116.
190. Huang, X., Shen, Y., Liu, M., Bi, C., Jiang, C., Iqbal, J., McKeithan, T. W., Chan, W. C., Ding, S. J., and Fu, K. (2012) Quantitative proteomics reveals that miR-155 regulates the PI3K-AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma, *Am J Pathol* 181, 26-33.
191. Pedersen, I. M., Otero, D., Kao, E., Miletic, A. V., Hother, C., Ralfkiaer, E., Rickert, R. C., Gronbaek, K., and David, M. (2009) Onco-miR-155 targets SHIP1 to promote TNFalpha-dependent growth of B cell lymphomas, *EMBO Mol Med* 1, 288-295.
192. Gibcus, J. H., Tan, L. P., Harms, G., Schakel, R. N., de Jong, D., Blokzijl, T., Moller, P., Poppema, S., Kroesen, B. J., and van den Berg, A. (2009) Hodgkin lymphoma cell lines are characterized by a specific miRNA expression profile, *Neoplasia* 11, 167-176.
193. Dong, C., Ji, M., and Ji, C. (2009) microRNAs and their potential target genes in leukemia pathogenesis, *Cancer Biol Ther* 8, 200-205.
194. Calin, G. A., Cimmino, A., Fabbri, M., Ferracin, M., Wojcik, S. E., Shimizu, M., Taccioli, C., Zanesi, N., Garzon, R., Aqeilan, R. I., Alder, H., Volinia, S., Rassenti, L., Liu, X., Liu, C. G., Kipps, T. J., Negrini, M., and Croce, C. M. (2008) MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5166-5171.
195. Linsley, P. S., Schelter, J., Burchard, J., Kibukawa, M., Martin, M. M., Bartz, S. R., Johnson, J. M., Cummins, J. M., Raymond, C. K., Dai, H., Chau, N., Cleary, M., Jackson, A. L., Carleton, M., and Lim, L. (2007) Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression, *Mol Cell Biol* 27, 2240-2252.
196. Deshpande, A., Pastore, A., Deshpande, A. J., Zimmermann, Y., Hutter, G., Weinkauff, M., Buske, C., Hiddemann, W., and Dreyling, M. (2009) 3'UTR mediated regulation of the cyclin D1 proto-oncogene, *Cell Cycle* 8, 3584-3592.
197. Dejean, E., Renalier, M. H., Foisseau, M., Agirre, X., Joseph, N., de Paiva, G. R., Al Saati, T., Soulier, J., Desjobert, C., Lamant, L., Prosper, F., Felsher, D. W., Cavaille, J., Prats, H., Delsol, G., Giuriato, S., and Meggetto, F. (2011) Hypoxia-microRNA-16 downregulation induces VEGF expression in anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive anaplastic large-cell lymphomas, *Leukemia* 25, 1882-1890.

198. Mishra, P. J., Song, B., Wang, Y., Humeniuk, R., Banerjee, D., Merlino, G., Ju, J., and Bertino, J. R. (2009) MiR-24 tumor suppressor activity is regulated independent of p53 and through a target site polymorphism, *PLoS One* 4, e8445.
199. Akbari Moqadam, F., Boer, J. M., Lange-Turenhout, E. A., Pieters, R., and den Boer, M. L. (2013) Altered expression of miR-24, miR-126 and miR-365 does not affect viability of childhood TCF3-rearranged leukemia cells, *Leukemia*.
200. Zhang, W., Qian, J. X., Yi, H. L., Yang, Z. D., Wang, C. F., Chen, J. Y., Wei, X. Z., Fu, Q., and Ma, H. (2012) The microRNA-29 plays a central role in osteosarcoma pathogenesis and progression, *Mol Biol (Mosk)* 46, 622-627.
201. Garzon, R., Heaphy, C. E., Havelange, V., Fabbri, M., Volinia, S., Tsao, T., Zanesi, N., Kornblau, S. M., Marcucci, G., Calin, G. A., Andreeff, M., and Croce, C. M. (2009) MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia, *Blood* 114, 5331-5341.
202. Lee, J. H., Voortman, J., Dingemans, A. M., Voeller, D. M., Pham, T., Wang, Y., and Giaccone, G. (2011) MicroRNA expression and clinical outcome of small cell lung cancer, *PLoS One* 6, e21300.
203. Mott, J. L., Kobayashi, S., Bronk, S. F., and Gores, G. J. (2007) mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis, *Oncogene* 26, 6133-6140.
204. Zhang, Y. K., Wang, H., Leng, Y., Li, Z. L., Yang, Y. F., Xiao, F. J., Li, Q. F., Chen, X. Q., and Wang, L. S. (2011) Overexpression of microRNA-29b induces apoptosis of multiple myeloma cells through down regulating Mcl-1, *Biochem Biophys Res Commun* 414, 233-239.
205. Li, Y., Wang, H., Tao, K., Xiao, Q., Huang, Z., Zhong, L., Cao, W., Wen, J., and Feng, W. (2013) miR-29b suppresses CML cell proliferation and induces apoptosis via regulation of BCR/ABL1 protein, *Exp Cell Res* 319, 1094-1101.
206. Wang, X. C., Du, L. Q., Tian, L. L., Wu, H. L., Jiang, X. Y., Zhang, H., Li, D. G., Wang, Y. Y., Wu, H. Y., She, Y., Liu, Q. F., Fan, F. Y., and Meng, A. M. (2011) Expression and function of miRNA in postoperative radiotherapy sensitive and resistant patients of non-small cell lung cancer, *Lung Cancer* 72, 92-99.
207. Kotani, A., Ha, D., Schotte, D., den Boer, M. L., Armstrong, S. A., and Lodish, H. F. (2010) A novel mutation in the miR-128b gene reduces miRNA processing and leads to glucocorticoid resistance of MLL-AF4 acute lymphocytic leukemia cells, *Cell Cycle* 9, 1037-1042.
208. Lv, M., Zhang, X., Jia, H., Li, D., Zhang, B., Zhang, H., Hong, M., Jiang, T., Jiang, Q., Lu, J., Huang, X., and Huang, B. (2012) An oncogenic role of miR-142-3p in

- human T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) by targeting glucocorticoid receptor-alpha and cAMP/PKA pathways, *Leukemia* 26, 769-777.
209. Dahlhaus, M., Roof, C., Ruck, S., Lange, S., Freund, M., and Junghans, C. (2013) Expression and prognostic significance of hsa-miR-142-3p in acute leukemias, *Neoplasma* 60, 432-438.
210. Wang, X. S., Gong, J. N., Yu, J., Wang, F., Zhang, X. H., Yin, X. L., Tan, Z. Q., Luo, Z. M., Yang, G. H., Shen, C., and Zhang, J. W. (2012) MicroRNA-29a and microRNA-142-3p are regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia, *Blood* 119, 4992-5004.
211. Malumbres, R., Sarosiek, K. A., Cubedo, E., Ruiz, J. W., Jiang, X., Gascoyne, R. D., Tibshirani, R., and Lossos, I. S. (2009) Differentiation stage-specific expression of microRNAs in B lymphocytes and diffuse large B-cell lymphomas, *Blood* 113, 3754-3764.
212. Johnnidis, J. B., Harris, M. H., Wheeler, R. T., Stehling-Sun, S., Lam, M. H., Kirak, O., Brummelkamp, T. R., Fleming, M. D., and Camargo, F. D. (2008) Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223, *Nature* 451, 1125-1129.
213. Fazi, F., Rosa, A., Fatica, A., Gelmetti, V., De Marchis, M. L., Nervi, C., and Bozzoni, I. (2005) A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis, *Cell* 123, 819-831.
214. Liu, T. Y., Chen, S. U., Kuo, S. H., Cheng, A. L., and Lin, C. W. (2010) E2A-positive gastric MALT lymphoma has weaker plasmacytoid infiltrates and stronger expression of the memory B-cell-associated miR-223: possible correlation with stage and treatment response, *Mod Pathol* 23, 1507-1517.
215. Fazi, F., Racanicchi, S., Zardo, G., Starnes, L. M., Mancini, M., Travaglini, L., Diverio, D., Ammatuna, E., Cimino, G., Lo-Coco, F., Grignani, F., and Nervi, C. (2007) Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein, *Cancer Cell* 12, 457-466.
216. Moqadam, F. A., Boer, J. M., Lange-Turenhout, E. A., Pieters, R., and den Boer, M. L. (2013) Altered expression of miR-24, miR-126 and miR-365 does not affect viability of childhood TCF3-rearranged leukemia cells, *Leukemia*.
217. Marcucci, G., Mrozek, K., Radmacher, M. D., Garzon, R., and Bloomfield, C. D. (2011) The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia, *Blood* 117, 1121-1129.

218. Wohler, J. E., and Barnum, S. R. (2009) Nylon wool purification alters the activation of T cells, *Mol Immunol* 46, 1007-1010.
219. Mihalik, R., Uher, F., Pocsik, E. E., Berczi, L., Benczur, M., and Kopper, L. (1996) Detection of Drug-induced Apoptosis by Flow Cytometry after Alkaline Extraction of Ethanol Fixed Cells, *Pathol Oncol Res* 2, 78-83.
220. Gong, J., Traganos, F., and Darzynkiewicz, Z. (1994) A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry, *Anal Biochem* 218, 314-319.
221. Kasashima, K., Nakamura, Y., and Kozu, T. (2004) Altered expression profiles of microRNAs during TPA-induced differentiation of HL-60 cells, *Biochem Biophys Res Commun* 322, 403-410.
222. Svoboda, M., Izakovicova Holla, L., Sefr, R., Vrtkova, I., Kocakova, I., Tichy, B., and Dvorak, J. (2008) Micro-RNAs miR125b and miR137 are frequently upregulated in response to capecitabine chemoradiotherapy of rectal cancer, *Int J Oncol* 33, 541-547.
223. Mazan-Mamczarz, K., and Gartenhaus, R. B. (2013) Role of microRNA deregulation in the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), *Leuk Res*.
224. Teachey, D. T., Grupp, S. A., and Brown, V. I. (2009) Mammalian target of rapamycin inhibitors and their potential role in therapy in leukaemia and other haematological malignancies, *Br J Haematol* 145, 569-580.
225. Dekter, H. E., Romijn, F. P., Temmink, W. P., van Pelt, J., de Fijter, J. W., and Smit, N. P. (2010) A spectrophotometric assay for routine measurement of mammalian target of rapamycin activity in cell lysates, *Anal Biochem* 403, 79-87.
226. Gu, L., Zhou, C., Liu, H., Gao, J., Li, Q., Mu, D., and Ma, Z. (2010) Rapamycin sensitizes T-ALL cells to dexamethasone-induced apoptosis, *J Exp Clin Cancer Res* 29, 150.
227. Saunders, P., Cisterne, A., Weiss, J., Bradstock, K. F., and Bendall, L. J. (2011) The mammalian target of rapamycin inhibitor RAD001 (everolimus) synergizes with chemotherapeutic agents, ionizing radiation and proteasome inhibitors in pre-B acute lymphocytic leukemia, *Haematologica* 96, 69-77.
228. Wei, G., Twomey, D., Lamb, J., Schlis, K., Agarwal, J., Stam, R. W., Opferman, J. T., Sallan, S. E., den Boer, M. L., Pieters, R., Golub, T. R., and Armstrong, S. A. (2006) Gene expression-based chemical genomics identifies rapamycin as a modulator of MCL1 and glucocorticoid resistance, *Cancer Cell* 10, 331-342.

229. Brown, V. I., Seif, A. E., Reid, G. S., Teachey, D. T., and Grupp, S. A. (2008) Novel molecular and cellular therapeutic targets in acute lymphoblastic leukemia and lymphoproliferative disease, *Immunol Res* 42, 84-105.
230. Sebestyen, A., Sticz, T. B., Mark, A., Hajdu, M., Timar, B., Nemes, K., Nagy, N., Varadi, Z., and Kopper, L. (2012) Activity and complexes of mTOR in diffuse large B-cell lymphomas--a tissue microarray study, *Mod Pathol* 25, 1623-1628.
231. Varghese, S., Chen, Z., Bartlett, D. L., Pingpank, J. F., Libutti, S. K., Steinberg, S. M., Wunderlich, J., and Alexander, H. R., Jr. (2011) Activation of the phosphoinositide-3-kinase and mammalian target of rapamycin signaling pathways are associated with shortened survival in patients with malignant peritoneal mesothelioma, *Cancer* 117, 361-371.
232. Roulin, D., Cerantola, Y., Dormond-Meuwly, A., Demartines, N., and Dormond, O. (2010) Targeting mTORC2 inhibits colon cancer cell proliferation in vitro and tumor formation in vivo, *Mol Cancer* 9, 57.
233. Zeng, Z., Sarbassov dos, D., Samudio, I. J., Yee, K. W., Munsell, M. F., Ellen Jackson, C., Giles, F. J., Sabatini, D. M., Andreeff, M., and Konopleva, M. (2007) Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML, *Blood* 109, 3509-3512.
234. Evangelisti, C., Ricci, F., Tazzari, P., Tabellini, G., Battistelli, M., Falcieri, E., Chiarini, F., Bortul, R., Melchionda, F., Pagliaro, P., Pession, A., McCubrey, J. A., and Martelli, A. M. (2011) Targeted inhibition of mTORC1 and mTORC2 by active-site mTOR inhibitors has cytotoxic effects in T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia*.
235. Lawrie, C. H., Saunders, N. J., Soneji, S., Palazzo, S., Dunlop, H. M., Cooper, C. D., Brown, P. J., Troussard, X., Mossafa, H., Enver, T., Pezzella, F., Boulwood, J., Wainscoat, J. S., and Hatton, C. S. (2008) MicroRNA expression in lymphocyte development and malignancy, *Leukemia* 22, 1440-1446.
236. Feng, Y., Chen, X., and Gao, L. (2010) Knockdown of miR-21 as a novel approach for leukemia therapy, *J Formos Med Assoc* 109, 621-623.
237. Ishihara, K., Sasaki, D., Tsuruda, K., Inokuchi, N., Nagai, K., Hasegawa, H., Yanagihara, K., and Kamihira, S. (2012) Impact of miR-155 and miR-126 as novel biomarkers on the assessment of disease progression and prognosis in adult T-cell leukemia, *Cancer Epidemiol* 36, 560-565.

238. Alqurashi, N., Hashimi, S. M., and Wei, M. Q. (2013) Chemical Inhibitors and microRNAs (miRNA) Targeting the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway: Potential for Novel Anticancer Therapeutics, *Int J Mol Sci* 14, 3874-3900.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

- *Disszertációhoz kapcsolódó közlemények:*

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. *Pathol Oncol Res.* 2014; doi: 10.1007/s12253-014-9861-z. **IF: 1,806**

Nemes K, Sebestyén A, Márk Á, Hajdu M, Sticz T, Nagy E, Barna G, Váradi Zs, Kovács G, Kopper L, Csóka M. Mammalian target of rapamycin (mTOR) activity dependent phosphoprotein expression in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Plos One.* 2013;8:e59335. **IF: 3,534**

- *Disszertációtól független közlemények:*

Bárdi E, Csóka M, Garai I, Szegedi I, Müller J, Györke T, Kajáry K, **Nemes K**, Kiss C, Kovács G. Value of FDG-PET/CT Examinations in Different Cancers of Children, Focusing on Lymphomas. *Pathol Oncol Res.* 2014;20:139-43. **IF: 1,806**

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. *Mod Pathol.* 2012;12:1623-8. **IF: 5,253**

Hegy M, Gulácsi A, Cságoly E, Csordás K, Eipel OT, Erdélyi DJ, Müller J, **Nemes K**, Lautner-Csorba O, Kovács GT. Clinical relations of methotrexate pharmacokinetics in the treatment for pediatric osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012;138:1697-702. **IF: 2.914**

- *Idézhető absztraktok:*

Sebestyén A, **Nemes K**, Márk Á, Váradi Zs, Hajdu M, Sticz T, Kopper L, Kovács G, Csóka M. Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Activity Dependent Protein Expression and Rapamycin Sensitivity in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Eur J Cancer.* 2011;47:(Suppl. 1) p. S641.

Nemes K, Márk Á, Hajdu M, Sticz T, Csorba G, Kopper L, Csóka M, Sebestyén A. MicroRNA expression analysis in human lymphoma/leukemia cells. *EJC Suppl.* 2010;8:(5) p. 195.

Csóka M, **Nemes K**, Márk Á, Hajdu M, Kopper L, Sebestyén A. Expression of certain "oncogenic" microRNA in human acute lymphoblastic leukemia cells. *Pediatr Blood Cancer.* 2010;55:(5) pp. 851-852.

Csóka M, Bárdy E, **Nemes K**, Szegedi I, Kiss C, Kovács G. The role of FDG-PET/CT in follow-up of children with lymphoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2010;55:(5) p. 870.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként, témavezetőmnek Dr. Csóka Monikának és konzulensemnek Dr. Sebestyén Annának szeretnék szívből köszönetet mondani, akik lehetőséget biztosítottak egy magas színvonalú kutatómunka megvalósítására. Külön köszönet Dr. Sebestyén Annának, aki befogadott munkacsoportjába, kezdetektől tanított, támogatott és megismertetett a kutatómunka szépségével. Mindketten tudásuk legjavát adták a munkámhoz, klinikus és biológus szemmel, két különböző, mégis összekapcsolódó látásmóddal ismertettek meg. Nélkülük ez a munka nem jöhetett volna létre!

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Kopper László professzor úrnak, hogy lehetővé teszi a kutatásomhoz, értékes gondolataival, szakmai tudásával, világos látásmódjával rávilágított kutatási céljaim lényegére.

Köszönettel tartozom Dr. Tulassay Zsolt professzor úrnak a Klinikai Doktori Iskola vezetőjének, és Dr. Sréter Lídia professzor asszonynak, a Hematológia Program vezetőjének, hogy a Klinikai Doktori Iskola PhD programjában lehetőséget biztosítottak a kutatómunkámhoz.

Szeretném megköszönni Dr. Fekete György és Dr. Szabó András professzor úrnak, hogy munkám klinikai részét a II.sz. Gyermekklinikán-, illetve Dr. Matolcsy András professzor úrnak, hogy laboratóriumi munkámat az I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben végezhettem.

Őszinte köszönettel tartozom Dr. Márk Ágnesnek, aki saját munkáját sokszor félretéve segített az ELISA vizsgálatok kivitelezésében, az ALL sejtek izolálásában, emellett a disszertációval kapcsolatos gyakorlati tanácsaival is hozzájárult munkám gördülékenyebb befejezéséhez.

Külön köszönet Dr. Nagy Eszternek, aki kezdetektől befogadott, mind a Bőrgyógyászati Klinika, mind az Országos Reumatológiai és Fizioterápiás Intézet Immunológiai laboratóriumába, és ELISA vizsgálataim kivitelezéséhez nyújtott lehetőséget. Bármikor fordulhattam hozzá ELISA vizsgálatokkal kapcsolatos kérdéseimmel.

Köszönettel tartozom Dr. Kenessey Istvánnak a statisztikai vizsgálatokban nyújtott felbecsülhetetlen segítségéért, hasznos tanácsaival, munkájával nagymértékben hozzájárult közös publikációnk értékének növeléséhez.

Köszönet Dr. Kovács Gábornak a klinikai mintákért, illetve adatokért, valamint a II.sz. Gyermekklinika Hematológiai Osztály minden munkatársának segítségéért. Külön köszönet

Dr. Váradi Zsófiának, aki nagyon sokat segített a betegek klinikai adatainak összegyűjtésében.

Köszönettel tartozom a Tumorbiológiai laboratórium minden munkatársának – Dr. Márk Ágnes, Dr. Hajdu Melinda, Dr. Sticz Tamás, Csorba Gézné, Mallászné Bagi Györgyi – hogy kezdetektől jó hangulatú légkörben dolgozhattam. Külön köszönet Csorba Géznének a sejttenyésztésben nyújtott segítségéért-, és Dr. Hajdu Melindának, hogy szakmai- és angol nyelvi ismereteivel hozzájárult munkáim színvonalának emeléséhez. Szeretném megköszönni Dr. Sticz Tamásnak és Nagy Noéminek az ALL-es sejtek izolálásban végzett munkájukat.

Köszönet Dr. Barna Gábornak az áramlási citometriai-, illetve Dr. Bödör Csabának a miRNS vizsgálatok kiértékelésében nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom Dr. Semsei Ágnesnek és Dr. Hegyi Mártának a statisztikai vizsgálatokban végzett munkájukért, emellett Dr. Hegyi Mártának külön köszönet a rengeteg hasznos gyakorlati tanácsaiért, támogató szavaiért, és lelkiismeretes munkájáért.

Szeretném megköszönni a II.sz. Gyermekklinikán és I.sz Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet minden munkatársának a segítségét és támogatását.

Végül, szeretnék köszönetet mondani családomnak, akik mindvégig mellettem álltak, bíztattak, a disszertáció írásához nyugodt körülményeket teremtettek. Külön köszönet férjemnek és gyermekeimnek, Kincsőnek és Bendegúznak, akik türelemmel viselték, amikor a disszertáció, illetve publikációk írása miatt kevesebb közös időnk maradt.