

Az mTOR (mammalian target of rapamycin) aktivitás jelentősége humán lymphomákban

Doktori tézisek

Kovácsné Márk Ágnes

Semmelweis Egyetem

Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sebestyén Anna tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Tóth Erika főorvos, M.D., Ph.D.

Dr. Tőkés Anna-Mária tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Kulka Janina egyetemi tanár, M.D., Ph.D.

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Moldvay Judit egyetemi docens, M.D., Ph.D.

Dr. Koncz Gábor tudományos munkatárs, Ph.D.

Budapest

2013

BEVEZETÉS

1. mTOR jelút jelentősége

Az mTOR (mammalian target of rapamycin) egy 289 kDa molekulatömegű szerin-treonin kináz, amely számos jelút aktiváló és inaktíváló üzenetét integrálja. Így az mTOR-jelút fontos szerepet tölt be olyan alapvető sejtfunciók szabályozásában, mint a növekedés, a proliferáció és a motilitás.

Az mTOR kináz aktivitása két komplexhez köthető, melyek a jelútban elfoglalt helyük alapján és funkcionálisan is különböznek egymástól. Az mTOR-komplex 1 (mTORC1) alkotófehérjéi az mTOR, a Raptor, a mLST8, a PRAS40 és a Deptor. Az mTOR-komplex 2 (mTORC2) elemei az mTOR, a Rictor, a mLST8, a mSin1, a Protor és a Deptor fehérjék. Az mTORC1 két legfontosabb célmolekulája a riboszomális S6 kináz 1 (S6K1) és a 4E-kötő fehérje (4EBP1). Az S6K1 foszforilálja a riboszomális S6 fehérjét (S6), ezzel elősegítve a riboszóma biogenezist. Miután az mTORC1 foszforilálja a 4EBP1-et, az leválik a transzláció iniciációs faktoráról (eIF4E), ezzel főként olyan molekulák transzlációja válik lehetővé, amelyek proliferációs és túlélési szignálokat támogatnak (c-myc, BCL-2, FGF-2, Survivin, Cyclin-D1). Az mTORC2 célfehérjéi közé az AKT mellett számos AGC-kináz tartozik. Az mTORC2 emellett részt vesz a sejt migráció szabályozásában is.

Bizonyos hematológiai daganatokban (leukemiák, köpenysejtes lymphoma, myeloma multiplex) már kimutattak olyan genetikai változásokat, amelyek a PI3K/AKT/mTOR út fokozott aktivitásának hátterében állnak. Azonban még mindig kevés adat áll rendelkezésünkre a legtöbb lymphoma esetében az mTOR aktivitásáról.

2. Célzott terápia

A célzott terápia a tumorsejtekben olyan fokozott fehérjeexpresszió és fehérjeaktivitás gátlásán alapul, amelyek támogatják a daganatsejtek proliferációját és/vagy túlélését. A célzott terápia során főleg növekedési faktor receptorokat, tirozin kináz receptorokat és jelátviteli útjaik komponenseit támadják főként monoklonális antitestekkel, illetve kis molekulású gátlókkal. A klasszikus mTOR-gátlók közé tartozik az elsőként

felfedezett mTOR gátló, a rapamycin (rapamune/sirolimus) és származékai, a rapalógok (temsirolimus, everolimus, deforolimus). A rapalógok mellett napjainkban új generációs kettős mTORC1/mTORC2 gátlók (duál inhibitorok), köztük PI3K/mTOR, illetve AKT/mTOR gátlók fejlesztése és preklinikai vizsgálata folyik.

3. Diffúz nagy B-sejtes lymphoma (DLBCL) és Hodgkin lymphoma (HL) jellemzése

A non-Hodgkin lymphomák 30-40%-át alkotják a DLBCL-ák, melyekre jellemző a biológiai heterogenitás. Olyan lymphomák tartoznak ebbe a csoportba, amelyek agresszív növekedésűek és emellett érett, nagy tumorsejtek diffúz proliferációját mutatják. A jelenlegi kemoterápiás kezelés mellett a DLBCL-ás betegek 60-80%-ában érhető el teljes remisszió, az 5-10 éves túlélés 50-70%. A DLBCL-ák génexpressziós profiljuk alapján két csoportra oszthatók. Az egyik kategória expressziós profilja a csíráközpont sejtjeihez (GC-DLBCL), a másiké a perifériás aktivált B-sejtek (ABC/non-GC-DLBCL) profiljához hasonlít.

A HL monoklonális, B-sejt eredetű daganatos megbetegedés, gyakran fiatalokat érint. A HL két entitást foglal magába, a betegség 4-5%-át adó noduláris limphocytapredomináns HL-át (NLPHL) és a klasszikus HL-át, amelyet további altípusokra osztanak (nodular sclerosis, lymphocyt gazdag, lymphocyt depléciós, kevertsejtes). A klinikai gyakorlat alapján a klasszikus HL-ás betegek 70-80 %-a gyógyul meg, az ötéves túlélés 85-88%. A terápiás sikerekhez azonban mellékhatások, szövődmények is társulnak. A hosszú távú sugárkezelésben részesülő betegeknél jelentősen megemelkedik más malignus daganatok kialakulásának kockázata (tüdőrák, melanoma, emlőrák, lymphoma).

4. Hodgkin lymphomák mikrokörnyezete és a galektin-1 expresszió

A Hodgkin-/Sternberg-Reed sejtek (HRS) egyedi mikrokörnyezetet szerveznek maguk köré, melynek alapvető szerepe van a tumor progressziójában. A mikrokörnyezet sejtjei bonyolult kapcsolatban vannak egymással és a tumorsejtekkel, egyrészt kölcsönösen elősegítve a szomszédos sejtek aktivációját és proliferációját, másrészt kialakítva a

daganat immunrendszerrel szembeni védekezését. A leggyakoribb sejttípus ebben a mikrokörnyezetben a 2-es típusú helper T-sejt (TH-2) és a regulátor T-sejt (Treg). A HRS-sejtek specifikus kemokinek termelésével (CCL5, CCL17 és CCL22) vonzzák maguk köré ezeket a CD4⁺-T-sejt formákat. A HRS sejtek által termelt galektin-1 is részt vesz a T-sejtek szelekciójában, apoptózist indukál a reaktív T-sejtekben, ezzel visszaszorítva a gyulladást és gátolva az autoreaktivitást. Emellett a galektin-1 az IL-10 termelés támogatásával segíti a T-reg sejtek proliferációját és a TH-2 típusú immunválaszt.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Az mTOR jelút számos daganat esetén a tumorsejtek túlélését biztosító mechanizmusok kulcsszereplője, humán lymphomákban eddig még kevés adat áll rendelkezésünkre aktivitásáról, ezért célul tűztük ki a **különböző lymphomák mTOR aktivitásának vizsgálatát**.

1.1. A lymphomákon belül a diffúz nagy B-sejtes lymphomákat (**DLBCL**) és a Hodgkin lymphomákat (**HL**) magas esetszámú vizsgálatokban a **betegek klinikai adatai és az mTOR aktivitás közti összefüggések** keresése céljából részletesen vizsgáltuk.

1.2. HL-ákban vizsgálni kívántuk, hogy a magas **mTOR aktivitás milyen sejtfunkciókkal lehet összefüggésben**. Mutat-e kapcsolatot az antiapoptotikus fehérjék expressziójával és befolyásolja-e a HL-ákra jellemző mikro környezet kialakítását.

1.3. **mTOR gátlás hatásának vizsgálata** *in vitro* lymphoma sejtvonalakban és *in vivo* lymphoma xenograft modellekben (proliferáció, apoptózis és fehérjeexpresszió változásainak követése).

2. **HL-ák mikro környezetét** alkotó sejtek összetételének vizsgálata különös tekintettel a Treg-sejtek jelenlétére. **Treg-sejtek** és a tumorsejtek kapcsolatának vizsgálata, ebben a **galektin-1** szerepének tanulmányozása.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. TMA-vizsgálatok

Első TMA (tissue microarray) vizsgálatunkban különböző lymphoma entitásokat (4 Burkitt lymphoma, 23 HL, 11 MCL, 9 anaplasias nagy sejtes lymphoma (ALCL), 10 DLBCL, 12 marginális zóna lymphoma (MZL), 13 krónikus lymphoid leukemia (CLL), 10 folliculáris lymphoma (FL) és 12 perifériás T-sejtes lymphoma) vizsgáltunk.

Nagyobb esetszámú TMA-vizsgálatunkban meghatároztuk az mTOR aktivitást és annak összefüggéseit a klinikai adatokkal 83 HL (40 nő, 43 férfi, életkor: 8-82 év, átlagéletkor: 29,8 év) és 68 DLBCL (34 nő, 34 férfi, életkor: 13-87 év, átlagéletkor: 59 év) esetben.

3.2. Sejttenyésztés, in vitro kezelések

Különböző vizsgálatainkban in vitro szuszpenziós (Hodgkin-lymphoma: KMH2, L1236, DEV, L428, HDLM-2, UH-01, non-Hodgkin lymphoma: BHD1, HT58, BL41, BL41/95, Ramos, Raji, U937, SC1; myeloma multiplex: U266, T-sejtes akut lymphoblastos leukémia: CEM, Jurkat, prekursor B-sejtes akut lymphoblastos leukémia: MN60, Nalm6, krónikus myeloid leukémia: K562, akut myeloid leukemia: HL60) és adherens sejtvonalakat (méhnyakrák: HELA, emlőrák: MDA-MB-231) használtunk.

A sejteket kezelését a következő szerekkel végeztük el: nocodazole, staurosporin rapamycin, NVP-BEZ-235, PP-242. metotrexát, citozin-arabinozid, doxorubicin, vincristine, etoposid, metilprednizolon és ciklofoszfamid. A sejtek morfológiáját hematoxilin-eozinnal festett citospin-preparátumokon vizsgáltuk.

3.3. Apoptózismérés és sejtciklusanalízis áramlási citometriával

Az sejtek DNS tartalmát FACScalibur áramlási citométeren (BD Biosciences), mértük. Az eredmények kiértékelését Winlist software-rel végeztük (Verity Software House).

3.4. Sejtviabilitás meghatározása Alamar blue tesztel

Resazurin oldattal (Alamar blue) inkubáltuk a sejteket, majd spektrofotométer segítségével lemértük a minták fluoreszencia értékeit (abszorbancia mérés: 570-590 nm), amiből a sejtek viabilitására és proliferációs aktivitására következtethettünk.

3.5. ELISA mérés

A p-4EBP1 – Thr37/46 detektálására szendvics ELISA kitet használtunk a gyártó utasításainak megfelelően a (PathScan-ELISA kit, Cell Signaling). Az abszorpciót és az optikai denzitást (OD) 450 nm-es hullámhosszon mértük.

3.6. Immuncitokémia és immunhisztokémia

Cytospin lemezeken vizsgáltuk a különböző lymphoma sejtek p-S6, mTOR, p-mTOR, Rictor, Raptor, Galektin-1 és p-Hisztin-H3 expresszióját. IHC vizsgálatokat p-mTOR, p-p70S6K, p-S6, NF-kappaB-p50, BCL-2, BCL-xL, Survivin, Rictor, Raptor, Galektin-1, FOXP3, p-Hisztin-H3 és aktív-kaspáz3 ellenanyagokkal végeztünk. A detektálást Novolink (Novocastra) polimer, illetve Vectastain (Vector) másodlagos előhívó rendszerrel végeztük, a vizualizálás DAB-al (Dako), a háttérfestés hematoxilinnal történt.

3.7. Duolink immuncitokémiai és immunhisztokémiai előhívórendszer

S6 és p-S6, valamint Rictor és mTOR kolokalizációját vizsgáltuk Duolink technikával

3.8. Western blot

A sejtekből készített fehérjelizátumot poliakrilamid-gélelektroforézissel választottuk szét, PVDF-membránra blottoltuk, majd a következő fehérjék expresszióját vizsgáltuk meg: p-mTOR, mTOR, p-p70S6K, p-S6, Rictor és galektin-1 és β -aktin.

Másodlagos ellenanyagként Vectastain Elite ABC másodlagos előhívó kitet (Vector) használtunk, majd a membránokat kemilumineszcens előhívás után (ECL Western Blotting Substrate, Pierce) lefényképeztük.

3.9. Real-time PCR

RNS izolálást (Micro-to-Midi RNS-izoláló kit, Invitrogen) és reverz transzkripciót követően real-time PCR-rel vizsgáltuk a Galektin-1 expresszióját (Hs00899709_m1, TaqMan® Gene Expression Assay, Life Technologies). A génexpressziót GAPDH háztartási gén szintjéhez normalizáltuk.

3.10. Xenograft modell

Hodgkin lymphoma, Burkitt lymphoma és DLBCL xenograftokat hoztunk létre SCID egerekben. Per os kezeltük mindhárom xenograftot rapamycinnel (Sirolimus, Rapamune, Wyeth Europa Ltd.), a DLBCL xenograftokat subcutan oltással rapamycin analóggal (Temsirolimus, Torisel®, Wyeth Europa Ltd.) is. A kezelések 3-8 hétig tartottak, közben 4-7 naponta mértük a tumorméreteket, majd a kísérlet végén a tumorok tömegét. Különböző molekulák expresszió vizsgálatát (proliferációs és apoptózis markerek, mTOR-jelút elemei, mikrokörnyezet) végeztük el az egerekből eltávolított tumorszövetek paraffinos metszetein.

3.11. Statisztikai analízis

Az adatok számtani átlaga és standard deviációja került kiszámításra. A szignifikancia meghatározása T-próbával és Mann-Whitney teszttel történt (p értéke <0,05). A betegek klinikai adatai és a különböző IHC eredmények közti szignifikáns összefüggéseket χ^2 próbával (log-rank teszt) határoztuk meg. A számításokat Statistica, GraphPad, PAST és SPSS szoftver segítségével végeztük.

EREDMÉNYEK

1. mTOR aktivitás a különböző lymphoma sejtvonalakban és humán biopsziás mintákban

Valamennyi sejtvonalban kimutattuk az mTOR expresszióját, ebben jelentős eltérést a sejtvonalak és a normál sejtek között nem tapasztaltunk. Különböző lymphoma és leukemia sejtvonalakban az mTOR aktív formájának (p-mTOR) és foszforilált célmolekuláinak (p-4EBP1, p-p70S6K, p-S6) kimutatásával, mennyiségi vizsgálatával határoztuk meg az mTOR aktivitást ELISA, immuncitokémia és Western blot módszerekkel. A lymphoma és leukémia sejtvonalak szignifikánsan nagyobb mennyiségű p-4EBP1 fehérjét expresszáltak, mint a normál B,- és T-sejtek, ami emelkedett mTOR aktivitásukra utal (ELISA). Párhuzamosan az aktív mTOR kináz (p-mTOR) fehérje mennyisége, illetve foszforilált, indirekt célmolekulája, a p-S6 fehérje is magas expressziót mutatott a különböző daganatos sejtvonalakban (ICC, WB).

2. Mitotikus lymphoid sejtek mTOR aktivitása

A mitotikus lymphoma és normál lymphoid sejtekben magasabb mTOR aktivitást mutattunk ki, mint az interfázisban lévő normál és tumoros lymphoid sejtalakokban. Kettős immuncitokémiai és immunhisztokémiai reakciókkal igazoltuk a mitotikus sejtek fokozott mTOR aktivitását humán lymphoma biopsziákban és lymphoma/leukemia sejtvonalakban.

3. Humán lymphoma-biopsziák mTOR-aktivitásának vizsgálata immunhisztokémiával

A perifériás T-sejtes lymphomák, a MZL-ák és a CLL-ák esetében a minták túlnyomó többségében gyenge vagy negatív immunhisztokémiai reakciókat kaptunk. Bizonyos lymphoma típusok - ide tartozik a HL, a DLBCL, az ALCL, MCL és a BL- magas mTOR aktivitást mutattak.

4. DLBCL és HL magas esetszámú vizsgálata

Magas mTOR aktivitás jellemezte a DLBCL-ás betegek 62%-át. Az aktivált B sejtes eredetű (ABC-DLBCL/non-GC) típusra (80%-ban, 40/50) volt jellemző ez a magas mTOR aktivitás, míg a jelenlegi kezelési lehetőségek mellett jobb prognózisú csíráközpont eredetű DLBCL-ák (GC-DLBCL) esetében gyakorlatilag nem tudtunk mTOR aktivitást kimutatni. Ezekben az esetekben értékeltük a két különböző mTOR komplexre jellemző fehérje, a Raptor és a Rictor IHC-reakciókat is. Az mTOR aktivitást mutató esetek közel kétharmadát (63%) jellemezte magas Rictor expresszió, illetve a Raptorhoz képest domináns Rictor expresszió. Összefüggést találtunk a betegek túlélési adatai és az mTOR aktivitás között. Az emelkedett mTOR aktivitás, az ABC eredetűhöz hasonlóan negatív prognosztikai faktorként jellemezte a betegséget. Az mTORC2-höz (Rictor overexpresszió) kapcsolható mTOR aktivitás szignifikánsan rosszabb túlélési eredményekkel függött össze.

A Hodgkin lymphomákat általánosan magas mTOR aktivitás jellemezte (77/83, 93%) a szövettani altípustól függetlenül. Az összes vizsgált esetet (n=83) elemezve az alacsony mTOR aktivitást mutató betegek teljes túlélése a hat éves követési periódusban 100% (6/6), a magas mTOR aktivitású betegeké 85% (66/77) volt, ez a különbség nem szignifikáns az alacsony mTOR aktivitású betegek kis száma miatt. A Rictor dominancia a HL-ákban nem jellemző az mTORC2 aktivitás, 83 beteg mintáját megvizsgálva csak 1 esetben tudtunk Rictor overexpressziót kimutatni.

5. Antiapoptotikus fehérjékkel kapcsolatos vizsgálatok HL-ákban

Immunhisztokémiai eredményeink alapján a BCL-xL antiapoptotikus fehérje expressziója és a magas mTOR aktivitás összefüggést mutatott, azonban Fisher's exact teszttel nem tudtunk szignifikáns korrelációt igazolni ($p=0,07$).

6. Mikrokörnyezet bizonyos tényezőinek vizsgálata HL-ákban

HL-ákban a tumorsejtek mikrokörnyezetében nagy mennyiségű FOXP3 pozitív regulátor T-sejtet (Treg-sejt) mutattunk ki. Összehasonlítottuk a vizsgált biopsziás

mintákon belül a tumorsejt (HRS) gazdag és tumorsejt mentes területeken a Treg-sejtek gyakoriságát. Szignifikánsan nagyobb mennyiségben fordultak elő Treg-sejtek a HRS-sejtek közvetlen környezetében, mint a tumorsejtektől távolabbi területeken. A Treg-sejtek mennyisége és a betegek prognózisa korrelációt mutatott. Azok az esetek, ahol a tumorsejtek mikro környezetében a Treg-sejtek mennyisége meghaladta az összes sejt 17%-át, az 5 éves túlélés 100%-os volt.

7. Galektin-1 expresszió vizsgálata HL-ák mikro környezetében és a tumorsejtekben

A galektin-1 fehérjének jelentős expresszióját figyeltük meg a tumorsejtekben és az extracelluláris térben egyaránt az esetek többségében (63/73, 86%). Két esetben az alacsony mTOR aktivitás és az alacsony galektin-1 expresszió együtt jelent meg. Megvizsgáltuk az extracelluláris mátrixban is a galektin-1 expressziót, 8 esetben gyenge volt, illetve hiányzott a galektin-1 expresszió. A galektin-1 expressziós mintázat nem mutatott különbséget a különböző HL altípusok esetében. Megfigyeltük, hogy a HRS – sejtek mikro környezetében a jelentős extracelluláris galektin-1 expresszió magas Treg-sejt mennyiséggel párosult. Abban az esetben, amikor az ECM-ben alacsony volt a galektin-1 expresszió a Treg-sejtek mennyisége is alacsonyabb volt.

A HL sejtvonalakban is jelentős galektin-1 expressziót mutattunk ki. Rapamycinnel kezelt HL sejtekben real-time PCR és Western blot technika segítségével követtük a galektin-1 mRNS és fehérje expresszió változását. Transzlációs szinten az mTOR gátló kezelés csökkentette a tumorsejtek galektin-1 termelését. A xenograft kísérletekből származó tumor minták galektin-1 IHC festése segítségével igazoltuk, hogy az mTOR kináz gátlása csökkenti a tumorsejtek galektin-1 termelését *in vivo* is.

8. mTOR gátlók hatásának vizsgálata lymphomákban *in vitro*

Különböző lymphoma/leukemia sejtvonalakat kezeltünk klasszikus és új generációs mTOR gátlókkal. Az indukált apoptózis és a proliferációgátlás mértékét 24-72 óras kezelés után vizsgáltuk (áramlási citometria, Alamar blue assay). Az mTOR-gátló kezelés után minden vizsgált esetben kifejezett G1 blokkot figyeltünk meg, ami

proliferációgátlást eredményezett, de a spontán apoptózis mértéke ennyi idő alatt nem emelkedett. A rapamycin hatását hosszabb (96-120h) kezelési idő után KMH2 (HL) és BHD1 (DLBCL) sejtvonalakban vizsgáltuk. A kezelés KMH2 sejtekben szignifikánsan növelte az apoptózis mértékét, míg BHD1 sejtekben csak proliferációgátlást tapasztaltunk.

Összehasonlítottuk a kettős gátlók/duál inhibitorok (NVP-BEZ-235 és PP-242) és a rapamycin *in vitro* hatását HL és DLBCL sejtvonalakon. A duál inhibitorok HL sejtvonalakban és DLBCL sejtekben is a rapamycinnél nagyobb mértékben csökkentették a sejtek proliferációját. Hosszú távú kezelésekből a kettős gátló kezelés már BHD1 sejtvonalban is apoptózist indukált.

Kombinációs kezelésekből a rapamycin fokozta a TGF β apoptózist indukáló hatását és bizonyos a TGF β hatásaival szemben rezisztens sejtekben helyreállította a TGF β érzékenységet is. A rapamycin HL sejtekben *in vitro* fokozta az indukált apoptózis mértékét doxorubicin, vincristin és etoposide mellett adva.

9. mTOR gátlók hatásának vizsgálata lymphoma xenograftokban *in vivo*

Hodgkin, Burkitt és DLBCL xenograftokban végeztünk mTOR-gátló kezeléseket rapalógokkal. A kezelésekből hatására mindhárom xenograft modellben csökkent a tumorok növekedése a kontrollhoz képest. A tumornövekedés gátlásának hátterében proliferációgátlást és apoptózis indukciót mutattunk ki.

10. Az mTOR aktivitás *in situ* vizsgálata

Beállítottuk sejtvonalakon a p-S6 (aktív riboszomális S6 fehérje) és az mTORC2 komplex mennyiségi vizsgálatára a Duolink technikát. Bizonyítottuk, hogy a módszer adott foszfo-protein (p-S6) mennyiségi változásait valóban kvantitatív módon képes meghatározni *in vitro* rapamycin kezelt sejtek cytospin preparátumain. A különböző lymphoma sejtvonalakban az mTORC2 komplexek mennyisége kvantitatívan összehasonlítható lehet, a komplex mennyiségének változása követhetővé válik.

KÖVETKEZTETÉSEK

I. Vizsgálatainkban jellemeztük különböző lymphoma típusok mTOR aktivitását

a. Igazoltuk, hogy a mitotikus normál lymphoid és lymphomasejtek az interfázisban levő sejtekénél magasabb p-S6 expresszióját, aminek háttérében a magasabb mTOR aktivitás állhat.

b. Kimutattuk, hogy a Burkitt, a köpenysejtes, az anapláziás nagy sejtes, a Hodgkin (HL) és diffúz nagy B sejtes lymphomákat (DLBCL) magas mTOR aktivitás jellemzi, míg a marginális zóna, a perifériás T sejtes, valamint a kis lymphocytás lymphomákra (CLL) ez nem jellemző.

c. A DLBCL-ekben igazoltuk, hogy a magas mTOR aktivitás az ABC altípusban fordul elő és a rossz prognózisú DLBCL-eket jellemzi.

d. Jellemezve a DLBCL-ek mTOR aktivitását kimutattuk, hogy a magas mTOR aktivitás az esetek 63%-ában mTORC2 komplex fokozott expressziójával jár. Statisztikailag elemezve a vizsgált esetekhez tartozó túlélési adatokat igazoltuk, hogy a magas mTOR aktivitású és mTORC2 komplexre jellemző Rictor overexpressziót mutató esetek prognózisa szignifikánsan rosszabb.

e. HL esetében kimutattuk, hogy a daganatsejtekre általánosan jellemző a magasabb mTOR aktivitás. Az alacsony mTOR aktivitású HL-ek (ezek aránya <10%) esetében a betegek 5 évnél hosszabb betegségmentes túlélése 100%. HL-ákban eredményeink szerint a DLBCL-ákkal ellentétben nem jellemző a Rictor, az mTORC2 komplex fokozott expressziója.

II. HL-ák esetében vizsgáltuk olyan a lymphomasejtek túlélését segítő extra- és intracelluláris fehérjék expresszióját, egyéb mikrokörnyezeti tényezők szerepét, amelyek szabályozásában az mTOR aktivitás változása is szerepet játszhat.

a. Több antiapoptotikus fehérje in situ expresszióját vizsgálva, a Bcl-xl és az NFkB-p50 expresszióját a legtöbb magas mTOR aktivitású HL esetben igazoltuk.

b. Kimutattuk a regulátor T-sejtek túlélésében fontos fehérje, a galektin-1 fokozott expresszióját Hodgkin lymphoma sejtekben és extracellulárisan. Nem sikerült igazolnunk mások korábbi eredményeit, amely szerint a különböző HL lymphoma altípusok galektin-1 expressziója különbözne.

- c. Kimutattuk, hogy HL-ákban a T-reg sejtek mennyisége a mikro környezetben magasabb, mint a reaktív nyirokcsomókban. A Treg sejtek nagyon magas aránya HRS-sejtekben gazdag területeken jó prognózisa utal.
- d. Igazoltuk HL sejtvonalakban *in vitro* és *in vivo* is, hogy az mTORC1 aktivitás gátlása transzlációs szinten csökkenti a galektin-1 expresszióját.

III.

In vitro és *in vivo* Hodgkin lymphoma modellekben igazoltuk az mTOR aktivitás szerepét a tumornövekedésben.

- a. Kimutattuk az mTOR gátlók proliferációgátló és hosszútávon apoptózist indukáló hatásait humán *in vitro* lymphoma sejtvonalakban és *in vivo* lymphoma xenograftokban.
- b. Vizsgáltuk különböző lymphomatípusok mTORC1 és mTORC2 komplexekre jellemző fehérjéit és a sejtvonalak mTOR-gátlók iránti érzékenységét. Vizsgálataink szerint a két komplex (mTORC1 és mTORC2) mennyiségi különbségei állhatnak az mTOR gátlókkal szembeni különböző érzékenység hátterében.
- c. *In vitro* vizsgálataink szerint az mTOR gátlók képesek fokozni kemoterápiás szerek és más negatív szabályozók, mint pl. a TGF β hatását is.

Összefoglalva, az mTOR gátlók alkalmazásánál nem csak az mTOR aktivitás meghatározását tartjuk fontosnak, ami a kezelés célpontjának igazolását jelenti az adott beteg daganatában, hanem azt is, hogy az mTOR melyik komplexének aktivitása jellemzi azt. Utóbbi meghatározása segítheti a kombinációs kezelésekhez használható legoptimálisabb mTOR gátlószerek kiválasztását (rapalógok, kettős gátlók) a jövőben.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények

1. 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: 4,792**
2. *Egervári G, ***Márk Á**, Hajdu M, Barna G, Sági Z, Krenács T, Kopper L, Sebestyén A. Mitotic lymphoma cells are characterized by high expression of phosphorylated ribosomal S6 protein. *Histochem Cell Biol.* 2011, 4:409-17. (*: Egervári G. és Márk Á. mindketten első szerzőnek minősülnek) **IF: 2,588**
3. **Márk Á**, Hajdu M, Váradi Zs, Sticz TB, Nagy N, Csomor J, Berczi L, Varga V, Csóka M, Kopper L, Sebestyén A. Characteristic mTOR activity in Hodgkin-lymphomas offers a potential therapeutic target in high risk disease – a combined tissue microarray, *in vitro* and *in vivo* study. *BMC Cancer.* 2013,13:250. doi: 10.1186/1471-2407-13-250. **IF: 3,01**

A disszertációtól független saját közlemények

1. Kenessey I, Bánki B, **Márk A**, Varga N, Tóvári J, Ladányi A, Rásó E, Timár J. Revisiting CB1 receptor as drug target in human melanoma. *Pathol Oncol Res.* 2012, 4:857-66. **IF: 1,366**
2. Sági Z, Füle T, Hajdu M, Matolcsy A, Moskovszky L, **Márk A**, Sebestyén A, Bodoky G. The activated targets of mTOR signaling pathway are characteristic for PDGFRA mutant and wild-type rather than KIT mutant GISTs. *Diagn Mol Pathol.* 2011, 1:22-33. **IF: 2,257**
3. 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 phospho-protein expression in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Plos One.* 2013, 8:e59335. **F: 4,092**

Előadások, poszterek

Márk Á, Hajdu M, Nagy N, Váradi Zs, Sticz T, Timár B, Csóka M, Kopper L, Sebestyén A: Mammalian target of rapamycin (mTOR) activity as potential target in human diffuse large B cell lymphomas and Hodgkin lymphomas. 22st Meeting of the European Association for Cancer Research - Barcelona 2012. July 7-10.

Márk Á, Nagy N, Paku S, Kopper L, Sebestyén A: Fehérjék kölcsönhatásának és aktivitásának új kvantitatív vizsgálati lehetősége in situ. Magyar Onkológusok Társasága XXIX. Kongresszusa, Budapest 2011. november 10-12. Magyar Onkológia 55. évfolyam, 1. Supplementum: 47. oldal. Díj: Legjobb poszterelőadás

Sebestyén A, Nemes K, **Márk Á**, Váradi Zs, Hajdu M, Sticz T, Kopper L, Csóka M: Mammalian target of rapamycin (mTOR) activity dependent protein expression and rapamycin sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemias. European Multidisciplinary Cancer Congress – Stockholm 2011. Sept 24-27.

Márk Á, Hajdu M, Nemes K, Sticz T, Egervári G, Kopper L, Sebestyén A: Sebestyén: Cell type dependent ribosomal S6 protein activation in mitosis. EARC/FEBS advanced lecture course, Molecular Mechanisms in Signal Transduction and Cancer, Spetses - August 16-24, 2011

Váradi Zs, Sebestyén A, Nemes K, **Márk Á**, Hajdú M, Kovács G, Kopper L, Csóka M: Rapamycin sensitivity and mTOR activity in lymphoma/leukemia cells. 20th Meeting of ES-PCR, Brno, Czech Republic - July 1th, 2011

Márk Á, Váradi Zs, Nemes K: Az mTOR-inhibitor kezelésre adott válaszok háttérének vizsgálata humán lymphomákban. PhD Tudományos Napok, Budapest 2011. április 14-15. Absztraktfüzet: 106, 117. o.

Sticz TB, **Márk Á**, Hajdu M, Timár B, Nemes K, Kopper K, Sebestyén A: Tissue-micro array based IHC analysis of mTOR activity in DLBCL. AACR (American Association for Cancer Research) 102nd Annual Meeting April 2-6, 2011

Márk Á, Nagy N, Paku S, Kopper L, Sebestyén A: Aktivált fehérjék és fehérjekomplexek új vizsgálati módszere in situ. 70. Patológus Kongresszus, Siófok 2010. szept. 29-okt. 1.

Nemes K, **Márk Á**, Hajdu M, Sticz T, Csorba G, Kopper L, Csóka M, Sebestyén A: MicroRNA expression analysis in human lymphoma/leukemia cells. European Society of Pediatric Clinical Research 19th Annual Meeting, Pozsony - 2010. július 24-26. Absztraktfüzet: 53. o.

Márk Á, Hajdu M, Nemes K, Sticz T, Krenács T, Kopper L, Sebestyén A: Galectin-1 expression in Hodgkin-lymphoma cells. 21st Meeting of the European Association for Cancer Research - Oslo 2010. June 26-29.

Márk Á, Hajdu M, Nemes K, Sticz T, Krenács T, Kopper L, Sebestyén A: Galectin-1 expression in Hodgkin-lymphoma cells. PhD-Symposium - Vienna 2010. June 16-17. YSA-Young Scientist Association of Medical University of Vienna - Program & Abstracts: 131, 136. o.

Márk Á, Nemes Karolina: Galektin-1 expresszió Hodgkin-lymphoma sejtekben. PhD Tudományos Napok, Budapest 2010. április 15-16. Absztraktfüzet: 49. o.