

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

Doktori tézisek

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

1. BEVEZETÉS

1.1. Gyermekkori akut lymphoid leukémia

Az akut lymphoid leukémia (ALL) az újonnan diagnosztizált gyermekkori daganatok 25%-át képező, leggyakrabban előforduló gyermekkori malignitás. Mind a genetikai, mind a klinikai képet tekintve heterogén betegcsoportot képez, melyben a leukémia sejtek éretlen és differenciálatlan B- vagy T-progenitor sejtekből származnak. A kombinált, intenzív kezelés hatására a 60-as években még 90%-os letalitással járó betegség hosszútávú gyógyulási esélye napjainkban 80-85%. Az intenzív kezelés ellenére a betegek 15-20%-ának hatékony kezelése napjainkban is nehézségekbe ütközik. Ennek hátterében az esetek egy részében kemoterápia rezisztencia vagy a leukémia recidívája áll. További nehézséget jelentenek az intenzív, kombinált kemoterápiás kezelés következtében kialakuló rövid- és hosszútávú mellékhatások.

Az in vitro, in vivo és fázis vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy gyermekkori ALL-ben a célzott terápia növelheti a betegek gyógyulási esélyét. Ugyanakkor a konvencionálisan alkalmazott szerek dózisa esetleg csökkenthető, ami a kezelés toxicitásának csökkenését eredményezheti. ALL-ben elsősorban a normál B- illetve T-lymphocyták differenciálódásában, proliferációjában, túlélésében és aktivációjában fontos szerepet játszó jelátviteli útvonalak intermedierjeinek, és sejtfelszíni receptorainak gátlása merül fel lehetséges célzott terápiais célpontként, melyek közül napjainkban került az érdeklődés középpontjába az mTOR kináz.

1.2. mTOR jelátviteli útvonal

Az mTOR (mammalian target of rapamycin) a foszfatidilinozitol-3 kináz (PI3K) családba tartozó, 289 kD molekulatömegű szerin-treonin kináz, mely a sejt alapvető funkcióinak (növekedés, proliferáció, túlélés, sejtmotilitás és autofágia) központi szabályozója. Az mTOR kináz aktivitása két komplexhez (mTORC1 és mTORC2) köthető, melyek eltérő felépítéssel és funkcióval rendelkeznek. Mindkét komplexre jellemző az mTOR kináz, az mLST8/GβL és a DEPTOR jelenléte. Az mTORC1 komplex felépítésében emellett a Raptor és PRAS40 vesznek részt, míg az mTORC2 komplex alkotófehérjéiként a Rictor, az mSIN1 és a Protor 1/2 szerepelnek. Az mTORC1 komplex fontos célmolekulái a riboszómális S6 kináz 1 (S6K1), és a 4E kötő fehérje (4EBP1). Az S6K1 foszforilálja a riboszómális S6 fehérjét, mely a riboszóma bioszintézisében vesz részt. A 4EBP1 fehérje foszforilációját követően felszabadul az eIF4E iniciációs faktor, mely más faktorokkal összekapcsolódva a cap függő transzlációt eredményezi. Az mTORC2 az AKT mellett különböző AGC kinázokat

foszforilálva a sejt túlélését, proliferációját támogatja és a sejt motilitásának szabályozásában vesz részt.

Akut lymphoid leukémiában kimutathatók olyan genetikai eltérések, melyek fokozott mTOR aktivitást eredményeznek, azonban az mTOR jelátviteli útvonal pontos szerepével kapcsolatban még kevés adat áll rendelkezésünkre.

Az mTOR gátlók első tagjai a rapamycin és származékai, a rapalógok (temsirolimus, everolimus, deferolimus). Ezeket új generációs mTOR gátlók – az mTORC1/mTORC2 komplexeket (mTORK), illetve kettős gátlóként az mTORC1 és mTORC2 komplexek mellett a PI3K, vagy AKT működését gátló szerek – kifejlesztése követte. Gyermekkori ALL-ben az elmúlt években kezdődtek klinikai vizsgálatok, melyek konvencionális kemoterápiával kombinált mTOR gátlók hatását vizsgálják terápiára nem reagáló, vagy relabáló betegek esetében.

1.3. mikroRNS expresszió

A rövid, nem kódoló RNS-ek csoportjába tartozó mikroRNS-ek megváltozott expressziós szintjét számos hematológiai malignitás, köztük ALL esetében is leírták. A betegek prognózisával, a betegség relapszusával, és a kemoterápia rezisztencia kialakulásával összefüggésbe hozható miR-ekkel kapcsolatban azonban jelenleg még kevés adat áll rendelkezésünkre. Vizsgálatainkban olyan miRNS-ek expresszió vizsgálatát végeztük el ALL-es gyermekek mintáiban, amelyeket korábbi irodalmi adatok alapján választottunk ki. Vizsgáltuk a két legismertebb oncomiR – miR 21 és miR 155 – expresszióját, melyek fokozott expresszióját számos daganattípusban kimutatták. A további miRNS-eket elsősorban hematológiai malignitásokban történt korábbi vizsgálatok eredményei alapján választottuk. A miR 16 csökkent expresszióját különböző hematológiai malignitásokban igazolták. A miR 24 a sejtciklus szabályozója, fokozott expressziója gátolja a sejtek proliferációját, pre-B-ALL-ekben mutatták ki alacsonyabb expresszióját. A tumorsuppresszor miR 29b alacsonyabb expresszióját AML-ben, osteosarcomában és kissejtes tüdődaganatban igazolták. A miR 128b fokozott expresszióját akut lymphoid leukémiában, csökkent expresszióját akut myeloid leukémiában és a rossz prognózisú, MLL-AF4 ALL-ben is leírták. A miR 223 egy hematopoetikus szövet specifikus miRNS, mely lymphoid sejtekben alacsonyan, myeloid sejtvonalakban fokozottan expresszálódik.

2. CÉLKITŰZÉS

Az mTOR aktivitás daganatbiológiai és célzott terápia jelentőségével számos vizsgálat foglalkozik. Gyermekkori daganatokban, így gyermekkori akut lymphoid leukémiákban 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

Az mTOR jelátviteli útvonal aktivitásának, 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 vér mintáit használtuk fel. A betegek átlagéletkora a diagnózis megállapításakor 6.3 év volt (1.8 – 16.4). A prognosztikai faktorok alapján 21 (40%) beteg az alacsony (SR), 23 beteg (43%) a közepes (IR) és 9 beteg (17%) a magas rizikójú (HR) betegcsoportba került, kezelésük ennek megfelelően az ALL IC-BFM 2002 terápiás protokoll SR, IR vagy HR ága alapján történt. A betegek prognózisának megítélése a kezelési protokoll által meghatározott prognosztikai faktorok mellett a követési idő alatt esetleg bekövetkezett relapszus figyelembe vétele alapján történt. A betegek átlagos követési ideje a diagnózistól számítva 28.44 hónap (1.5 – 55.2) volt. Összesen 40 jó- és 13 rossz prognózisú beteg esetében történtek a statisztikai vizsgálatok.

3.2. Primer ALL-es sejtek izolálása

A lymphoblastokat gyermekkori ALL betegek csontvelői és perifériás vér mintáiból izoláltuk sűrűség grádiens centrifugálást követően (Histopaque 1077, Sigma). A sejteket további felhasználásig -70°C-on tároltuk.

3.3. Sejtvonalak, tenyésztés, kezelés

Az *in vitro* vizsgálatokhoz humán ALL-es sejtvonalakat (Nalm6, Mn60 – prekursor B-ALL; Jurkat, CEM – T-ALL), promyelocitás leukémia sejtvonalat (HL60), humán lymphoma sejtvonalakat (KMH2 – Hodgkin-lymphoma; BHD1 – diffúz, nagy B-sejtes lymphoma), valamint gyermekkori akut lymphoid leukémiás betegek primer leukémia sejtjeit használtuk fel. A sejtek kezelését a következő szerekkel végeztük: methotrexate, cytosin-arabinoside, doxorubicin, vincristin, etoposide, methyl-prednisolon, cyclophosphamide és rapamycin.

3.4. Áramlási citometria

Az apoptózis vizsgálatok FACScan áramlási citométeren (BD Biosciences), CellQuest™ (BD) szoftver segítségével történtek. Az eredmények kiértékelését WinList (Verity Software House) szoftverrel végeztük.

3.5. Western-blot

A fehérjelizátumot SDS-poliakrilamid gélen elektroforézissel elválasztottuk, PVDF membránra (BioRad) blottoltuk, majd a p-mTOR, p-S6, p-p70S6K és β -aktin fehérjék expresszióját vizsgáltuk. Másodlagos előhívó rendszerként Vectastain Elite ABC kit-et (Vector) alkalmaztunk. A membránokat kemilumineszcens előhívás után (ECL Western Blotting Substrate, Pierce) lefényképeztük.

3.6. ELISA vizsgálat

A p-mTOR, a p-S6, és a p-4EBP1 fehérjék detektálására szendvics ELISA kitéket (p-mTOR, R&D System; PathScan p-S6 Ribosomal Protein, Ser235/236; PathScan p-4EBP1, Thr37/Thr46, Cell Signaling) használtunk a gyártó leírásának megfelelően. 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.

3.7. Immuncitokémia

Citospin lemezekon leukémia sejtek p-mTOR, p-S6, p-p70S6K, p-4EBP1 fehérje expresszióját vizsgáltuk. A detektálást Novolink polimer másodlagos előhívó rendszerrel (Novocastra) végeztük a gyártó leírásának megfelelően. A vizualizáláshoz DAB szubsztrát-kromogén rendszert használtunk (Dako), a háttérfestés hematoxilinnel történt.

3.8. MikroRNS izolálás, cDNS átírás

A miRNS-eket mirVana_{TM} miRNA izoláló kittel (Ambion) izoláltuk, és a mintákat használatig -70 C-on tároltuk. A cDNS átírás TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit és Taqman MicroRNA Assay Kit-ekben található stem-loop RT primerek (miR-128b, 142-3p, 155, 21, 24, 29b, 223) felhasználásával történt a protokollnak megfelelően.

3.9. Valós idejű PCR

A miRNS-ek amplifikációjához TaqMan Gene Expression Master Mix-et és TaqMan MicroRNA Assay Kitékben (Applied Biosystems) található TM-primereket (miR-128b, 142-3p, 155, 21, 24, 29b, 223) használtunk. A miRNS expresszió relatív értékét a belső kontrollként szolgáló RNU6B szintjéhez (Applied Biosystems) normalizáltuk. Az adatokat 7500 software v.1.3.0 és DataAssist v.2.0 program (Applied Biosystems) segítségével értékeltük.

3.10. Statisztika

Az adatok kiértékelése kétmintás párosított t-próbával vagy Mann-Whitney U teszt alkalmazásával történt. A kategorikus változók összehasonlításához χ^2 és Fisher-féle exakt tesztekkel használtunk. Az ELISA OD cutoff érték, illetve a miRNS 128b relatív expressziós határérték meghatározásához ROC analízis használtunk. A teljes, illetve relapszus mentes túlélés vizsgálatához Kaplan-Meier-féle túlélési analízist alkalmaztunk. A különböző prognosztikai faktorok multivariancia analízise Cox regressziós modell felhasználásával történt. A p-4EBP1 és miR 128b expresszió közötti korreláció vizsgálatához Spearman-féle korreláció analízist alkalmaztunk. Az elemzést SPSS 15.1 (SPSS Inc.), illetve Stat Soft STATISTICA 9.0 szoftverekkel végeztük.

4. EREDMÉNYEK

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

Az mTOR jelátviteli útvonal aktivitását jelző p-mTOR, p-S6, p-p70S6K, és p-4EBP1 fehérjék fokozottabb mennyiségét mutattuk ki Western blot, immuncitokémia, ELISA, valamint áramlási citometria módszerekkel humán ALL sejtvonalakban és gyermekkori ALL sejtekben. Emellett humán ALL sejtvonalakban szignifikánsan magasabb p-4EBP1 és p-S6 expressziót, gyermekkori ALL-es betegek leukémia sejtjei esetében szignifikánsan magasabb p-4EBP1 expressziót detektáltunk a normál PMNC sejtekhez viszonyítva ELISA vizsgálattal.

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

A p-4EBP1 fehérje mennyiségének és a betegek prognózisának összefüggését vizsgálva kimutattuk, hogy a rossz prognózisú betegek 0. napi csontvelői mintáiban szignifikánsan magasabb az mTOR aktivitást jelző p-4EBP1 fehérje expressziója a jó prognózisú betegcsoporthoz viszonyítva. Eredményeink alapján a p-4EBP1 ELISA esetében meghatároztunk egy cutoff OD értéket (OD: 1.1), amely alapján a betegeket jó (OD<1.1, alacsonyabb mTOR aktivitás) és rossz (OD>1.1, magasabb mTOR aktivitás) prognózisú betegcsoportba tudtuk sorolni. A jó- és rossz prognózisú betegcsoport klinikai adatait figyelembe véve szignifikáns összefüggést tudtunk kimutatni mindkét sejttypusban (B-, és T-ALL) a magasabb mTOR aktivitás és a betegek rossz prognózisa, rossz 8. napi szteroid válasza, valamint a nem hyperdiploid kariotípusa között. Kaplan-Meier görbe segítségével ábrázoltuk az mTOR aktivitás és a betegek túlélési idejének összefüggését. Az alacsonyabb mTOR aktivitással (OD<1.1) jellemezhető betegek (n=37) teljes és relapszus mentes túlélése szignifikánsan jobb volt a magasabb mTOR aktivitással (OD>1.1) jellemzett betegekhez (n=12) képest (p=0.00012). Multivariancia analízissel kimutattuk, hogy a fokozott mTOR aktivitás (OD>1.1) szignifikánsan növeli a rossz prognózist, a relapszus és a rossz terápiás válasz előfordulásának rizikóját.

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

Valamennyi vizsgált esetben (prognózistól függetlenül) a p-S6 és p-4EBP1 expresszió csökkent a protokoll M előtti csontvelő kontroll időpontjáig, a lymphoblastok számának csökkenésével párhuzamosan. A jó prognózisú, alacsonyabb kezdeti mTOR aktivitással

(OD<1.1) rendelkező betegek esetében a p-4EBP1 expresszió a kezelés alatti követéses mintákban lecsökkent és a két éves követési idő alatt sem emelkedett. A kezdeti magas (OD>1.1) p-4EBP1 expressziót mutató, rossz prognózisú betegek esetében a p-4EBP1 fehérje expressziója ugyan szignifikánsan csökkent a protokoll M előtti kontroll időpontjára, azonban relapszusban a kezdeti érték fölé emelkedett, jelezve a magas mTOR aktivitással rendelkező ALL sejtek megjelenését és arányának növekedését a mintákban.

4.4. Az mTOR aktivitás kimutatása gyermekkori ALL mintákban áramlási citometriával

Áramlási citometriai vizsgálatainkban indirekt fluoreszcens festéssel jelöletlen 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 (Δ MFI) – a nem leukémiás, kontroll sejtekhez viszonyítva – 15-20 szoros volt.

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

Humán ALL sejtvonalakban, illetve gyermekkori ALL-es betegek izolált leukémia sejtjeiben a rapamycin és a rapamycin kombinációs kezelések (doxorubicin, etoposide, vincristin, methotrexate, methyl-prednisolon, cytosin-arabinoside, cyclophosphamide) apoptotikus hatásait teszteltük *in vitro*. A 72 órás rapamycin kezelés antiproliferatív hatását minden vizsgált humán ALL sejtvonal esetében ki tudtuk mutatni, Jurkat (T-ALL) sejtvonal esetében emellett a spontán apoptózis mértéke is emelkedett. A kombinációs kezelésekben a Jurkat és a Nalm6 (B-ALL) esetében a rapamycin minden alkalmazott kemoterápiás szer apoptotikus hatását fokozta. Gyermekkori ALL-es betegek izolált leukémia sejtjeiben a rapamycin a kemoterápiás szerek hatását különböző mértékben fokozta (10 – 91%). Két beteg esetében a rapamycin és a kombinációs kezelések apoptózis indukáló hatása nem volt szignifikáns (<10%), három beteg esetében a rapamycin önmagában is fokozta az apoptózist, és növelte az etoposide, vincristin és methyl-prednisolon apoptózis indukáló hatását.

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

A rapamycin mTOR aktivitásra gyakorolt hatását humán ALL sejtekben a foszforilált célfehérjék mennyiségi vizsgálatával követtük Western blot, immuncitokémia és ELISA

segítségével, az mTOR komplexeket alkotó fehérjék (Raptor, Rictor) mennyiségét immuncitokémiával határoztuk meg. Humán ALL sejtvonalakban az mTOR aktivitás csökkent a kezelés hatására, Nalm6 sejtekben alacsony Raptor és magas Rictor, míg a Jurkat sejtekben magas Raptor és alacsonyabb Rictor expressziót mutattunk ki. Gyermekkori ALL-es betegek (n=4) izolált csontvelői sejtjeinek *in vitro* rapamycin kezelését követően a jó prognózisú betegek mintáiban a p-4EBP1 expresszió szignifikánsan lecsökkent, míg a rossz prognózisú betegek mintáiban a p4EBP1 expresszió növekedett.

4.7. miRNS expresszió vizsgálatok humán leukémia sejtekben

A vizsgált miRNS-ek (miR: 16, 21, 24, 29b, 128b, 142-3p, 155, 223) közül a miR 128b szignifikáns overexpressziója jellemezte a humán ALL sejtvonalakat. Az „oncomiR” 21 egyik vizsgált humán ALL sejtvonalban sem mutatott expresszió fokozódást, az „oncomiR” 155 jelentősebb expressziója pedig csak a CEM (T-ALL) sejtvonalban volt jellemző. A T-ALL-es sejtvonalakat a miR 16 overexpressziója, míg a B-ALL sejtvonalakat a miR 223 alacsony expressziója jellemezte. Gyermekkori ALL-es betegek (n=24) 0. napi mintáiban mindkét sejttypusban a miR 21, miR 29b és miR 223 alacsony expresszióját detektáltuk, míg a miR 128b expressziója minden esetben szignifikánsan fokozott volt. A miR 155 mérsékelten emelkedett expresszióját csak B-ALL-es betegek sejtjeiben tudtuk kimutatni.

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

Mind B-, mind T-ALL esetében szignifikánsan magasabb miR 128b expressziót detektáltunk a jó prognózisú betegek 0. napi mintáinak csontvelői sejtjeiben a rossz prognózisú betegekhez viszonyítva. A betegek klinikai adatainak és a miR128b expressziójának összefüggését tovább vizsgáltuk. Szignifikáns korrelációt mutattunk ki az alacsonyabb miR 128b expresszió és a betegek rossz prognózisa és rossz 8. napi szteroid válasza között, valamint a magasabb miR 128b expresszió és a betegek hosszabb relapszus mentes túlélése között.

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

Gyermekkori ALL-es betegek kemoterápiás kezelés során gyűjtött mintáiban a vizsgált miRNS-ek expressziója megváltozott. Az alacsonyan expresszált miR-ek expressziójának emelkedését, míg az overexpresszált miRNS-ek expresszió csökkenését figyeltük meg a protokoll M előtti kontroll időpontban. A jó- és a rossz prognózisú betegek követéses

mintáinak csontvelői sejtjeiben a miR 128b expressziója szignifikánsan lecsökkent, a miR 223 expressziója szignifikáns emelkedést mutatott a protokoll M előtti időpontig a kezelés megkezdése előtti mintákhoz viszonyítva. Jó prognózisú betegekben a miRNS-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 relapszuskor – a csontvelői minták növekvő arányú leukémia sejtjeinek megfelelően – emelkedett (miR 128b), illetve csökkent (miR 223).

5. KÖVETKEZTETÉSEK

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

- a. Igazoltuk többféle módszerrel a humán ALL sejtvonalak és izolált gyermekkori ALL sejtek jellemzően magas mTOR aktivitását.
- b. 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

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

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

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

- a. Kimutattunk, hogy a humán daganatokban fokozottan expresszálódó „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

- b. 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
- c. Igazoltuk, hogy a miR 128b és miR 223 expressziója – leukémia sejt specificitásuk révén – hatékonyan követi a csontvelői minták leukémia sejt arányának változását

6. 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.