

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

Doktori értekezés

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

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
1. BEVEZETÉS	9
1.1. mTOR (mammalian target of rapamycin).....	10
1.1.1. mTOR jelátviteli út.....	12
1.1.2. A két mTOR-komplex kapcsolata	17
1.2. mTOR szerepe a daganatokban.....	20
1.2.1. mTOR aktivitás hematológiai daganatokban	21
1.3. Célzott terápia	22
1.3.1. Klasszikus mTOR gátlók	23
1.3.1.1. Temsirolimus (CCI-779).....	24
1.3.1.2. Everolimus (RAD001).....	25
1.3.1.3. Deforolimus (AP23573).....	25
1.3.2. mTOR aktivitás gátlása a hematológiai daganatokban	26
1.3.3. Új generációs mTOR-gátlók	28
1.4. DLBCL és Hodgkin lymphoma jellemzése	29
1.4.1. Diffúz nagy B-sejtes lymphoma	29
1.4.2. Hodgkin lymphoma	32
1.4.3. Hodgkin lymphomák mikrokörnyezete	34
1.5. Regulátor T-sejtek szerepe a daganat mikrokörnyezetében.....	35
1.6. Galektinek, galektin-1	36
1.6.1. A galektinek normál szövetekben.....	37
1.6.2. Galektin-1	38
1.6.3. Galektinek a hematológiai daganatokban	40
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	41
3. MÓDSZEREK	42
3.1. TMA-vizsgálatok	42

3.2. Sejttenyésztés, <i>in vitro</i> kezelések	45
3.3. Apoptózismérés és sejtciklusanalízis áramlási citometriával.....	46
3.4. Sejtviabilitás meghatározása Alamar blue tesztel	46
3.5. ELISA mérés.....	47
3.6. Immuncitokémia	47
3.8. Immunhisztokémia	50
3.8.1. IHC eredmények kiértékelése:	51
3.9. Western blot.....	53
3.10. Real-time PCR	54
3.11. Xenograft modell.....	55
3.12. Statisztikai analízis	56
4. EREDMÉNYEK	57
4.1. mTOR aktivitás a különböző lymphoma sejtvonalakban és humán biopsziás mintákban	57
4.2. Humán lymphoma-biopsziák mTOR-aktivitásának vizsgálata immunhisztokémiával	61
4.3. Mitotikus lymphoid sejtek mTOR aktivitása	64
4.4. DLBCL és HL magas esetszámú vizsgálata	68
4.4.1. DLBCL	68
4.4.2. Hodgkin lymphoma	72
4.5. mTOR aktivitás lehetséges targetjei HL-ben	75
4.5.1. Antiapoptotikus fehérjékkel kapcsolatos vizsgálatok	75
4.5.2. Hodgkin lymphomás esetekben a mikrokörnyezet bizonyos tényezőinek vizsgálata	76
4.6. mTOR gátlók hatásának vizsgálata lymphomákban <i>in vitro</i>	81
4.6.1. Rapamycin hatása.....	81
4.6.2. Dual inhibitor kezelések hatása	82
4.6.3. Rapamycin kezelés kombinációban.....	84
4.7. mTOR gátlók hatásának vizsgálata lymphoma xenograftokban <i>in vivo</i>	85
4.8. mTOR aktivitás és galektin-1 expresszió kapcsolata	89

4.9. Az mTOR aktivitás in situ vizsgálata	90
5. MEGBESZÉLÉS	92
5.1. Humán HL és DLBCL biopsziás eredmények	92
5.1.1. Hodgkin lymphoma	92
5.1.2. Diffúz nagy B-sejtes lymphoma	96
5.2. <i>In vitro</i> és <i>in vivo</i> kísérletek	97
6. KÖVETKEZTETÉSEK	101
7. ÖSSZEFOGLALÁS	103
9. IRODALOMJEGYZÉK	107
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	123
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	125

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

4EBP1: 4E-kötő fehérje

ABC: aktivált B-sejtek

AKT: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog

ALCL: anapláziás nagy-sejtes lymphoma

AML: akut myeloid leukemia

AMP: adenzin monofoszfát

AMPK: AMP activated protein kinase

B-ALL: prekursor B-sejtes lymphoid leukemia

BCR: B-sejt receptor

BCR-ABL: B-sejt receptor - Abelson murine leukemia viral oncogene homolog protein fúziós fehérje

BL: Burkitt lymphoma

CLL: krónikus lymphoid leukemia/kis lymphocytás lymphoma

CML: krónikus myeloid leukemia

CR: teljes remisszió

CRD: szénhidrát felismerő domén

DEPTOR: DEP domain-containing mTOR-interacting protein

DLBCL: diffúz nagy B-sejtes lymphoma

DLBCL, NOS: not otherwise specified DLBCL altípus

ECM: extracelluláris mátrix

EGFR: epidermális növekedési faktor receptor

ERK: extracellular signal-regulated kinase

FDA: Food and Drug Administration/ Amerikai Élelmiszer-és Gyógyszerbiztonsági Felügyelet

FRB-domén: FK506-rapamycin kötő domén

GC: csíráközpont eredetű

GRB10: Growth factor receptor-bound protein 10

GTP: guanozin trifoszfát

HER-2: human epidermal growth factor receptor 2

HIF1 α : hypoxia indukálta faktor 1 α

HL: Hodgkin lymphoma

HRS-sejt: Hodgkin/Sternberg-Reed sejt

IRS: inzulin receptor szubsztrát

FKBP12: FK506 kötő fehérje 12

FLT-3: Fms-like tyrosine kinase-3

FOXO: Forkhead transzkripciós faktor

FOXP3: Forkhead transzkripciós faktor 3

HH3: Hiszton H3

IGFR: inzulinszerű növekedési faktor receptor

IPI: nemzetközi prognosztikus érték

K-RAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

KD: kináz domén

L&H sejtek: lymphocita és hystiocyta sejtek

MCL: köpenysejtes lymphoma

MDS: mielodiszpláziás szindróma

MFI: átlagos fluoreszcencia intenzitás

mSin1: mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1

mTORC1: mTOR-komplex 1

mTORC2: mTOR-komplex 2

MZL: marginális zóna lymphoma

N-RAS: neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog

NHL: non-Hodgkin lymphoma

NLPHL: noduláris lymphocita predomináns Hodgkin lymphoma

non-GC: nem csíráközpont eredetű

OS: overall survival/teljes túlélés

PI3K: foszfatidilinozitol-3 kináz

PIKK: foszfatidilinozitol-3 kinázhoz kapcsolódó fehérjék

PIP2: foszfatidilinozitol-biszfoszfát

PIP3: foszfatidilinozitol-triszfoszfát

PGE: prosztaglandin

PRAS40: proline-rich AKT substrate of 40 kDa

PTEN: phosphatase and tensin homolog

RAG: recombination activating genes

Raptor: regulatory-associated protein of mTOR

RHEB: Ras homolog enriched in brain

Rictor: rapamycin insensitive companion of mTOR

PKB: protein kináz B

PR: részleges remisszió

S6K1: riboszomális S6 kináz 1

Ser: szerin

SGK1: serum/glucocorticoid-regulated kinase 1

TH-2 sejt: 2-es típusú helper T-sejt

TGF β : transzformáló növekedési faktor β

TKR: tirozin kináz receptor

TMA: tissue micro array

TNF α : tumor nekrozis faktor α

TOR: target of rapamycin

Treg-sejt: regulátor T-sejt

TSC1: hamartin

TSC2: tuberin

Thr: treonin

UTR: untranslated/nem kódoló

VEGFR: vaszkuláris növekedési faktor receptor

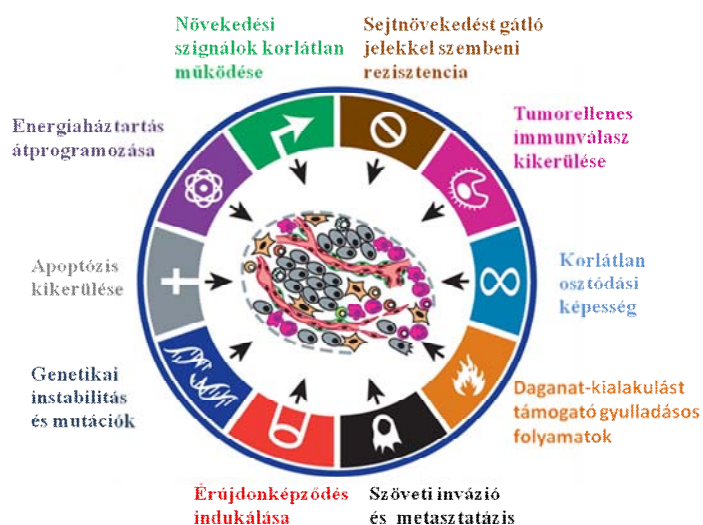
VEGF: vaszkuláris növekedési faktor

WHO: World Health Organisation/egészségügyi világszervezet

YY1: Yin-Yang-1

1. BEVEZETÉS

A 20. század második felében a molekuláris biológiai technikák fejlődésének köszönhetően a daganatbiológiai kutatások gazdag és összetett ismeretekkel bővítették tudásunkat, rávilágítva a daganatok genomjában végbemenő dinamikus változásokra. Számos mutációt fedeztek fel, melyek funkciónyeréssel onkogének kialakulásához, funkcióvesztéssel tumorszuppresszor génekhez vezettek. A daganatkutatók tovább keresték a genetikai hibákat, és egyre több mutációt azonosítottak, melyek a daganatok kialakulásában és növekedésében meghatározóak lehetnek. A feltárt mutációkat vizsgálva észrevettek egy olyan logikai elvet, amely általános a tumortípusonként eltérő genetikai hibák sokféleségétől függetlenül minden daganatra. A tumorsejtekben bekövetkező genetikai változások (genetikai instabilitás, a genom integritásának elvesztése, az epigenetikai változások) és a daganatkialakulást támogató mikroenvironmenti folyamatok (pl. gyulladás) lépésről-lépésre olyan változásokat okoznak, amelyek a sejtekben szükségesek a malignitás kialakulásához. Ezek a tulajdonságok, a sejtnövekedési szignálok önkényes használata, a sejtnövekedést gátló jelekkel szembeni rezisztencia, a programozott sejthalál kikerülésének képessége, az érújdonszövet indukálása, a korlátlan osztódási képesség, a szöveti invázió és az áttétképzés, az energiaháztartás átprogramozása, valamint a tumorelles immunválasz kikerülésének képessége [1, 2] (1. Ábra). Ezek közül – a beteg szempontjából – a metasztatizálás a legfontosabb.

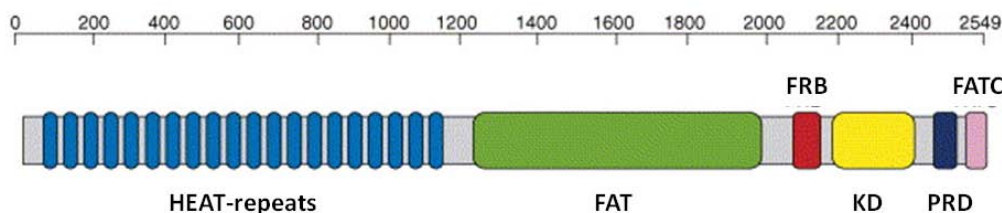


1. Ábra: A rosszindulatú daganatok legfontosabb jellemzői [1, 2]

1.1. mTOR (mammalian target of rapamycin)

Az mTOR-jelút fontos szerepet tölt be az alapvető sejtfunkciók szabályozásában. A növekedési faktorok, a tápanyagok és a sejtek energiaellátottsági állapotának megfelelően pozitív jeleket továbbít, ezáltal segítve a túlélést, növekedést, proliferációért és motilitásért felelős fehérjék és jelutak működését. Az eddig vizsgált összes eukarióta genomban megtalálható a TOR (target of rapamycin) gén, amely kódolja az emlősökben megtalálható mTOR kináznak megfelelő fehérjét. Életfontosságú molekula, ezt bizonyítja, hogy egérkísérletekben az mTOR kinázt, vagy az mTOR-komplexek elemeit kódoló gének kiütése az embriók halálához vezetett [3].

Az mTOR egy 289 kDa molekulatömegű szerin-treonin kináz. C-terminálisan (PIKK-domén) erős homológiát mutat a foszfatidilinozitol-3 kináz (PI3K) katalitikus doménjével, ezért a PI3K-hoz kapcsolódó fehérjék (PIKK) családjába tartozik. Ebben a fehérjecsaládba tartozó kinázok szerkezetére jellemzőek N-terminálisan α -hélixekből álló ismétlődő szekvenciák (HEAT-repeats) és négy konzervált domén, N-től C-terminális felé haladva: FAT-domén, kináz-domén (KD), szabályozó-domén (PRD) és FAT C terminális domén (FATC). A FAT-, PRD-, és FATC-domének szabályozzák a kináz-domén aktivitását. A FAT-domén C-terminális felőli vége van a legközelebb a kináz-doménhez, itt helyezkedik el az mTOR kináz esetében az a régió, ahova a rapamycin és az FKBP12 fehérje által alkotott komplex kötődni képes. Ezt a régiót FRB-doménnek (FK506-rapamycin binding) nevezik [4] (2. Ábra).

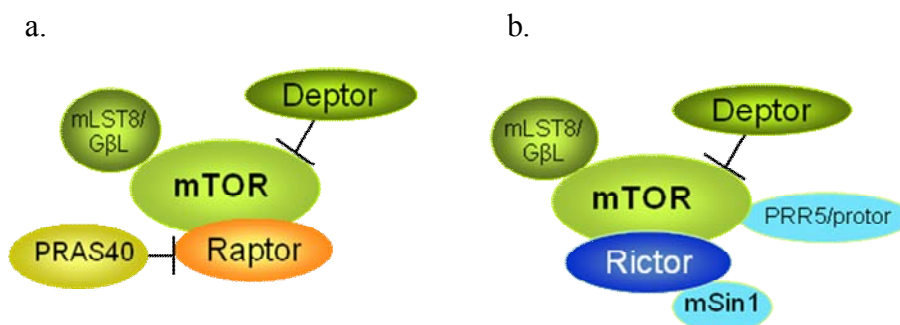


2. Ábra: Az mTOR-kináz doménszerkezete

A sematikus ábra mutatja az mTOR-kináz legfontosabb doménjeinek elhelyezkedését. Az ábra tetején az egyes domének relatív helyzetének meghatározását segítik a fehérjét alkotó aminosavmaradékok sorszámai [5].

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, Raptor, mLST8 és két negatív szabályozó fehérje, a PRAS40 (proline-rich AKT substrate of 40 kDa) és a DEPTOR (3. Ábra). Amint a PRAS40 molekulát foszforilálja az AKT, az leválik az mTORC1-ről és fokozódik a komplex aktivitása. A DEPTOR az mTOR FAT-doménjéhez kapcsolódva fejt ki gátló hatását. A Raptor (regulatory associated protein of mTOR) 150 kDa-os fehérje, funkcióját meghatározó ismétlődő szekvenciákkal N-és C-terminálisan, részt vesz az mTOR aktivitásának szabályozásában és állványfehérjeként (scaffolding protein) az mTORC1 célfehérjéinek biztosít kötőhelyet. Az mLST8 fehérje az mTOR kináz-doménjéhez kötődve elősegíti a komplex aktivitását [6].

Az mTOR-komplex 2 (mTORC2) elemei az mTOR, Rictor, mLST8, mSin1, Protor és DEPTOR fehérjék [6] (3. Ábra). Az mTORC2 egyik fontos feladata az AKT foszforilálása (Ser471), ennek szabályozását a Rictor (rapamycin insensitive companion of mTOR; 192 kDa) és mSin1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1) fehérjék végzik [7]. Az mLST8 fehérje segíti a Rictor és mTOR közötti molekuláris kapcsolat kialakulását. Emellett, mivel alkotóeleme mindkét mTOR-komplexnek, feltételezik, hogy szerepe lehet az mTOR molekulák elosztásában az mTORC1 és mTORC2 között. A DEPTOR fehérje ebben a komplexben is az aktivitás gátlásában vesz részt. A Protor molekulát – melynek két izoformája (Protor-1, Protor-2) egyaránt lehet az mTORC2 eleme - 2007-ben azonosították. A Protor a Rictoron keresztül kapcsolódik a komplexhez, az mTORC2-ben betöltött feladatát még nem ismerjük [8].



3. Ábra: mTOR komplexek [6]: mTORC1 (a), mTORC2 (b)

1.1.1. mTOR jelátviteli út

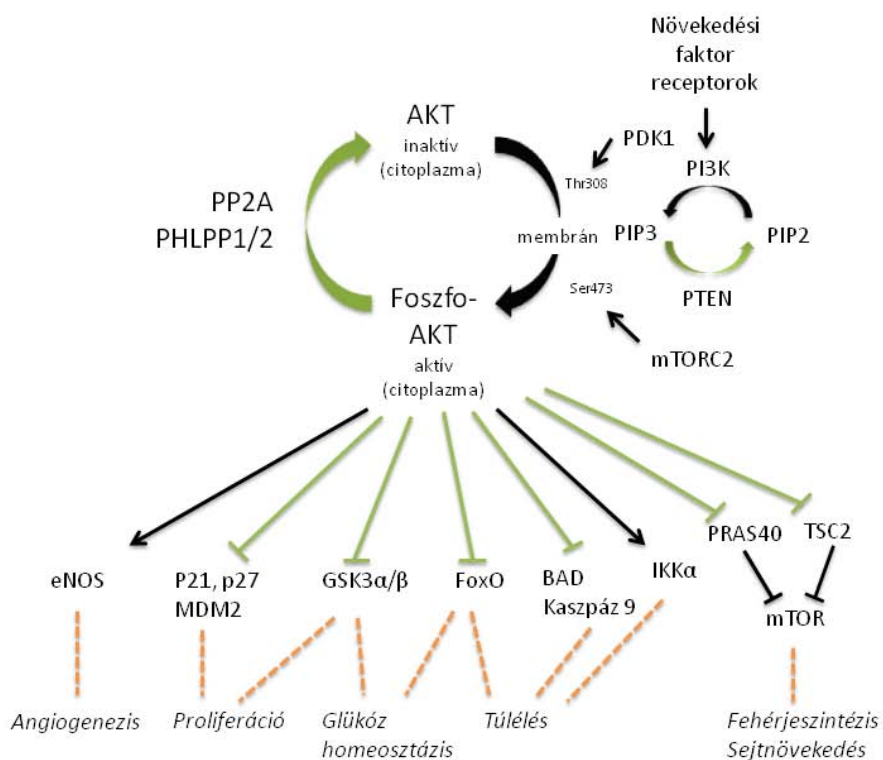
Az mTOR kináz számos, a sejtek életében fontos mechanizmusban részt vesz, a jelátviteli hálózatban központi helyzetben van, a jelutak aktiváló és inaktíváló üzenetét integrálja [9]. Befolyásolja a sejtek növekedését (proliferációját), táplálékellátását, energiahelyzetét és a stresszre adott válaszát.

A PI3K-AKT-mTOR jelutat sejtípustól függően a legkülönbözőbb tirozin kináz receptorok (TKR) aktiválhatják, mint például az inzulinszerű növekedési faktor receptor (IGF-R), az epidermális növekedési faktor receptorok (EGFR1, EGFR2/HER2, EGFR3, EGFR4) és a vaszkuláris növekedési faktor receptorok (VEGFR). Az TKR-ok fokozott expressziója a jelút megnövekedett aktivitásához vezethet. Ligandkötés hatására a receptorok az aktivációs jelet a foszfatidilinozitol-3 kináz (PI3K) felé továbbítják. A PI3K két alegységből áll, a katalitikus (p110) és a regulátor (p85) alegységből. A PI3K foszforilálja és így átalakítja a foszfatidilinozitol-biszfoszfátot (PIP2) foszfatidilinozitol-triszfoszfáttá (PIP3). A jelút regulátor fehérjéi közé tartozik a PTEN (phosphatase and tensin homolog), amely a PIP3 defoszforilációját végzi, így a rendszer „belső” gátló tényezője. A PIP3 membránközeli helyzetbe hozza a jel továbbításában fontos molekulát, a PDK1 kinázt, így az foszforilálni tudja az AKT-ot a Thr 308-as pozícióban.

Az AKT – más néven protein kináz B (PKB)- az AGC-kináz fehérjecsaldába tartozó szerin/treonin kináz. Három izoformáját ismerjük (AKT1, AKT2, AKT3), az AKT1 és AKT2 szinte az összes szövetben, az AKT3 expresszió főleg az idegszövetben található meg. Az AKT izoformák szerkezetére jellemző a PH-domén, a regulátor és a katalitikus domének. A PIP3 az AKT-tal együtt számos PH-doménnel rendelkező fehérjét vonz a membrán közelébe, ahol megtörténhetnek azok a foszforilációs lépések, amik az mTOR-út aktivációjához is szükségesek [10]. Az AKT Thr308-as foszforilációját a PDK1 kináz végzi, viszont a teljes aktiváláshoz szükség van az mTORC2 általi Ser473-as foszforilációra is. Ez szükséges ahhoz is, hogy az AKT kifejtsen gátló hatását a hamartin (TSC1) és tuberin (TSC2) által alkotott komplex (TSC-komplex) működésére (4. Ábra). A TSC-komplex negatív szabályozó, gátolja a RHEB fehérjét úgy, hogy GTP-áz aktivitásával a RHEB GTP kötött formáját inaktív, GDP

kötött formává alakítja, így a RHEB nem képes foszforilálni az mTOR-t az mTORC1-ben.

A TSC-komplex nem csak az AKT felől kap szabályozó jeleket, a sejt túlélését, homeosztázisát meghatározó események is bekapcsolhatják az mTORC1-et gátló funkcióját. A TSC-komplex gátló hatása mindaddig érvényesül, amíg a sejt energiahelyzete és táplálékellátottsága nem megfelelő, valamint külső stresszhatások érik a sejtet [11, 12].



4. Ábra: Az AKT aktivitása függ az mTORC2 aktivitástól

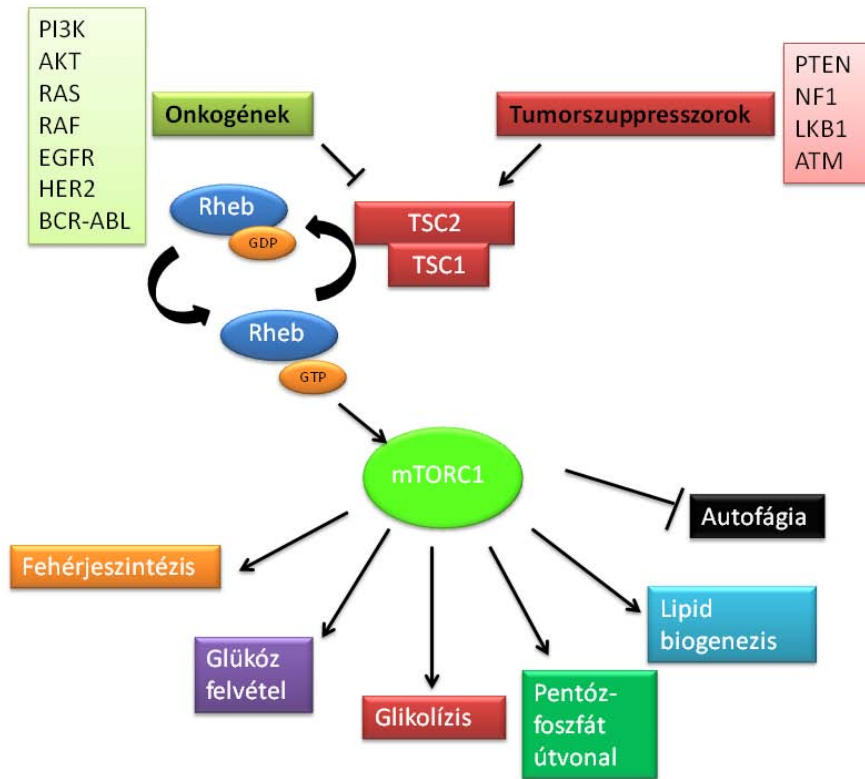
Aktív formájában az AKT az mTORC1 mellett természetesen számos fehérje működését befolyásolhatja (pl.: p21, p27, eNOS, BAD, FOXO (Forkhead transcription factor)), így támogatva a sejtek túlélését, a sejtnövekedést, a proliferációt, az angiogenezist, a migrációt és az inváziót [10].

A PI3K/AKT útvonaltól független, alternatív mTORC1-aktivitást szabályozó mechanizmusok is ismertek, mint például a WNT vagy TNF α felől érkező aktiváló stimulusok [13]. A sejt alacsony energiaszintjét érzékelő kináz, az AMPK (AMP-activated protein kinase) a TSC-komplexen keresztül, illetve a Raptoron keresztül is képes inaktiválni az mTORC1-et [12, 14, 15]. Az ERK (extracellular signal-regulated kinase) az TKR-ok felől érkező aktiváló jeleket szintén a TSC-komplexek gátlásán keresztül közvetíti az mTORC1 felé [16]. A sejtben megfelelő aminosav ellátottság mellett a RAG GTP-ázok a RHEB fehérjén keresztül aktiváló jeleket küldenek az mTORC1 felé [17] (7. Ábra).

Nem ismerjük még pontosan, hogy a növekedési faktorok és egyéb extracelluláris hírvivő anyagok (inzulin, PGE, kemoattraktánsok) hatására hogyan aktiválódik az mTORC2-ben lévő mTOR kináz. Az mTORC2 célfehérjéi közé az AKT mellett számos AGC-kináz (SGK1- serum/glucocorticoid-regulated kinase 1, protein-kináz C család tagjai) tartozik [18, 19]. Az mTORC2 az előbbieken túl befolyásolja a sejtmigráció szabályozását is. Aktiválja a RHO GTP-ázok családjába tartozó RAC fehérjét, ami lamellopódiák kialakulásához vezet [20]. Az mTORC2 az AKT-on keresztül részt vesz az aktin filamentumok kialakulásának szabályozásában, így befolyásolva a kemotaxist és a sejt polaritást, amelyek a tumorsejtek inváziójában és áttétképzésében is fontos szerepet játszanak [21, 22].

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). Az eIF4E azoknak az mRNS-eknek a transzlációját támogatja, amelyek 5' végén jellegzetes UTR (untranslated) szekvencia van („cap-dependens transzláció”) [6, 23]. Ezek az mRNS-ek főként proliferációs és túlélési szignálokat támogató molekulákat kódolnak (c-MYC, BCL-2, FGF-2 és survivin). Az eIF4E segíti bizonyos mRNS-ek útját a sejtmagból a transzláció helyére, így azok mennyisége megnő a citoplazmában és transzlációjuk fokozódik (ciklin D1, ornitin dekarboxiláz) [24]. A sejtnövekedéshez megfelelő mennyiségű tápanyagnak, energiának kell rendelkezésre állnia. Az energia homeosztázis

fenntartásában az mTOR aktivitás számos ponton meghatározó szerepet tölt be. Olyan transzkripciós faktorok translációját fokozza, amelyek egyrészt energiatermelő folyamatokat indítanak be, másrészt jelzik a sejtnak, hogy a tápanyagellátottság megfelelő a növekedési folyamatokhoz. Az SREBP1, PPAR γ transzkripciós faktorok translációjának támogatásával az mTORC1 elősegíti a lipid bioszintézist, ami a sejtnövekedéshez szükséges energiát biztosítja. Emellett az mTORC1 aktivitás befolyásolja a mitokondrium működését is, elősegíti a mitokondriumban zajló oxidatív folyamatokat, transzkripciós faktor (YY1) translációjának szabályozásán keresztül [25]. Az mTORC1 aktivitás növeli a transzkripciós faktorként működő hypoxia indukálta faktor-1 α (HIF-1 α) szintjét, ez a glükóz fokozott felvételéhez vezet a sejtekben, ami a tumorsejtekre jellemző metabolikus váltást eredményezi, amivel normoxiás körülmények között is a glikolitikus folyamatok felé tolódik el az anyagcsere [9, 26, 27]. A HIF-1 α által szabályozott gének közé tartozik például a VEGF (vaszkuláris endotheliális növekedési faktor), amelynek szintje a fokozott HIF-1 α aktiváció következtében emelkedik, ezzel elősegítve az angiogenezist. Az mTORC1 foszforilálva az autofagoszóma kialakulásához szükséges molekulákat (ATG13 és ULK1) gátolja az autofágiát, ami segíti a sejteket függetlenedni a környezeti hatásoktól, elősegítve ezzel a túlélést [28, 29] (5, 7. Ábra).

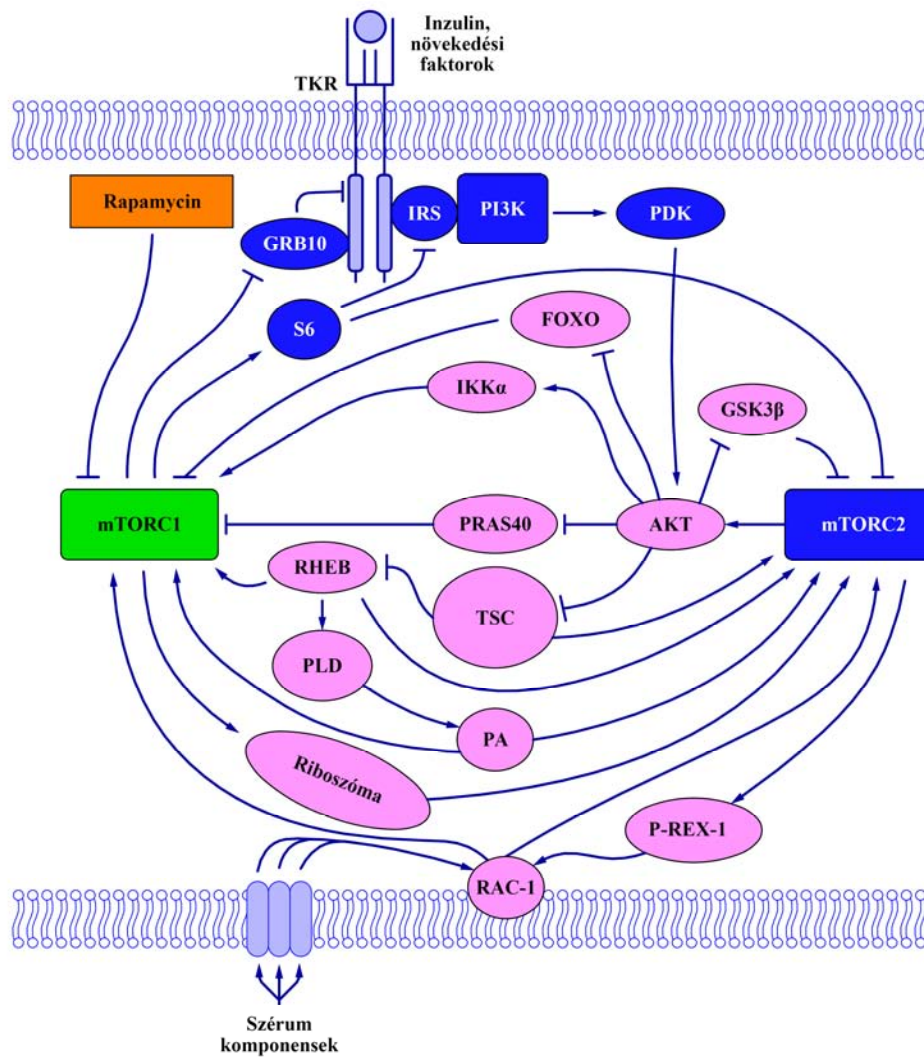


5. Ábra: Az mTORC1 által befolyásolt folyamatok

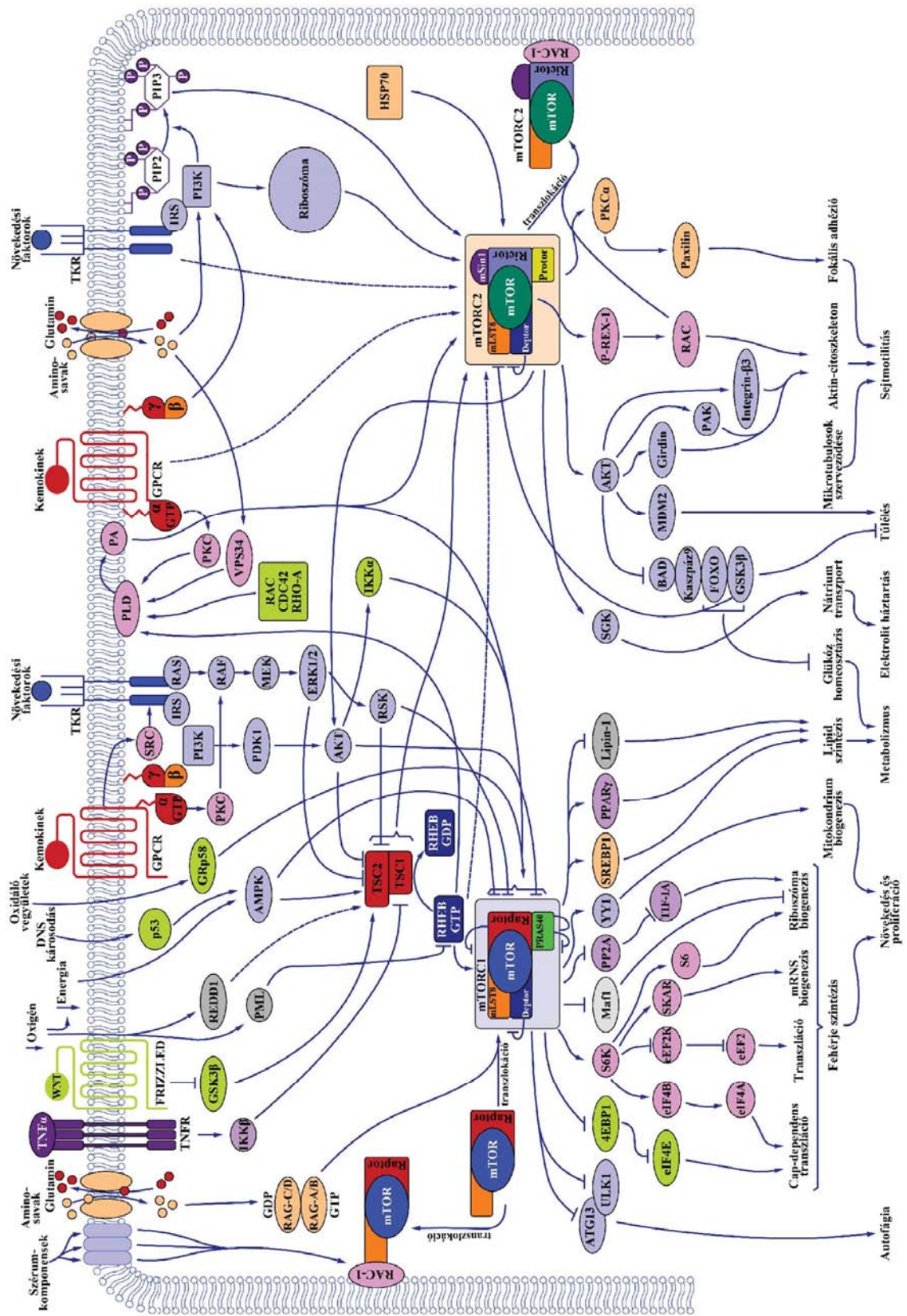
Számos onkogén megjelenése, illetve tumorszuppresszorok kiesése fokozhatja az mTOR aktivitást, amely emelkedett fehérjeszintézisben, megváltozott metabolikus aktivitásban, a túlélést támogató folyamatok erősödésében nyilvánul meg.

1.1.2. A két mTOR-komplex kapcsolata

A két mTOR-komplex egymás aktivitását kölcsönösen befolyásolja. Nem csak a korábban már említett, az mTORC2 AKT-on keresztüli mTORC1 aktiválási mechanizmusa ismert, amely során az mTORC2 által aktivált AKT gátolja az mTORC1 működését gátló PRAS40 és TSC2 molekulákat. További negatív visszacsatolási pontokat is ismerünk az mTORC1-felől, ami gátolja a PI3K aktivitását. Az mTORC1 foszforilálja a GRB10 molekulát, ami ezáltal gátolni tudja az extracelluláris jelek továbbítását, a másik gátló hatás az aktivált S6K felől érkezik, és az IRS-t (insulin receptor substrate) gátolja. Ezek a mechanizmusok megvédik a sejtet a PI3K/Akt/mTOR jelút túlműködésétől. Megfigyelések szerint a hosszútávú mTORC1-gátló rapamycin kezelés ezt a két gátló visszacsatolást megszünteti, ami az mTORC2 fokozott aktivitásához vezethet [30]. Az mTORC1 szabályozza a riboszóma biogenezist, a riboszóma pedig részt vesz az mTORC2 aktiválásában [31]. A kapcsolat kialakulása függ a PI3K-útvonal aktivitásától. Ismert továbbá, hogy mindkét mTOR-komplex aktivitásához szükséges, hogy szubsztrátjaikhoz megfelelő közel kerüljenek. A kis G-fehérjék családjába tartozó RAC-1 molekula segíti az mTOR-komplexeket membránközeli helyzetbe hozni, ahol megtörténik a célmolekulák foszforilálása. A RAC-1 membránközeli helyzetbe hozza az mTORC2-vel együtt a P-REX-1 fehérjét, ami aktiválja a RAC-1-et, ezáltal a RAC-1 a PI3K-t is membránközeli helyzetbe vonzza, így megindulhat a PIP3 szintézis és a PI3K-út aktivitása. A PIP3 tovább aktiválja a P-REX-1-et, ami pozitív visszacsatolásként erősíti a jelút aktivitását [32] (6. Ábra).



6. Ábra: A két mTOR-komplex között eddig feltárt kölcsönhatások összefoglalása
 [22] A részletes ábramagyarázat a szövegben található.



7. Ábra: Az mTOR jelutat aktiváló és az mTOR-komplexek hatása alatt álló molekulák összefoglaló ábrázolása.

Az mTOR-jelút sejtípustól függően számos irányból kaphat aktiváló jeleket, és az mTOR kináz szintén a sejtípustól és a sejt állapotától függően kapcsol be vagy gátol folyamatokat a sejtekben. Az ábrán feltüntettünk számos különböző, az mTOR-aktivitáshoz kapcsolható folyamatot, melyek közül a sejtekben mindig az adott funkciónak megfelelő folyamat aktiválódik. A két mTOR-komplex számos receptormediált és intracelluláris jelet integrál és a megfelelő sejtműködések (proliferációs, metabolikus, túlélési, migrációs folyamatok) beindításával válaszol a beérkező jelekre. Az aktiváló hatásokat nyilak (↓), a gátlást lezárt végű vonalak (⊥) jelzik [22].

1.2. mTOR szerepe a daganatokban

Az mTOR jelátviteli út a humán rosszindulatú daganatok mintegy 50%-ában konstitutívan aktív, így az mTOR aktivitása azokban meghatározó lehet. Egyre több daganatban válik ismertté az mTOR jelút elemeinek nem megfelelő működése [33, 34]. A PI3K konstitutív aktivitása megfigyelhető hematológiai daganatokban, glioblastomában, gyomor-, emlő-, vastagbél-, endometrium- és petefészekrákokban. Ennek hátterében a PI3K katalitikus alegységének, ritkábban a regulátor alegységének mutációi és a PI3K-t aktiváló fehérjék (pl. IGF1R-insulin-like growth factor receptor, EGFR, HER-2, FLT-3) funkciónyerő mutációi állhatnak [35-37]. Az útvonalban fontos szerepet játszó tumorszuppresszor gének inaktiválódhatnak szomatikus mutációkkal, deléciókkal, promóter metilációval vagy allélvesztéssel is. Ezekre jó példa a PTEN, amely az egyik leggyakrabban mutált gén a tumorsejtekben (prostatata-, endometrium-, emlő-, petefészekrák, melanoma és glioblastoma) [38]. A RHEB onkogén overexpressziója is fontos az mTOR jelút aktivitásának fokozódásában, ez lymphomákban, emlő-, és fej-nyaki daganatokban ismert. A TSC1 és TSC2 gének mutációi gyakran vezetnek benignus daganatok (hamartoma, angiofibroma, rhabdomyoma) kialakulásához és megnövelik bizonyos rosszindulatú daganatok (veserák) kialakulásának kockázatát is [36]. Az AKT1 mutációja az emlő-, vastagbél-,

tüdő-, gyomor- és petefészekrákokban jellemző [39], az AKT2 (pancreas-, petefészek-, emlő-, fej-nyak- és vastagbélrák) és az AKT3 (melanoma) mutációi [40] ritkábbak.

A daganatterápia során felmerülő gyakori probléma a tumorsejtek kezeléssel szembeni rezisztenciája, amelyben az mTOR-útnak fokozott szerepe lehet [41]. Az mTOR jelút egy fontos „menekülőútvonal” számos daganat esetében. Amikor a daganatsejtekben egy konstitutív aktivitást mutató, a daganat patogenezisében bizonyítottan szereplő fehérjét terápiásan támadnak, a tumorsejtek képesek átváltani egy másik jelútra, amely a túlélésüket biztosítja. A PI3K és PTEN mutációi állhatnak például emlődaganatok HER2-elleni terápiával szembeni rezisztenciájának hátterében [42]. Ezt bizonyítja, hogy emlődaganatokban a terápiát kiegészítve rapamycin származékokkal vissza tudták állítani a daganatsejtek érzékenységét a kezelőszerekkel szemben [43].

1.2.1. mTOR aktivitás hematológiai daganatokban

Bizonyos hematológiai daganatokban (leukemiák, lymphomák, myelomák) már kimutattak olyan genetikai változásokat, amelyek a PI3K/AKT/mTOR út fokozott aktivitásának hátterében állnak [44]. A myeloid sejtalakok kóros proliferációja jellemzi az akut myeloid leukémiát (AML). A legtöbb esetben az AML-ás betegekben magas az mTOR aktivitás, amelynek hátterében különböző TKR-ok (FLT-3, c-KIT az esetek 35-40 %-ában) [45] és az N-RAS vagy a K-RAS (20-30%) mutációját írták le [46, 47]. Krónikus myeloid leukémiában (CML) és prekursor B-sejtes lymphoid leukémiában (B-ALL) a Philadelphia kromoszóma transzlokációt hordozó esetekben megjelenő BCR-ABL fúziós fehérje tirozin kináz aktivitása az mTOR jelút aktiválásához is vezet [48, 49]. T-sejtes leukémiákban a Notch1 aktivitást támadó kezelésekkel szembeni rezisztencia hátterében szintén fokozott mTOR működést feltételeznek [50]. Myeloma multiplexben az AKT fokozott aktivitását írták le, amely felhívja a figyelmet az mTOR-gátlás lehetőségére ebben a hematológiai malignitásban is [51]. A diffúz nagy B-sejtes lymphoma (DLBCL) olyan érett B-sejtes daganat, amely nagy mennyiségben expresszál B-sejt receptort (BCR), a BCR útvonal aktivitása pedig érinti a PI3K-t és az NFκB-t is [52].

Bár az mTOR jelút szerepét bizonyos hematológiai daganatokban már alátámasztották, még mindig kevés adat áll rendelkezésünkre számos lymphoma és leukemia esetében az mTOR aktivitásáról. Mindennek ellenére klinikai vizsgálatokban előrehaladott stádiumú betegeknél egyre sikeresebben használnak mTOR-gátlókat.

Köpenysejtes lymphomák (MCL) patogenezisében fontos szerepet játszik a ciklin D1 overexpresszió, ami a CCND1 és IgH gének transzlokációjának eredménye. A ciklin D1 expresszióra a cap-dependens transláció szabályai vonatkoznak, amely mTOR-aktivitás függő folyamat [53, 54]. MCL-ban az mTOR ciklin D1 expressziót, sejtnövekedést és a translációs aktivitást szabályozó hatása kísérletes molekuláris vizsgálatokkal bizonyítást nyert. Ezt követően az mTOR-gátlók (rapalógok) terápiás bevezetése napjainkban jelentős eredményeket hozott a rossz prognózisú MCL-ák kezelésében [55].

AML-ás betegekben a PI3K/Akt/mTOR jelút magas aktivitása befolyásolja a tumorsejtek túlélését és proliferációját, valamint a kemoterápiával szembeni rezisztencia kialakulásának hátterében is állhat. Preklinikai és klinikai fázisvizsgálatokban igazolták, hogy az mTOR-gátlás a konvencionális kemoterápiás kezeléssel együtt alkalmazva hatékonyabb terápiát jelenthet az AML-ás betegek számára [56].

Mivel lymphomák és leukemiák esetében nem egyszer felmerült az mTOR gátlók alkalmazása, ezért nagy szükség van a különböző lymphomák és leukemiák mTOR aktivitásának és mTOR gátlókkal szembeni érzékenységének vizsgálatára. Hodgkin lymphomákban és DLBCL-ban eddig nem történt nagy esetszámú, mTOR aktivitás meghatározására irányuló vizsgálat.

1.3. Célzott terápia

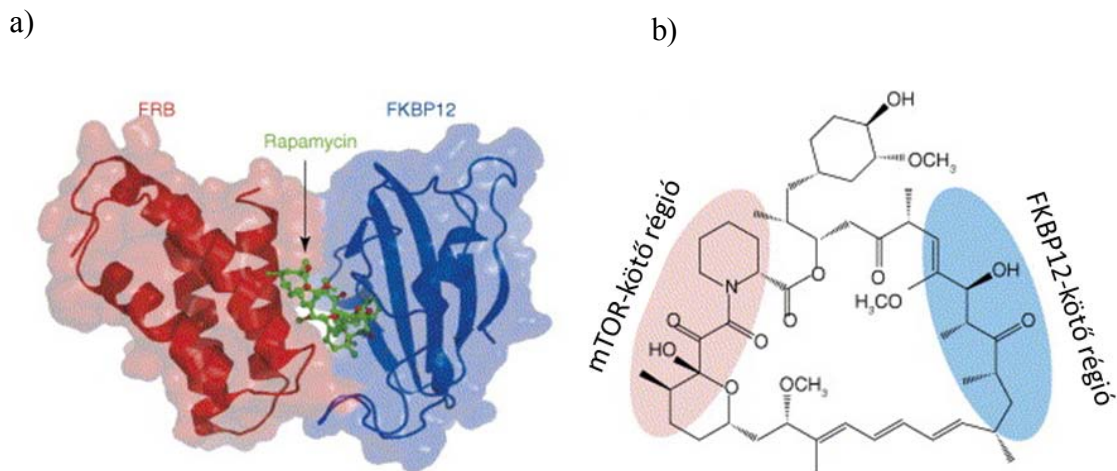
A tumorsejtekben a célzott terápia olyan génhibák és szabályozási zavarok következtében fokozott fehérjeexpresszió és aktivitás gátlásán alapul, amelyek támogatják a daganatsejtek proliferációját és/vagy túlélését. A célzott terápia során főleg növekedési faktor receptorokat, tirozin kináz receptorokat és jelátviteli útjaik komponenseit támadjuk főként monoklonális antitestekkel, illetve kis molekulású

gátlókkal. A kis molekulású gátlók közé tartoznak a proteaszóma gátlók, az antiapoptotikus fehérjéket gátló molekulák és a hiszton deacetiláz gátlók és a legnagyobb csoportot jelentő különböző kináz gátlók, a tirozinkináz gátlók, a ciklinfüggő kináz gátlók és köztük az mTOR gátlók [57].

1.3.1. Klasszikus mTOR gátlók

A klasszikus mTOR-gátlók közé tartozik a rapamycin (rapamune) és származékai, a rapalógok. A rapamycin a *Streptomyces hygroscopicus* által termelt makrolid antibiotikum, amit 1965-ben egy talajmintából izoláltak a Húsvét-szigeteken [58]. Eredetileg antifungális szerként használták, csak a későbbiekben ismerték fel immunosuppresszív hatását [59]. A szer rossz vízoldékonysága és kémiai instabilitása azonban korlátozta a klinikai alkalmazhatóságát, ezért számos új, kedvezőbb farmakológiai tulajdonsággal rendelkező analógot fejlesztettek ki. Jelenleg a temsirolimus, az everolimus és a deforolimus a terápiás felhasználásra alkalmas rapalógok. A rapalógok gátolják a B- és T-sejtek proliferációját, immunosuppresszió kapcsán például szervtranszplantációban, és a daganatterápiában használhatóak. Emellett hatékonyak a krónikus allergiás gyulladás gátlásában is, illetve alkalmazzák őket gyógyszerkibocsájtó sztentek alkotórészeként a koronária intervenciót követő resztenózis megelőzésére.

A rapamycin és a rapalógok az mTOR aktivitását gátolva megakadályozzák a sejtek növekedését, a sejtciklus előrehaladását és a proliferációt. A gátlás fokozza a CDK2, p27^{KIP1} szintjét, így a sejtciklus megáll a G1/S fázis határán. A klasszikus mTOR-gátlók egy intracelluláris fehérjéhez, az FKBP12-höz (FK506 binding protein 12) kötődnek, így létrejön egy gyógyszer-receptor komplex, ami az mTOR-on az FRB-doménhez kötődve allosztérikus gátló hatást fejt ki [49] (8. Ábra). A pontos hatásmechanizmus nem teljesen tisztázott, feltételezhető, hogy megakadályozzák a Raptor és az mTOR közötti interakciót, ezáltal megszakítják a kapcsolatot az mTORC1 és szubsztrátjai között, mindezt anélkül, hogy befolyásolnák az mTOR kináz foszforilációs állapotát, tehát csak részleges gátlást hoznak létre [58].



8. Ábra: Az mTOR-kináz szerkezete és a rapamycin-FKBP12 komplex

a: A rapamycin-FKBP12 komplex és az mTOR kináz kapcsolódása háromdimenziós szerkezeti modellen. b: A rapamycin molekula kötőhelyeinek ábrázolása sematikus molekulaszervezeti rajzon [5].

Az mTORC2 és a rapalógok viszonya vitatott kérdés: eddigi ismereteink szerint az mTORC2-ben jelen lévő mTOR relatíve rezisztens a rapamycinnel szemben *in vitro*. A rapalógok elsősorban az mTORC1-et gátolják, míg az mTORC2 működését nem befolyásolják. A Rictort tartalmazó komplex megtartott aktivitása az mTOR inhibitorokkal szembeni rezisztencia egyik fő oka lehet. Bizonyos vizsgálatok szerint azonban az elhúzódozó rapamycin-kezelés számos sejttípusban képes gátolni az mTORC2 összeszerelődését is, így aktivitását olyan mértékűre csökkentheti, amely már nem elégséges az AKT/mTOR útvonal működésének fenntartásához. Ez azonban sokkal nagyobb rapamycin-koncentrációt igényel, mint az mTORC1 gátlása [60].

1.3.1.1. Temsirolimus (CCI-779)

A temsirolimus a rapamycin dihidroxi-metil-propionsav észtere, az 1990-es években elsőként előállított rapalóg, mely a rapamycinnél sokkal gyengébb immunszuppresszor, viszont kifejezettebb antiproliferatív és tumorelles hatással rendelkezik. Jó vízoldékonyságának köszönhetően mind orálisan, mind pedig parenterálisan adható. Fázisvizsgálatokban toxikus hatások közül a mucositis,

stomatitis, depresszió, thrombocytopenia és a hyperlipidemia fordultak elő leggyakrabban. [55]. A temsirolimust 2007-ben vezették be a klinikai gyakorlatba előrehaladott veserákban szenvedő betegek, 2008-ban felnőtt előrehaladott/kiújuló köpenysejtes lymphomás betegek kezelésére [58].

1.3.1.2. Everolimus (RAD001)

Az everolimus a rapamycinhez képest egy C-40-es pozícióban O-(2-hidroxietyl)-szubsztituált, orálisan aktív rapalóg. Kifejlesztésének célja a farmakológiai tulajdonságok, különösen az orális biológiai hasznosulás javítása volt. A rapamycinnél jobb farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkezik: rövidebb felezési idő (60 óra helyett 30 óra), jobb biológiai aktivitás jellemzi [61]. Fázisvizsgálatokban a leggyakoribb, de többnyire enyhe fokú mellékhatások a stomatitis, bőrpír és gyengeség voltak. Ritkább, de súlyosabb mellékhatásként az everolimus pneumonitist okozott [62]. Az everolimust 2009 óta alkalmazzák olyan előrehaladott veserákban szenvedő betegek másodvonalbeli kezelésében, akiknél a betegség VEGF-gátló kezelés mellett vagy azt követően kiújult. A veserák mellett más daganatok kezelésében is alkalmazzák. Adása 2010 óta javasolt sclerosis tuberosa talaján kialakult subependymális óriássejtes astrocytomában, ahol sebészi eltávolítás nem lehetséges. 2011 óta alkalmazzák olyan progresszív, pancreas eredetű neuroendokrin tumoros felnőtteknél, akiknek a betegsége inoperábilis vagy metasztatikus, jól vagy közepesen differenciált [58, 63].

1.3.1.3. Deforolimus (AP23573)

A deforolimus a rapamycin foszfortartalmú analógja, mely elődjénél jóval kedvezőbb farmakológiai tulajdonságokkal rendelkezik, beleértve a vízdékonyságot, kémiai stabilitást és biológiai hasznosulást is. Klinikai vizsgálatok során a deforolimus több előrehaladott stádiumú daganattípusban (mullerian sarcoma, GIST, Ewing sarcoma, veserák, lymphoma, nem-kissejtes tüdőrák és endometrium rák) daganatellenes hatást és jó tolerálhatóságot mutatott mind orálisan, mind pedig intravénásan adva. A leggyakoribb mellékhatások a stomatitis, mucosistis, kiütés, gyengeség és az anorexia voltak [64]. A klinikai gyakorlatban még nem törzskönyvezték daganatos betegség kezelésére.

1.3.2. mTOR aktivitás gátlása a hematológiai daganatokban

Az MCL terápiájában elért eredmények hatására a non-Hodgkin lymphomák (NHL) további típusain is megindult az mTOR-gátló kezelések tesztelése [55, 65]. Fázis II vizsgálatban értékelték a temsirolimus hatását DLBCL, follikuláris lymphoma (FL), krónikus lymphoid leukemia (CLL) és más indolens lymphomák progressziójára. Ebben a fázisvizsgálatban a DLBCL és a FL betegek progressziómentes túlélését szignifikánsan növelte a temsirolimus kezelés [66].

A rapalógok és a klasszikus kemoterápiás szerek, illetve célzott daganatellenes molekulák együttes alkalmazása preklinikai eredmények szerint szinergista hatást eredményezhet. Napjainkban számos I. és II. fázisú klinikai vizsgálat irányul a megfelelő kombinációs kezelések kifejlesztésére [54]. Kiújuló NHL-ben vizsgálják temsirolimus és bortezumib; temsirolimus és lenalidomide együttes hatását; everolimus és panobinostat kombinációját [54, 67]. Fázis II vizsgálatokban az everolimus és deforolimus hematológiai betegségekben szenvedő (kiújult AML, mielodiszpláziás szindróma (MDS), CML, ALL, CLL, T-sejtes leukemia/lymphoma, MCL) betegeknél antitumor aktivitást mutatott, emellett jól tolerálható volt [68] (1. Táblázat).

1. Táblázat: Hematológiai betegségekben rapalógokkal végzett klinikai vizsgálatok összefoglalása

n: vizsgálatban szereplő betegek száma, F: fázisvizsgálat, PR: részleges remisszió, RR: terápiás válasz, CR, teljes remisszió, NHL: non-Hodgkin lymphoma, HL: Hodgkin lymphoma, CLL: krónikus lymphoid leukemia, MCL: köpenysejtes lymphoma, DLBCL: diffúz nagy B-sejtes lymphoma, FL: folliculáris lymphoma [53, 62]

<i>Betegség</i>	<i>Rapalóg</i>	<i>n</i>	<i>Terápiás válasz</i>	<i>F</i>	<i>Referencia</i>
Kiújult hematológiai betegségek	everolimus	27	mérsékelt antitumor aktivitás	I/II	Yee, K. W et al 2006 [69]
Előrehaladott CLL	everolimus	7	mérsékelt antitumor aktivitás	II	Decker, T. et al, 2009 [70]
Kiújult NHL	everolimus	13	4 PR	I/II	Tobinai, K., 2010 [71]
Kiújult HL	everolimus	19	1 CR,8 PR	II	Johnston, P. B. et al, 2010 [72]
Kiújult Waldenström macroglob.	everolimus	50	21 PR	II	Ghobrial, I. M. et al, 2010 [73]
Kiújult NHL és HL	everolimus	77	20 PR,	II	Witzig, T. E. et al, 2011 [74]
MCL	temsirolimus	34	38 % RR	II	Witzig et al, 2005 [75]
DLBCL	temsirolimus	32	28,1% RR	II	Smith et al, 2010 [66]
FL	temsirolimus	39	53,8% RR	II	Smith et al, 2010 [66]

1.3.3. Új generációs mTOR-gátlók

Az mTORC1 gátló hatású kezelések klinikai alkalmazásának határt szab, hogy az mTORC1 gátlása miatt leáll az S6K felől érkező negatív visszacsatolás, ami az AKT és számos antiapoptotikus mechanizmus fokozott aktivitásához vezet [76]. A rapalógok mellett napjainkban ezért egyre több PI3K/mTOR, illetve AKT/mTOR gátlók fejlesztése és preklinikai vizsgálata folyik. Ezeknek a molekuláknak nincsen szükségük az FKBP12-höz hasonló citoplazmatikus receptorra, hanem közvetlenül a PI3K, AKT, illetve mTOR katalitikus régiójához képesek kötődni, így gátolva az mTOR mindkét komplexének aktivitását. Ezzel kiküszöbölhető az emlődaganatokban is megfigyelt rapalóg kezelést kísérő AKT aktiváció is. A napjainkban fejlesztés alatt álló PI3K/mTOR gátlók olyan molekulák, amelyek tisztán a PI3K-t támadják (XL147), vagy kettős gátlóként a PI3K-t és a két mTOR komplexet (NVP-BEZ235, XL765), a két mTOR komplexet (OSI-027, AZD-8055, INK-128, PP-242), vagy az AKT-ot és a két mTOR komplexet együtt [34, 58, 77].

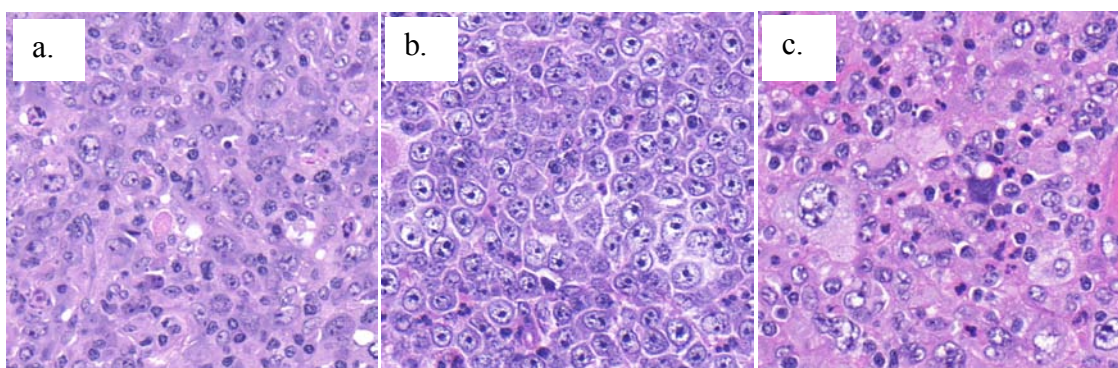
Hematológiai malignitásokban preklinikai vizsgálatok szerint az új generációs mTOR-gátlókkal végzett kezelések a klasszikus mTOR-gátlóknál hatásosabbak [19, 77-79]. Fázis I és II vizsgálatokban szolid daganatokkal és hematológiai malignitásokkal szemben is mutattak antitumor aktivitást az új generációs mTOR-gátló kezelések monoterápiában és kombinációban [22, 58, 80, 81].

1.4. DLBCL és Hodgkin lymphoma jellemzése

1.4.1. Diffúz nagy B-sejtes lymphoma

A non-Hodgkin lymphomák 30-40%-át alkotják a diffúz nagy-B sejtes lymphomák (DLBCL), melyekre jellemző a biológiai heterogenitás. Olyan lymphomák tartoznak ebbe a csoportba, amelyek kifejezett malignitásúak, agresszív növekedésűek és emellett érett, nagy tumorsejtek diffúz proliferációját mutatják. A DLBCL-ák átlagosan 60 év felett jelentkeznek, hazánkban 150-200 új esetet diagnosztizálnak évente. Leggyakrabban a nyirokcsomókat érintik, de előfordulnak extranodális szövetekben is (pl.: gastrointestinalis tractusban és az agyban). A DLBCL agresszív daganat, kezelés nélkül rövid időn belül fatális kimenetelű, a jelenlegi kemoterápiás kezelés mellett azonban az esetek 60-80%-ában érhető el teljes remisszió, az 5-10 éves túlélés 50-70% [82, 83].

A DLBCL heterogenitását jól mutatja, hogy számos variáns és altípus létezik. A WHO (World Health Organization) klasszifikációja alapján több DLBCL altípus külön entitást képez (pl.: T-sejt és hisztiocita gazdag DLBCL, primer idegrendszeri DLBCL, primer cután DLBCL, primer mediasztinális DLBCL, intravaszkuláris DLBCL). A WHO által külön entitásként nem meghatározott egyéb variánsok a DLBCL, NOS (not otherwise specified) csoportba tartoznak. A három leggyakoribb morfológiai variáns a centroblasztos, az immunoblasztos és az anaplasztikus forma [83].

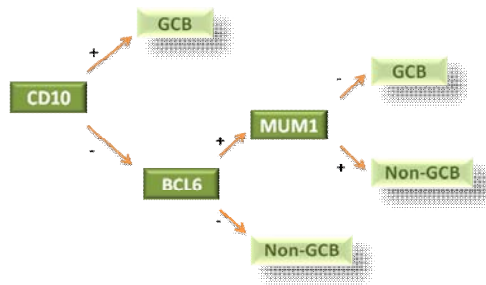


9. Ábra: DLBCL morfológiai variánsai

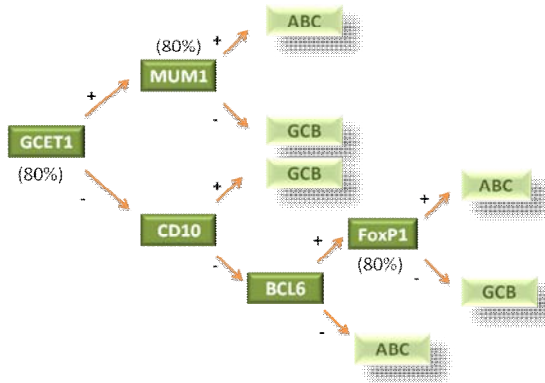
centroblasztos (a), immunoblasztos (b) és anaplasztikus variáns (c) (HE, 400x).

A betegség prognózisának meghatározása nem csak morfológiai, hanem fehérje és génexpressziós vizsgálatokon is alapul. A tumorsejtek B-sejt-asszociált antigéneket expresszálnak (CD19, CD20, CD22, CD79a). Többféle génexpressziós vizsgálatot végeztek a DLBCL-ák molekuláris csoportosítására. A legtöbbször hivatkozott módszer szerint a DLBCL-ák génexpressziós profiljuk alapján két csoportra oszthatók [84, 85]. Az egyik kategória expressziós profilja a csíráközpont sejtjeihez (GC), a másiké a perifériás aktivált B-sejtek (ABC) profiljához hasonlít. Az ABC-DLBCL csoportra jellemző a 3q, 18q21-q22 funkciónyerő és a 6q21-q22 funkcióvesztéssel járó mutációja, a GC-DLBCL esetekben gyakori a 12q12 funkciónyerő mutációja, emellett jellemző még a BCL-2 átrendeződés is. (Alizadeh et al 2000). A betegség kimenetelében is különbözik ez a két csoport, a GC-DLBCL esetek klinikai prognózisa kedvezőbb. A DLBCL-ás betegek vizsgálata során a microarray vizsgálatoknál könnyebben kivitelezhető, de azokkal jól korreláló immunhisztokémiai algoritmusokat használnak (10. ábra). Ezekben a vizsgálatokban CD10, BCL-6, MUM1, GCET1, FOXP1 és LMO2 kimutatásával meghatározzák a sejtek eredetét, amiről a betegek túlélési esélyeire is következtetni lehet. Az immunhisztokémiai vizsgálatokkal GC eredetű és non-GC/ABC-DLBCL-kat különítenek el [85].

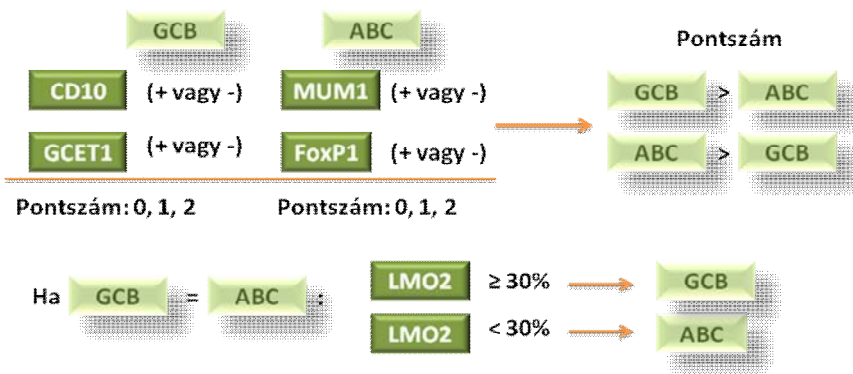
Hans



Choi



Tally /+ = 1; - = 0/



10. Ábra: A DLBCL osztályozásához alkalmazott immunhisztokémiai algoritmusok

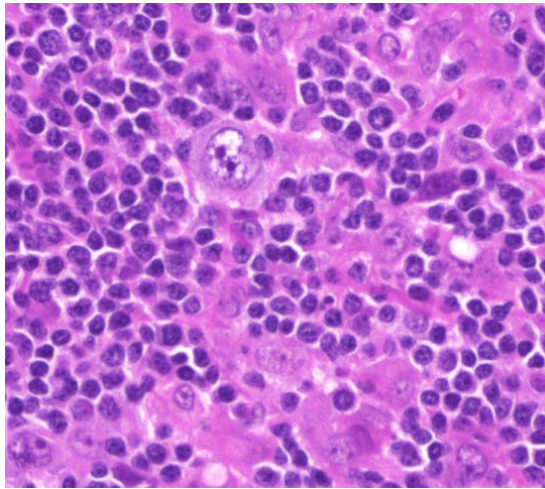
(Hans-, Choi-, és Tally-féle algoritmusok) [85]

1.4.2. Hodgkin lymphoma

A Hodgkin lymphoma (HL) monoklonális, B-sejt eredetű daganatos megbetegedés, gyakran fiatalokat érint (11. Ábra). A HL két entitást foglal magába, a betegség 4-5%-át adó noduláris lymphocytá predománns HL-t (NLPHL) és a klasszikus HL-t. Az NLPHL főként a nyaki, az axilláris és az inguinális nyirokcsomókat érinti, lassú progresszió jellemzi, a betegek 10 éves túlélése meghaladja a 80%-ot. A klasszikus HL-ban szenvedő betegek többsége fiatal felnőtt, hazánkban évente 200-250 új esetet diagnosztizálnak. Az esetek 60-80%-ában nyaki vagy supraclavicularis nyirokcsomók érintettek, illetve mediastinalis-hilaris nyirokcsomó-megnagyobbodás figyelhető meg a betegeknél. 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 és lymphomák), ezért szükség van a magas gyógyulási arány megtartásával együtt kevésbé genotoxikus terápiás módszerek kifejlesztésére [86, 87].

A HL szövettani jellegzetessége, hogy a tumorsejtek száma alacsony, a tumorsejtek között lévő reaktív lymphoid és hystiocyter elemek dominálnak. A klasszikus HL-át további altípusokra osztják a mikrokörnyezet különbségei és a daganatsejtek morfológiája alapján: nodular sclerosis, lymphocytá gazdag, lymphocytá depléciós és kevertsejtes altípusokra. A klasszikus HL tumorsejtjei a többmagvú Sternberg-Reed-sejtek és azok variánsai (tükörképsejt, lakunáris-sejt és Hodgkin-sejt). A tumorsejtek CD30 és az esetek 70-80%-ában CD15 pozitívak. A klasszikus HL-ek között a nodular sclerosis altípus dominál, ezt követi a kevertsejtes típus [88].

Az NLPHL-t noduláris növekedési mintázat jellemzi, az atípusos sejteket L&H (lymphocytá és hystiocytá) sejteknek nevezik, ezek a Sternberg-Reed-sejtek variánsai. Ezek a tumorsejtek klonális Ig-gén-átrendeződést hordoznak és CD20 pozitívak [86-88]



11. Ábra: Hodgkin lymphoma szövettani képe

Túlnyomórészt kis lymphocyták alkotta háttérben atípusos nagy sejt (Hodgkin-sejt) látható (HE, 400x).

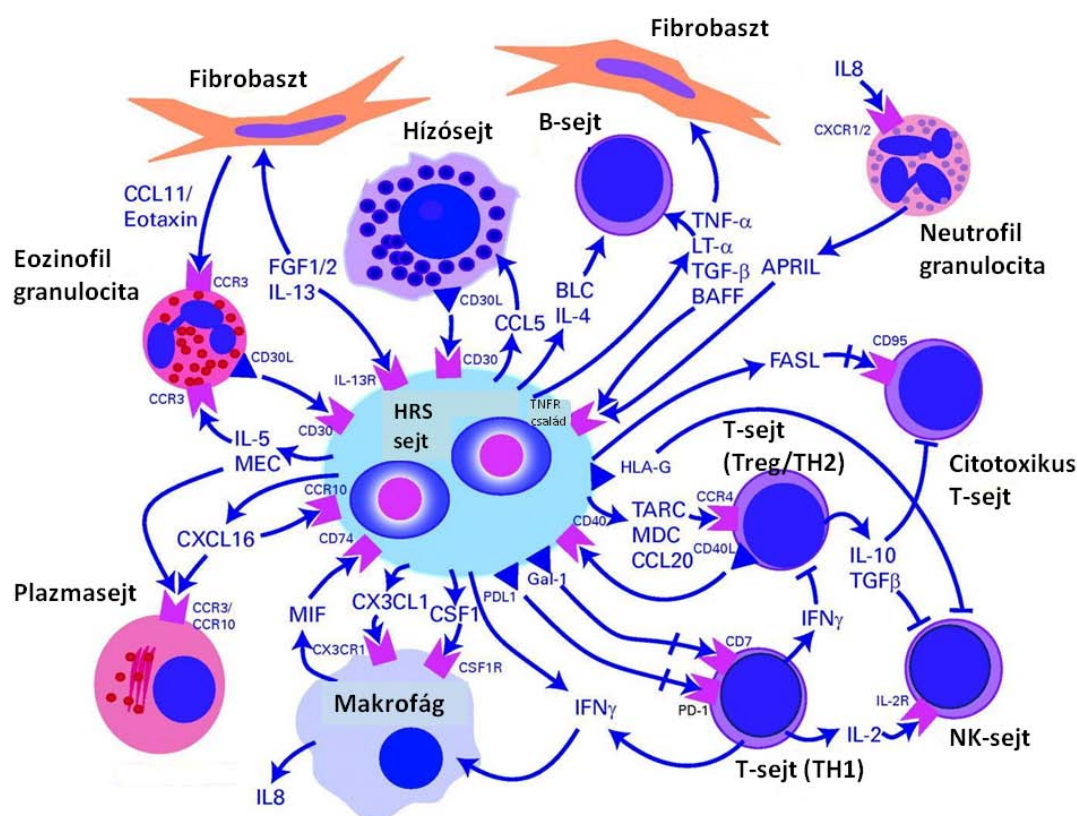
2. Táblázat: A Hodgkin lymphomák Cotswolds-féle klinikai stádiumbeosztása

Az egyes stádiumok további A és B kategóriákba sorolhatók annak alapján, hogy társulnak-e szisztémás tünetek (láz, éjszakai izzadás, 10%-nál nagyobb, hirtelen súlyvesztés) a betegséghez (B) vagy hiányoznak (A) [86].

Stádium	A betegség kiterjedése
I.	Egy régióban nyirokcsomó vagy extralimfatikus szerv érintett
II.	Két vagy több nyirokcsomó-régió érintett a rekesz alatt vagy fölött
III.	Több nyirokcsomó-régió érintett a rekesz alatt és fölött
IV.	Több extralimfatikus szerv vagy szövet érintett nyirokcsomókkal vagy nélkülük

1.4.3. Hodgkin lymphomák mikrokörnyezete

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 sejttypus ebben a mikrokörnyezetben a 2-es típusú helper T-sejt (TH-2) és a regulátor T-sejt (Treg) [89]. A HRS-sejtek specifikus kemokinek termelésével (CCL5, CCL17 és CCL22) vonzzák maguk köré ezeket a CD4⁺-T-sejt formákat [90, 91]. A naiv CD4⁺ T-sejtek Treg irányú differenciációját pedig interleukin-7 (IL-7) szekréciónal segítik elő. A reaktív környezet elemei a makrofágok, melyek a HRS-sejtek és TH-1 sejtek által termelt interferon- γ hatására vándorolnak a tumorsejtek közelébe. A makrofágok a tumor progressziója során támogatják a migrációt és gátolják a tumor elleni immunreakciókat. A HRS-sejtek IL-13 és tumor nekrozis faktor- α (TNF α) szekréciónal révén a fibroblasztok proliferációját és aktivációját támogatják [92]. A fibroblasztok eotaxint (CCL11) termelnek, ami még több TH-2 sejtet és eozinofil granulocitákat vonz a mikrokörnyezetbe. Az eozinofil granulociták toborzásában részt vesznek a HRS-sejtek is IL-5 és CCL28 expresszióval, emellett plazmasejtek infiltrációját is elősegítik CCL28 és CXCL16 termelésükkel [93]. Az immunreakció elkerülése céljából a HRS-sejtek IL-10-et és transzformáló növekedési faktor- β -t (TGF β) termelnek, melyekkel gátolják a citotoxikus T-sejtek effektor funkcióit [94, 95]. A HRS-sejtek felszínükön FAS-ligandot (CD95L) expresszálnak, amely a citotoxikus T-sejteken apoptózist indukál [96, 97]. A felszínükön megjelenő PD-1 molekula (programozott sejthalál-1) segítségével szintén csökkentik a nemkívánatos T-sejtek mennyiségét. A HRS-sejtek elvesztik HLA1 és 2 molekuláikat a felszínükről, így csökken az immunogenitásuk, ami szintén rontja az immunrendszer hatékonyságát velük szemben [98] (12. Ábra).



12. Ábra: A tumort infiltráló sejtek sematikus ábrázolása Hodgkin lymphomában [98]

1.5. Regulátor T-sejtek szerepe a daganat mikro környezetében

A regulátor T-sejtekre (Treg) $CD4^+$, $CD25^+$ immunfenotípus és magas FOXP3 (forkhead transkripció faktor/Scurfin) transzkripció faktor expresszió jellemző [99]. Ez a magas FOXP3 expresszió alkalmas a Treg sejtek kimutatására [100]. A Treg-sejtek képesek gátolni az IL-2 termelést és elősegíteni a CD25 expressziót, így lassítva vagy gátolva a $CD8^+$ és NK-sejtek (természetes ölősejtek) aktiválódását [101]. A regulátor T-sejteknek jelentős szerepe van egészséges embereknél és nem daganatos betegeknél. A Treg sejtek megfelelő működése nagyon fontos a T-sejtes immunválasz visszaszorításában; a szervezet számára az anya és a magzat között létrejövő immuntolerancia kialakításában, a transzplantáció során fellépő kilökődési reakció gátlásában és a patogénekkal szembeni túlzott immunreakció megakadályozásában. Ez a

nélkülözhetetlen fiziológiai funkció azonban gátat szabhat a daganatellenes immunválasz kialakulásának és a mikrobiális fertőzések leküzdésének is, teret engedve a neopláziás folyamatoknak.

A Treg infiltráció vizsgálata különböző tumorok mikro környezetében számos daganat esetében mutatott ki megnövekedett Treg mennyiséget a normál szövetekhez képest. Bizonyos daganatokban ez hozzájárul a tumor progressiójához. A karcinómák többségében a megnövekedett Treg mennyiség rossz prognózist jelez, nem meglepő módon a tumorsejtek elleni immunválasz csökkentésével. Ezt a hatást megfigyelték már emlőrák, petefészekrák, nem-kissejtes tüdőrák, májrák, veserák, hasnyálmirigyrák, gyomorrák és méhnyakrák esetében [102-104].

Más kutatások eredményei alapján vannak olyan magas Treg értéket mutató daganatok, amelyeknél a betegek hosszabb túlélését jelzik a Treg sejtek [105]. Vastagbélrákos betegeknél pozitív prognosztikus faktorként értékelik a növekedett Treg sejt mennyiséget. Az eddigiekkel ellentétes hatást azzal magyarázhatjuk, hogy ebben a daganattípusban a tumorprogresszió fontos eleme a gyulladós környezet. Ezt a tumort infiltráló Treg sejtek negatívan befolyásolhatják gátolva ezzel a daganatnövekedést támogató mikro környezet kialakulását.

1.6. Galektinek, galektin-1

A galektinek családjába tartozó fehérjék evolúciósan erősen konzervált molekulák, melyek a szervezet számos működését befolyásolják. Jelenleg 15 féle galektint ismerünk, ezek számos sejt típusban és szövetben megtalálhatóak. A sejt felszínen megjelenő glikoproteinek és glikolipidek szénhidrátláncainak felismerésén keresztül, azokhoz hozzákötődve intracelluláris jelátviteli utak bekapcsolására képesek, ezáltal befolyásolva a sejtek differenciálódását, a proliferációt, a túlélést és a migrációt. Ezek a sejt funkciók alapvető fontosságúak a különböző biológiai folyamatokban mint például az embriogenezisben, angiogenezisben, neurogenezisben, az immunrendszer működésében és a bennük keletkező hibák következtében a daganatkeletkezésben is.

A galektinek a glikolipidek és glikoproteinek szénhidrátláncában az N-acetilaktózamin egységeket ismerik fel CRD-doménjük segítségével. Ez a CRD (carbohydrate-recognition domain) régió egy 130 aminosavból álló erősen konzervált szekvencia. A galektinek „prototípus”-nak nevezett alcsaládjába tartozó galektin-1,-2,-5,-7,-10,-11,-13,-14, és-15 egyetlen CRD-domént tartalmaz. A „tandem-repeat” alcsalád tagjai azok a galektinek, amelyek két CRD-doménnel rendelkeznek (galektin-4,-6,-8,-9, és-12). A galektin-3 egyedül alkotja a „kiméra-típusú” alcsaládot, benne a CRD-doménhez prolin,-és glicingazdag régió kapcsolódik. A galektinekre jellemző, hogy oligomerizálódni képesek, ami lehetővé teszi, hogy aktívan befolyásolják a jelutak működését, illetve elősegítsék a sejtek közötti kommunikációt [106].

A galektinek molekulafelépítésük alapján citoplazmatikus molekulák, de megjelenhetnek a sejtmagban is, valamint a sejt felszínen és az extracelluláris térben, ezért képesek számos biológiai folyamat szabályozásában résztvenni. Receptoruk lehet számos sejt felszíni glikoreceptor, mint a CD45, CD43, CD7, TCR, GM1, különböző integrinek ($\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ és $\alpha 4\beta 7$), BCR és neuropilin-1. A sejt felszíni molekulák közti interakció kialakításával képesek szabályozni például az immunsejtek aktivációs állapotát, citokintermelését és apoptózisát. Eddig még részletesen nem tisztázott módon képesek modulálni citoplazmatikusan a pre-messenger RNS-ek splicing folyamatát, a sejt ciklust és a sejtek túlélését [107, 108].

1.6.1. A galektinek normál szövetekben

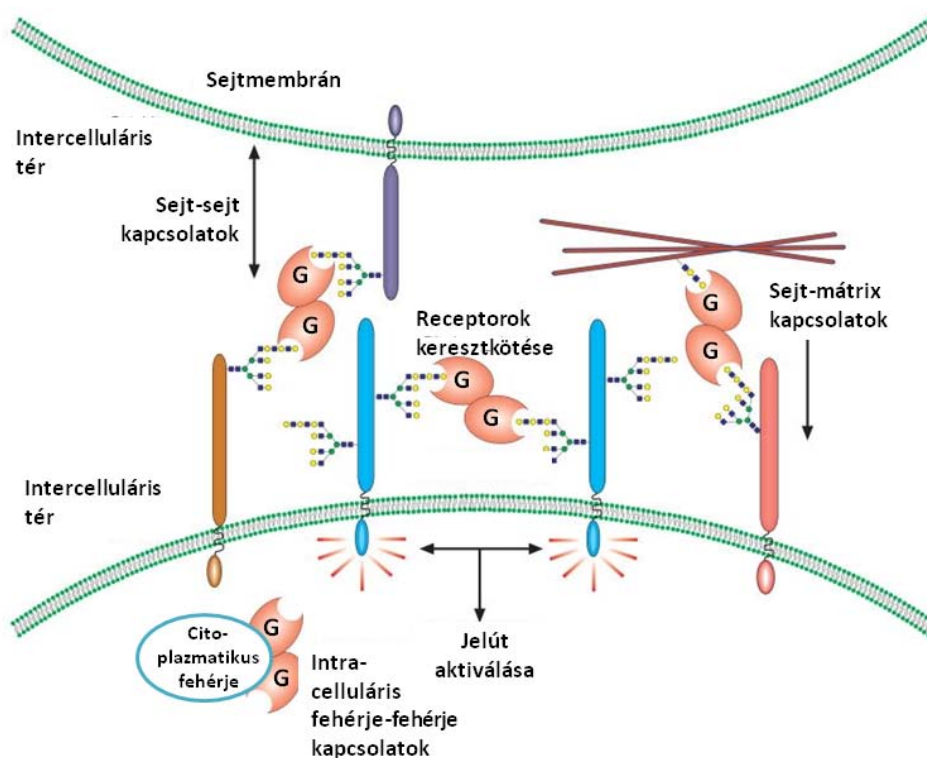
Az embriogenezis során a galektin-1 a FOS-B transzkripciós faktor szabályozásán keresztül befolyásolja az embrionális sejtek proliferációját [109]. A kötőszövetek jellegzetes megjelenésének kialakításában nagy szerepe van a galektineknek, befolyásolják a zsírsejtek (primary preadipocytes) differenciálódását és proliferációját (galektin-3, és -12), részt vesznek az embrionális csont és porcképződés modulálásában, valamint a csontszerkezet változásainak szabályozásában az oszteoblasztok proliferációjának elősegítésén keresztül (galektin-9). A galektin-1 befolyásolja a mezenchimális őssejtek és izomeredetű fibroblasztok miogén irányba történő konverzióját és mitogén jelként szolgál a vaszkuláris endotélsejtek számára. Az idegszövetben a galektin-1 az asztrociták differenciálódását indukálja és támogatja az idegsejtek túléléséhez szükséges faktorok termelését, valamint részt vesz az axonok

regenerációs folyamataiban. A hematopoezis folyamatában kulcsszerepet játszanak a galektinek, kapcsolatot teremtenek a strómális sejtek és a hematopoetikus őssejtek között, ezáltal befolyásolnak szinte minden differenciálódási vonalat a hematopoiezis során. A galektin-1 szerepét leírták már a hematopoetikus őssejtek proliferációjában, hízósejtek, B-, T-, - és dendritikus sejtek differenciálódásában, neutrofilek adhézíós képességének befolyásolásában, monociták és vérlemezkék aktivációjában. Galektin-1, és -3 fontos szerepet játszik a pre-B-sejtek differenciálódási folyamataiban, valamint a B-sejtek túlélésében és plazmasejtté alakulásában. A galektinek T-sejtekkel kapcsolatos szerepéről áll rendelkezésünkre a legtöbb információ. A különböző T-sejt típusok eltérnek egymástól a sejtfelszíni szénhidrátláncjaikban, ezért különböző érzékenységet mutatnak a galektinek, főként galektin-1 apoptózisindukáló hatásával szemben. A TH-1 és TH-17 sejtek galektin-1 hatására programozott sejthalállal elpusztulnak, a TH-2-sejtek pedig rezisztensek, viszont citokintermelésüket (főként IL-10 és INF- γ) befolyásolni képesek a galektinek. Míg a galektin-3 a dupla negatív (CD4, CD8) T-sejteken idéz elő apoptózist, addig a galektin-1 a dupla pozitív és dupla negatív T-sejteken egyaránt. A regulátor T-sejtek pedig maguk is termelnek galektin-1-et, amivel aktívan részt vesznek a citotoxikus TH-1-sejtek visszaszorításában. Az aktivált T-sejtek önmaguk ellen is termelnek galektin-1-et ezzel autokrin gátlást idézve elő. A galektinek tehát fontos szereplői a gyulladásos folyamatok szabályozásának, az immunrendszer antigénekkal szembeni toleranciájának befolyásolásával [110].

1.6.2. Galektin-1

A galektin-1-et több mint 20 évvel ezelőtt izolálták, 15 kDa-os fehérje, amely humán szövetekben, főként a placentában, tüdőben, lépben és thymusban fordul elő. Annak ellenére, hogy létezéséről már korán tudomást szereztünk, az immunrendszer működésében betöltött fontos szerepét csak az elmúlt évtized kutatásai kezdték feltárni. Aktivált T-, és B-sejtek, aktivált makrofágok, regulátor T-sejtek és természetes ölősejtek szintetizálhatják. A galektin-1 molekulák nem kovalens kölcsönhatások révén egymással dimert alkothatnak, ezáltal képesek modulálni a sejt-sejt és sejt-mátrix kapcsolatokat (laminin, fibronectin, aktin) (13. Ábra). A galektin-1 az immunsejtek sejtfelszíni glikoproteinjeihez (CD2, CD3, CD7, CD43, CD45) kapcsolódva

befolyásolja a gyulladós folyamatokat [109]. Részt vesz a T-sejtek szelekciójában, apoptózist indukál a reaktív T-sejtekben, ezzel visszaszorítva a gyulladást és gátolva az autoreaktivitást. Emellett az IL-10 termelés támogatásával segíti a T-reg sejtek proliferációját és a TH-2 típusú immunválaszt. Számos tumor esetén leírták már a galektin-1 expresszió fokozódását, így kimutatása diagnosztikus vagy prognosztikus markerként is szolgálhat (vastagbélrák, hasnyálmirigyrák, intrahepaticus epeútrák, veserák, prostatarák, húgyhólyagrák, choriocarcinoma, glioma, nem kissejtes tüdőrák, fej-nyaki laphámrák, méhnyakrák) [111, 112].



13. Ábra: Galektin-1 dimérek szerepe a sejtműködésben (G: galektin-1) Az intercelluláris térben a galektin-1 dimérek résztvesznek a sejt-mátrix, a sejt-sejt és a receptor-keresztükötések kialakításában. Intracellulárisan a fehérje-fehérje kapcsolatok befolyásolásával a jelutak aktivitását módosíthatják.

1.6.3. Galektinek a hematológiai daganatokban

Daganatos betegek szérumban galektin-3 szintjének vizsgálata alapján NHL-ás betegek emelkedett galektin-3 expressziót mutattak egészséges emberek szérumban mért értékekhez képest [113]. A galektin-3 expressziót daganatos szövetekben is vizsgálták, DLBCL-ben a magas galektin-3 expresszió és a rossz prognózis között szignifikáns összefüggést találtak [114]. Primer központi idegrendszeri lymphomák vizsgálata során a galektin-3 expresszió szintén a rossz prognózisú esetekkel párosult [115]. Lymphomákban egér modellben vizsgálva a galektin-7 expresszió emelkedése a metasztatikus fenotípus kialakulásával mutatott összefüggéseket [116].

2. 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 mikroenvironment 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 mikroenvironmentét alkotó sejtek összetételének vizsgálata különös tekintettel a regulátor T-sejtek (Treg) jelenlétére. Treg-sejtek és a tumorsejtek kapcsolatának vizsgálata, ebben a galektin-1 szerepének tanulmányozása.

3. MÓDSZEREK

3.1. TMA-vizsgálatok

Több független TMA (tissue micro array) vizsgálatot végeztünk, amelyekben az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet archivált formalinban fixált, paraffinba ágyazott biopsziás mintáiból gyűjtöttünk és a reprezentatív területekből 2 mm átmérőjű szövethengereket szűrtünk ki és illesztettünk be a 70 mintás TMA blokkokba.

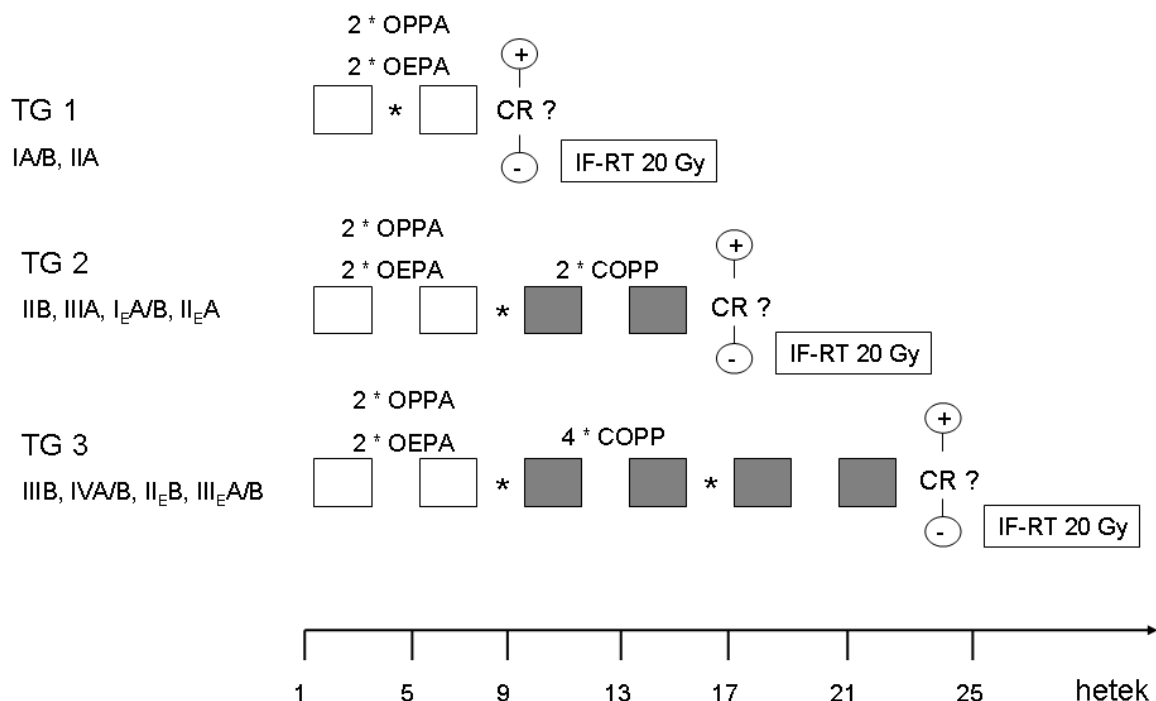
Első TMA-vizsgálatunkban különböző lymphoma entitásokat gyűjtöttünk. 2004-2008 közötti anyagokat dolgoztunk fel, olyan mintákat választottunk, amelyek diagnózisa egyértelmű volt és hematopatológus segítségével ellenőriztük az aktuális lymphoma klasszifikáció szerinti besorolásokat. 104 lymphomás beteg biopsziás mintáit használtuk fel: 4 Burkitt-lymphoma (BL), 23 HL, 11 MCL, 9 anaplasias nagy-sejtes lymphoma (ALCL), 10 DLBCL, 12 marginális zóna lymphoma (MZL), 13 krónikus lymphoid leukémia/kissejtes lymphocytás lymphoma (CLL), 10 FL és 12 perifériás T-sejtes lymphoma.

Nagyobb esetszámú Hodgkin lymphomás (HL) betegek biopsziás mintáinak mTOR aktivitás vizsgálatához további TMA blokkokba az előbbi 23 mellé 60 HL-beteg mintáját választottuk ki korábbi évekből (2000-2007), így összesen 83 HL beteg immunhisztokémiai vizsgálatának értékelésére volt lehetőség. A kiválasztásban minden HL altípus szerepelt: 7 noduláris lymphocytá predománns HL és 76 klasszikus HL esetet. A klasszikus HL négy alcsoportjának megoszlása az egyes altípusok gyakoriságának megfelelően alakult: 47 noduláris sclerosis, 18 kevertsejtes, 8 lymphocytá gazdag és 3 lymphocytá depléciós esettel. A vizsgálatban szereplő HL-betegek (40 nő, 43 férfi, életkor: 8-82 év, átlagéletkor: 29,8 év) biopsziás mintáinak karakterizálása intézetünkben történt. A diagnózistól eltelt minimális követési idő már minden betegnél elérte az 5 évet. Eddig 25 HL-ás beteg relabált, 13 beteg esett át őssejttranszplantáción (8 betegnél volt sikeres a transzplantáció, 5 beteg meghalt), 10 beteg halt meg a betegség progressziója és/vagy a transzplantáció szövődményei következtében. A betegek többsége (64%) a betegség I-II stádiumában került diagnosztizálásra, 36%-ukban volt előrehaladott a betegség (III-IV stádium). Az esetek 30%-ában járt a betegség B-tünetekkel.

A fiatal betegek (8-18 év) első vonalban (TG 1), IA/B, IIA stádiumban 2 ciklus OPPA (lányok) vagy OEPA (fiúk) kezelést kaptak; IIB, IIIA, I_EA/B, II_EA stádiumokban TG 2 ágon a 2 ciklus OPPA vagy OEPA kezelést 2 ciklus COPP követte; IIIB, IVA/B, II_EB, III_EA/B stádiumokban TG 3 szerint 2 ciklus OPPA vagy OEPA után 4 ciklus COPP kezelést kaptak. Abban az esetben, amikor a betegek kezelés után nem kerültek komplett remisszióba, sugárterápiás kezelések és/vagy autológ/allogén hematopoietikus őssejttranszplantáció következett. (OPPA: vincristine, procarbazine, prednisone, doxorubicin; OEPA: vincristine, etoposide, prednisone, doxorubicin; COPP: cyclophosphamid, vincristine, procarbazine, prednisone) (14. ábra).

A felnőtt betegek ABVD kezelést kaptak, rezisztencia esetén DHAP protokoll szerint folytatták a kezelésüket. Őssejttranszplantáció előtt szintén DHAP kezelést alkalmaztak. (ABVD: adriamycin, bleomycin, vinblastine, dacarbazine; DHAP: dexamethasone, high dose cytarabine, cisplatin.) (14. Ábra).

a.



b.

ABVD	gyógyszer	dózis (mg/m ²)	nap
	doxorubicin	25	1,15.
	bleomycin	10	1,15.
	vinblastine	6	1,15.
	dacarbazine	375	1,15.

14. Ábra: Kezelési protokollok Hodgkin-lymphomás betegeknél

(a. gyermek,- és serdülőkorban, b. felnőttkorban; IF-RT: érintett régió besugárzása)

Több, mint 80 diffúz nagy B-sejtes lymphomás eset biopsziás mintáiból készült TMA-k segítségével összesen 68 beteg biopsziás mintájában tudtuk értékelni valamennyi a DLBCL-ák immunhisztokémiai altípusainak meghatározásához, illetve az mTOR aktivitás értékeléshez szükséges IHC-festést. A Hans-, Tally,- és Choi-féle algoritmusok szerint is elvégeztük a DLBCL-esetek GC és non-GC szerinti klasszifikációját (MUM1, CD10, BCL6, LMO2, Foxp-1 és GCET1 immunhisztokémiai festéseken alapul), egyetlen esetben tért el a Hans-, Tally-féle algoritmus alapján megállapítható altípus megoszlás a Choi-féle algoritmus szerinti megoszlástól. A Hans- és Tally-féle osztályozás eredménye megegyezett minden vizsgált esetben, ezért azzal - 18 GC és 50 non-GC - dolgoztunk a különböző adatok statisztikai elemzése során. A vizsgálatban szereplő DLBCL-ás betegeket (34 nő, 34 férfi, életkor: 13-87 év, átlagéletkor: 59 év) 1995 és 2009 között diagnosztizálták intézetünkben. A betegek 65 %-a magas nemzetközi prognosztikus értéket kapott (IPI: 3-4), 72 %-ukban III-IV stádiumot állapítottak meg a diagnóziskor. I-II stádiumú betegsége a vizsgált esetek 28%-ának (19/68) volt. A betegek 2 éves teljes túlélése (overall survival-OS) 63% volt. A 68 esetből értékelhető, 5 éves vagy annál hosszabb követési adatokkal 52 betegnél rendelkezünk. Ezekben az esetekben el tudtuk végezni a követéses klinikai adatok és az IHC vizsgálatok összefüggésének statisztikai elemzését. Ebben az 52 esetben az 5 éves túlélés (OS) 62%, az átlagos túlélés 47 hónap, a median túlélés 42 hónap volt. Az átlag és median túlélés magasabb volt az alacsonyabb IPI értékű betegek esetében, ami statisztikai összefüggést is mutatott. Az átlag és medián túlélés is elérte az 5 évet az alacsony IPI értékű (0-2) betegek esetében, magasabb IPI értékek (3-4) mellett az átlagos túlélés 37 hónap, a medián túlélés 28 hónap volt. A betegek a diagnózisnak megfelelően, az adott periódusban elérhető konvencionális CHOP (cyclophosphamid,

doxorubicin, vincristin, prednison), CEOP (cyclophosphamid, etoposide, vincristin, prednison), R-CHOP (rituximab-CHOP), R-CEOP kezelésben részesültek.

3.2. Sejtenyésztés, *in vitro* kezelések

Különböző vizsgálatainkban *in vitro* szuszpenziós (Hodgkin-lymphoma: KMH2, L1236-kevertsejtes altípus, DEV, L428, HDLM-2, UH-01- noduláris sclerosis altípus, diffúz nagy B-sejtes lymphoma: BHD1, Burkitt-lymphoma: HT58, BL41, BL41/95, Ramos, Raji, hisztiocitás lymphoma: U937, folliculáris lymphoma: 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 (cervix carcinoma: HELA, emlő carcinoma: MDA-MB-231) használtunk. A HT58 sejtvonalat laboratóriumunkban hozták létre (Kopper L.1991), a BHD1 sejtvonalat Dr. Peter Möller (Patológiai Intézet, Universitat Ulm, Németország), az L1236, DEV, L428 és HDLM-2 sejtvonalakat Dr. Klein Éva (Karolinska Intézet, Stockholm, Svédország) bocsátotta rendelkezésünkre; a többi sejtvonalat sejtbankokból szereztük be (ATCC: American Type Tissue Culture, DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). A sejteket 25 vagy 75 mm² alapterületű tenyésztő flasksokban tenyésztettük 37 °C hőmérsékleten 5%-os CO₂ koncentráció mellett. Adherens sejteket 3-4 naponta passzáltuk (PBS-mosást követően Trypsin-EDTA (Sigma) oldattal inkubáltuk a sejteket), majd sejtszámolás után a megfelelő médiumot hozzáadtuk a sejtekhez. A sejteket 10% hőinaktivált főtális borjú savót (FCS-Gibco, HyClone) és 1% antibiotikumot (penicillin, streptomycin, Sigma) tartalmazó RPMI 1640 médiumban (Gibco, HyClone) tenyésztettük. A BHD1 és UH-01 sejtvonalak tenyésztőmédiuma előbbiektől eltért: Iscove's MDM és RPMI-1640 médiumok 4:1 arányú keverékéhez BHD-1 esetén 10%, UH-01 esetén 20% FCS-t adtunk, a médiumokat kiegészítettük még 2 mM L-glutaminnal (Sigma) és 1%-nak megfelelő antibiotikummal.

A kísérletekhez a növekedés exponenciális fázisában lévő sejteket használtunk. Az adherens sejteket kezelés előtt lecentrifugáltuk és friss médiumban vettük fel a megfelelő sejtszámban ($5 \cdot 10^4$ /ml), majd a következő napon kezdtük a kísérletet. A szuszpenziós sejteket nem centrifugáltuk, csak kihígítottuk a megfelelő sejtszámba ($3 \cdot 10^5$ sejt/ml). A sejteket 0-72 órán keresztül a következő szerekkel kezeltük: rapamycin 50 ng/ml (Sigma), metotrexát 20 nM (Teva, Pharmachemie BV), citozin-

arabinozid 10 ng/ml (Alexan, Ebewe Pharma GmbH), doxorubicin 100 nM (Ebewe Pharma), vincristine 3 nM (Richter Gedeon), etoposid (Pharmacie BV), metilprednizolon 100 nM (TEVA) és ciklofoszfamid 500 nM (Baxter Oncology GmbH). A sejtciklus szinkronizálását nocodazole (40–200 ng/ml, 4–24 h, M-fázis blokk, Sigma), rapamycin (50 ng/ml, 16 h, G1 blokk, Sigma), és staurosporin (0.1 M/ml, 16 h, G1 blokk, Sigma) kezelésekkel végeztük. Az mTOR-gátló kezeléseket 0-144 órán keresztül végeztük, klasszikus mTOR-gátlóként rapamycint (50 ng/ml) használtunk, duál inhibitor kezelést NVP-BEZ-235 (1 μ M, Cayman Chemical) és PP-242 (1 μ M, Tocris, R&D System) szerekekkel végeztünk. A hosszútávú kezeléseknél naponta pótoltuk az mTOR gátlókat és a 72. órában frissítettük a médiumot.

A sejtek morfológiáját 100-120 μ l (maximum 10^5 sejt) minta felhasználásával, centrifugálást követően (5 perc, 500 RPM) etanollal fixált, hematoxin-eozinnal festett citospin-preparátumokon vizsgáltuk.

3.3. Apoptózismérés és sejtciklusanalízis áramlási citometriával

Az áramlási citometriai vizsgálatokhoz a sejteket 70%-os etanolban fixáltuk, majd alkalikus extrakció (200 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4), RNáz (Sigma) kezelés és propídium-jodid (1 mg/ml, Sigma) festés [117] a sejtek DNS tartalmát FACScalibur áramlási citométeren (BD Biosciences), Cell Quest software (BD Biosciences - 10-20 000 esemény/minta) segítségével mértük le. Az eredmények kiértékelése, apoptózismérés esetén a szubG1 sejtek (alacsony DNS-tartalmú, azaz apoptotikus sejtek) százalékos arányának meghatározásával, sejtciklus analízis esetén a mintában lévő sejtek G1, S és G2 fázisok közti megoszlásának százalékos értékelésével történt (Winlist software -Verity Software House).

3.4. Sejtviabilitás meghatározása Alamar blue tesztel

Az Alamar blue oldatot (resazurin, 7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one- 10-oxide, Life Technologies) 10 μ g/ml végső koncentrációban alkalmaztuk és 37 °C-on, 5%-os CO_2 tartalmú termosztátban inkubáltuk a sejtekkel 4 óráig. A metabolikusan aktív sejtek átalakítják a reagenst, így a festék színe a sejtek viabilitásától függően változik. Az inkubációs idő elteltével spektrofotométer segítségével lemértük a minták fluoreszcencia értékeit (abszorbancia mérés: 570-590 nm, Ascent szoftver, Fluoroskan Ascent FL, Labsystems)

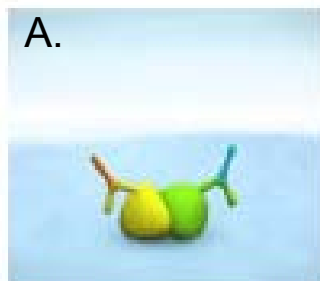
3.5. ELISA mérés

Az előzőleg tonsillából mágneses ellenanyagok segítségével izolált B és T-sejteket és humán lymphoma/leukémia sejtvonalakat lefagyasztottuk (5 millió sejt/minta) és -80°C -on tároltuk. A mintákhoz lízis puffert (1 millió sejt/100 μl , Cell Signaling Technology) és proteáz gátlót (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride- PMSF) adtunk, majd 30 percig jégen inkubáltuk, közben többször vortexelve a mintákat. Centrifugálást követően a felülúszók fehérjetartalmát lemértük (Qubit Fluorometer, Invitrogen), majd szendvics ELISA kitet használtunk a gyártó utasításainak megfelelően a p-4EBP1 – Thr37/46 detektálására (PathScan-ELISA kit, Cell Signaling). Az abszorpciót és az optikai denzitást (OD) 450 nm-es hullámhosszon mértük.

3.6. Immuncitokémia

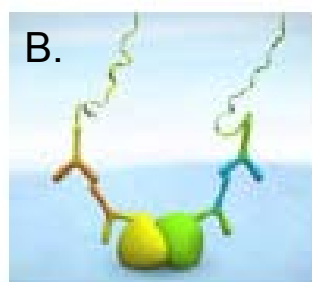
A metanol fixált (80%-os, -20°C , 10') cytopineket, endogén peroxidáz (Naborohodrid-oldat 10', perjódsavas oldat 10', 30 %-os hidrogén peroxidáz és metanol 1:9 arányú keveréke 20') és lószérumos blokkolást (3%-os, 30') követően különböző elsődleges ellenanyagokkal inkubáltuk (4°C , éjszaka) az alábbi hígításokban: anti-foszfo-S6 - 1:100, anti-mTOR – 1:100 és anti-foszfo-mTOR - 1:50/1:25 (Cell Signaling), anti-foszfo-mTOR - 1:100 (Abcam); anti-riCTOR - 1:300; anti-raptor - 1:100, anti-galektin-1 1:300 (Leica, Novocastra/Peprtech). A detektálás Novolink (Novocastra) polimer rendszerrel, a vizualizálás DAB-al (Dako), a háttérfestés hematoxilinnal történt. Folyadék fázisban is végeztünk jelöléseket (2 millió sejt/minta) anti-foszfo-S6 és anti-foszfo-Hisztón-H3 ellenanyagokat használtunk (1:50, Cell Signaling.), majd anti-nyúl és anti-egér fluoreszcens másodlagos ellenanyagokat (1:200, áramlási citometriás mérésre: Northern Lights (NL) 637; NL 439, konfokális mikroszkópiás vizsgálatra: NL 557 és NL 493; R&D System) használtunk. Áramlási citometriával 20000 sejtet mértünk le a mintákból, majd a p-HH3 pozitív és negatív sejtekben hasonlítottuk össze a p-S6 festődés átlagos fluoreszcencia intenzitását (MFI). A mintákat konfokális mikroszkóppal is megvizsgáltuk miután DAPI-festékkel (Biolegend) láthatóvá tettük a sejtmagokat.

3.7. Duolink immuncitokémiai és immunhisztokémiai előhívórendszer - beállítást követő, általunk meghatározott- protokollja



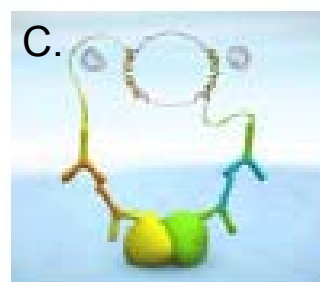
A. Primer ellenanyag

Minta előkészítése: a natív cytospineket fixáljuk (4%-os paraformaldehidben 10') és permeabilizáljuk (0,01%-os Triton-X 100 oldatban 10'), a paraffinos metszeteket deparaffináljuk és a primer ellenanyagoknak megfelelő antigén feltárást elvégezzük. 30 percig inkubáljuk 37°C-on blokkoló oldattal. A minták inkubálása az elsődleges ellenanyagokkal (15. Ábra: G.) 37°C-on történik 2 órán keresztül.



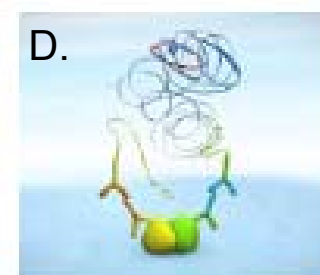
B. Szekunder ellenanyag (=PLA probes; proximity ligation assay)

A sejteket gyári oligonukleotidokkal jelzett másodlagos ellenanyagokkal inkubáljuk (37°C, 2h). Ezek a másodlagos ellenanyagok a primereknek megfelelően különböző fajokból származó epitópotat ismernek fel: meghatározott oligokkal konjugált anti-egér, anti-nyúl ellenanyagok.



C. Hibridizáció és ligálás

Gyári oligonukleotidokat adunk a mintához, melyek hozzáhibridizálnak a másodlagos ellenanyagokon lévő megfelelő szekvenciákhoz, ha azok megfelelő távolságban vannak egymáshoz képest. Ezután a hozzáadott ligáz az oligonukleotidokat gyűrűvé zárja (37°C, 2 x 15').



D. Amplifikáció (RCA=rolling circle amplification)

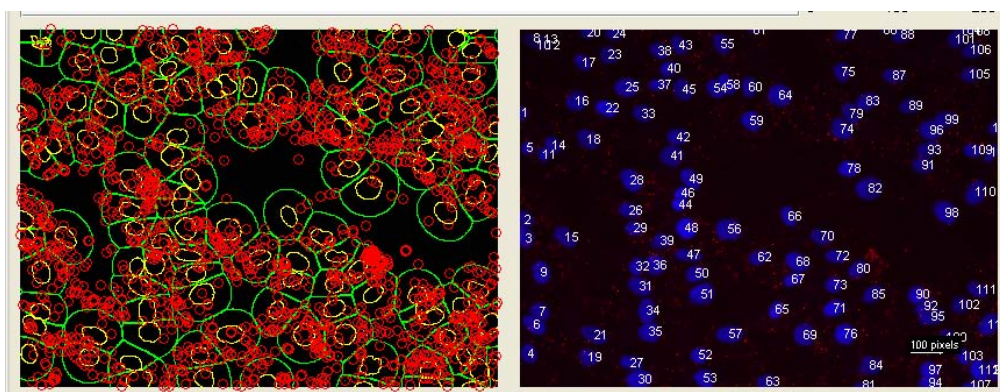
A ligálás eredményeként kapott gyűrű szolgál templátként az amplifikációs lépésnél, melyben polimerázzal és nukleotidokkal inkubáljuk a mintát (90', 37°C).

E. Detektálás

Fluoreszcensen jelölt gyári oligonukleotid próbákat adunk a mintához, amelyek hibridizálnak az amplikonhoz (60', 37°C). A kísérlet eredményeként kapott fluoreszcens jeleket pontszerű reakciókként láthatjuk konfokális lézermikroszkóp segítségével (excitáció: 346 nm, emisszió: 460 nm). Biopsziás minták esetén peroxidáz konjugált próbál felhasználásával DAB-os előhívásra is van lehetőség.

F. Elemzés

Digitális képeket készítünk a reakciókról, amelyeket számítógépes programban (BlobFinder) jelenítünk meg és számszerűsítjük az eredményeket.

**G.**

Egérben termeltetett elsődleges ellenanyagok	Nyúlban termeltetett elsődleges ellenanyagok
Riboszomális S6 fehérje /Cell Signaling/	Riboszomális foszfo-S6 (Ser235/236) fehérje /Cell Signaling/
Rictor monoklonális ellenanyag /Bethyl lab./	mTOR ellenanyag /Bethyl lab./

15. Ábra: A Duolink ICC és IHC technika protokollja (A-F.) és az általunk használt elsődleges ellenanyagok (G.)

(forrás: Olink Biologicals)

3.8. Immunhisztokémia

A paraffinos blokkokból készült meteszeteket deparaffináltuk, majd endogén peroxidáz blokkolás után megfelelő pufferben (citrát pH6, TRS, EDTA pH9) elektromos kuktában (21 perc) tártuk fel (3. Táblázat). A mintákat lószérumos (3%) pufferben blokkoltuk és a megfelelő hígításban (3. Táblázat) inkubáltuk a metszeteket 4°C-on éjszaka. Novolink (Novocastra) illetve Vectastain (Vector) másodlagos előhívó rendszereket használtunk, majd DAB kromogénnel tettük láthatóvá a reakciókat.

3. Táblázat: Immunhisztokémiai vizsgálatainkban használt ellenanyagok és felhasználásuk összefoglalása

	p-S6	p-p70S6K	p-mTOR	Rictor	Raptor
feltáró puffer	citrát (pH=6)	citrát (pH=6)	citrát (pH=6)	TRS	citrát (pH=6)
hígítás	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100
másodlagos előhívórendszer	Vectastain /Novolink kit	Vectastain /Novolink kit	Vectastain /Novolink kit	Novolink kit	Novolink kit
gyártó	Cell Sign.	Dako	Cell Sign.	Bethyl	Novus

	NFκB-p50	BCL-2	BCL-xL	Survivin
feltáró puffer	citrát (pH=6)	citrát (pH=6)	citrát (pH=6)	citrát (pH=6)
hígítás	1:200	1:50	1:50	1:300
másodlagos előhívórendszer	Vectastain kit	Vectastain kit	Vectastain kit	Vectastain kit
gyártó	LabVision	Dako	Dako	LabVision

	Galektin-1	FOXP3	p-HH3	Aktív-kaspáz3
feltáró puffer	citrát (pH=6)	EDTA (pH=9)	citrát (pH=6)	citrát (pH=6)
hígítás	1:500	1:50	1:100	1:100
másodlagos előhívórendszer	Vectastain/ Novolink kit	Novolink kit	Novolink kit	Novolink kit
gyártó	Peprotech	Biolegend	Cell Sign.	Cell Sign.

3.8.1. IHC eredmények kiértékelése:

mTOR aktivitással kapcsolatos fehérjék (p-mTOR, p-p70S6K, p-S6) IHC értékelése

Az mTOR aktivitás vizsgálatához az mTOR szignál foszfoproteinjei közül hármat vizsgáltunk (p-mTOR-magát az aktív mTOR kinázt, p-p70S6K- aktivált direkt target, p-S6- aktivált indirekt target). Két független patológus segítségével értékeltük az IHC festéseket. Adott festődés esetén +, ++, +++ értékelést használtunk. Belső kontrollnak az értékelésnél a plazmasejteket tekintettük, ezek magas mTOR aktivitása, igen intenzív IHC jelölődést eredményezett a p-mTOR és p-S6 festések esetében, ezt tekintettük +++ intenzitású értéknek. p-mTOR esetében jóval gyengébb IHC reakciókat kaptunk a nyirokcsomó szövetekben, mint más típusú szövetekben, itt a plazmasejtek pozitivitása is gyengébbnek bizonyult (ennek oka még ismeretlen), amihez belső kontrollként viszonyítottuk az értékelést. A tumoros szövet értékelése esetében, ha a daganatsejtek több, mint 10%-a már mutatta a magasabb intenzitású festődést, akkor azt a magasabb értéket adtuk meg. Abban az esetben tehát, ha az értékelt tumorsejteknek 10%-a +++ intenzitású festődést mutatott, +++ értékelést adtunk, még akkor is, ha a tumorsejtek nagyobb része csak + vagy ++ intenzitású festődést mutatott.

Adott esetet magas mTOR aktivitásúnak értékeltünk abban az esetben, ha ++ vagy +++ értékelést kapott legalább két az mTOR aktivitását jelző markerrel.

Akkor tekintettünk magas mTOR aktivitásúnak egy adott lymphoma típust, ha az esetek több, mint 50 %-ában magas mTOR aktivitás határoztunk meg az előbbieket szerint.

NF-kappaB-p50, BCL-2, BCL-xL és Survivin IHC értékelése

Azokat az eseteket értékeltük pozitívnak az NF-kappaB-p50 aktivitás vizsgálatában, amikor magi pozitivitást mutattunk ki a tumorsejtek több, mint 10%-ában.

Az antiapoptotikus fehérjék expressziójának IHC-értékelésekor a BCL-2 és BCL-xL citoplazmatikus, a survivin citoplazmatikus és magi pozitivitást is mutatott, abban az esetben, ha a daganatsejtek legalább 10%-a mutatta az előbb leírt festődést, akkor pozitívnak értékeltük.

Rictor és Raptor IHC értékelése

Rictor és Raptor festődése általában nem mutatott tumoron belül heterogenitást, így a festődés intenzitását +, ++, +++-el értékeltük. A két festés arányának eltolódását csak legalább + eltérésnél vettük figyelembe, valamelyik irányú dominancia megjelenéseként. Például, abban az esetben, ha a Raptor értékelés +, a Rictor +++ volt akkor Rictor dominanciáról írunk, ha viszont Rictort ++/+++ értékelés volt a két patológus részéről és Raptor ++, akkor ezt nem tekintettük a Rictor/Raptor arány eltolódásának.

Galektin-1 IHC értékelése

A galektin-1 fehérje termelésének és funkcióinak megfelelően intra- és extracelluláris festődést is mutatott. Hodgkin lymphoma biopsziás mintákban az elemzés során ezt a két jelet külön-külön értékeltük. A citoplazmatikus reakciók esetén enyhe (1+)/közepes (2+)/és erős (3+) jeleket különböztettünk meg. Extracelluláris reakcióknál nem tettünk különbséget a reakciók között, pozitív vagy negatív értékelést kapott az extracelluláris mátrix galektin-1 expresszió szempontjából.

Regulátor T-sejtek arányának meghatározása FOXP3 IHC festéssel

A regulátor T-sejtek mennyiségi vizsgálatát úgy végeztük, hogy minden betegmintán kijelöltünk 3-3 területet a tumorsejtgazdag és tumorsejtszegény/tumorsejtmentes területeken, majd ezeken számítógépes program (Mirax Panoramic Viewer) segítségével összevetettük a FOXP3 magi pozitív és negatív sejtek számát.

Foszforilált-Hisztón-H3 (p-HH3) és aktív-kaspáz3 reakciók értékelése

A xenograft blokkokból készült metszeteken végzett aktív-kaspáz 3 (citoplazmatikus reakció) és p-HH3 (sejtmagi reakció) immunreakciókat szintén számítógépes program segítségével elemeztük. 4-4 látótér pozitív sejtjeit számoltuk meg, majd összevetettük és ábrázoltuk a kontroll és a rapamune-nal kezelt csoportok értékeit.

3.9. Western blot

A sejteket SDS mintapufferben lizáltuk (1 millió sejt/100 µl; 50 mM Tris-HCl, pH7,5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 0,5 mM nátrium-vanadát, 10 µg/ml leupeptid és 10% glicerol), a lizátumot 10 percig jégen tartottuk, majd 15 percig 20000 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk. Ezután megmértük az egyes minták fehérjetartalmát (Qubit Fluorométer, Invitrogen). A lizátumokat 2-merkaptóetanolt (Sigma) tartalmazó Laemmli pufferben (BioRad) felforraltuk. 10-150 µg mennyiségű fehérjét (különböző minták esetében mindig azonos mennyiségű fehérje futtatása, összehasonlító vizsgálatok esetében) 8-15%-os SDS gélen elektroforézissel elválasztottuk, majd PVDF membránra (BioRad) blottoltuk. Blokkolást követően a membránt anti-foszfo-mTOR (1:1000, p-mTOR, Ser2448), anti-mTOR, anti-foszfo-p70S6K (1:1000, p-p70S6K, Thr389), anti-foszfo-S6 (1:1000, p-S6, Ser235/236) (Cell Signaling), anti-Rictor (1:1000, Abcam) és anti-galektin-1 (1:1000, Peprotech) ellenanyagokkal inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on. Másodlagos ellenanyagként Vectastain Elite ABC másodlagos előhívó kitet (Vector) használtunk, majd a membránokat kemilumineszcens előhívás után (ECL Western Blotting Substrate,

Pierce) KODAK Image Station 4000 MM kamerával (Eastman Kodak) fényképeztük. A membránokra a minták mellé minden esetben feltettünk fehérje molekulásúly markert (Fermentas), amely segítségével meg tudtuk állapítani a mintában kimutatott fehérje méretét. A minták összehasonlíthatóságát a minták β -aktin expressziójának vizsgálatával ellenőriztük a blottok újrafelhasználásával (ReBlot-oldat, Millipore). A membránt anti- β -aktin monoklonális ellenanyaggal (1:2500 Sigma), majd HRP-konjugált másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk (anti-egér IgG, Cell Signaling) és kemilumineszcens technikával hívtuk elő.

3.10. Real-time PCR

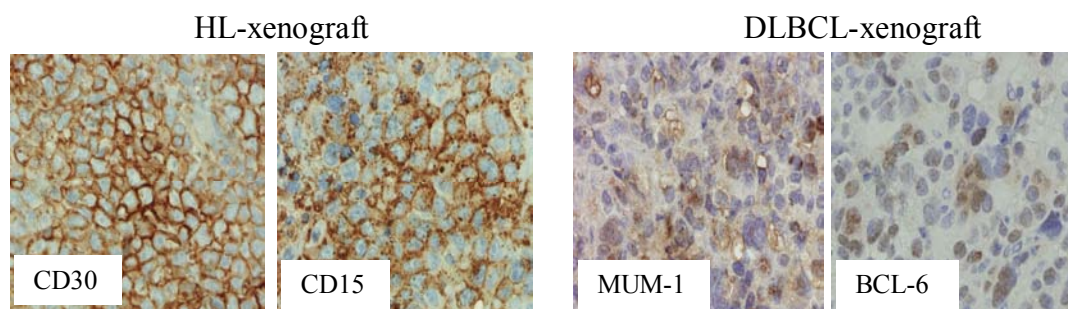
Különböző lymphoma és leukémia sejtekből RNS-t izoláltunk (Micro-to-Midi RNS-izoláló kit, Invitrogen), majd megmértük a minták RNS tartalmát (Nanodrop Spectrophotometer, BioRad). 1 μ g RNS-ből MMLV reverz transzkriptázzal (Invitrogen) és random hexamer primerekkel (Invitrogen) cDNS-t készítettünk. A real-time reakcióhoz 25 ng cDNS-t és galektin-1 primereket (Hs00899709_m1, TaqMan® Gene Expression Assay, Life Technologies) használtunk. A polimeráz láncreakciót ABI Prism 7000 Sequence Detection System készüléken végeztük (ciklusparaméterek: 50 °C 1 perc, 95 °C 10 perc, [95 °C 15 másodperc, 60 °C 1 perc] x 50 ciklus). A génexpresszió relatív értékét a belső kontrollként szolgáló GAPDH (glicerindehid-3-foszfát dehidrogenáz) háztartási gén szintjéhez normalizáltuk.

3.11. Xenograft modell

Hodgkin lymphoma, Burkitt lymphoma és DLBCL xenograftokat hoztunk létre. A tumorsejteket subcután oltottuk SCID egerekbe. Burkitt lymphoma esetén (HT58) a tumorsejtek (10^7 db sejt, 100-200 μ l térfogatban) beoltása után a tapintható méretű tumorokat hordozó egereket elkezdtek kezelni. A HL és DLBCL (KMH2 és BHD1) esetében a tumorsejteket extracelluláris mátrixszal (matrigél, Sigma) 1:1 arányban keverve oltottuk az egerekbe subcután (3×10^7 db sejt, 250 μ l térfogatban). A tumorok lassabban nőttek, ezeket az egerekből eltávolítottuk és feldaraboltuk, majd ezeket a tumordarabokat oltottuk tovább szintén subcután. Amikor ezek a tumorok tapintható méretűvé nőttek, elkezdtek kezelni az egereket. Per os kezeltük mindhárom xenograftot rapamycinnel (Sirolimus, Rapamune, Wyeth Europa Ltd.), a DLBCL xenograftokat subcutan oltással rapamycin analóggal (Temsirolimus, Torisel[®], Wyeth Europa Ltd.) is kezeltük. A kezeléseket 3-8 hétig tartották, közben 4-7 naponta mértük a tumorméreteket, majd a kísérlet végén a tumorok tömegét (4. Táblázat). A tumorméret kiszámítására a következő képletet alkalmaztuk: $\pi/6 \times (2 \times \text{rövidebb átmérő} + \text{hosszabb átmérő})/3)^3$. Az eltávolított tumorokat formalinban fixáltuk és paraffinba ágyaztuk, majd IHC-festéseket végeztünk a belőlük készült metszeteken. IHC-val igazoltuk a xenograftok eredetét az adott sejtvonalaknak megfelelő humán tumormarkerekkel (CD30, CD15, BCL-6, MUM-1, 16. ábra). Elvégeztük különböző molekulák expresszió vizsgálatát (proliferációs és apoptózis markerek, mTOR-jelút elemei, mikro környezet) is az egerekből eltávolított tumorszövetek paraffinos metszetein.

4. Táblázat: mTOR gátló kezelések a különböző xenograftokban

	Tumor- markerek	Kezelőszer	Dózis	Adagolás	Kezelés időtartama
Hodgkin lymphoma xenograft	CD30, CD15	Sirolimus	3 mg/tkg	3 alkalom/hét, per os	8 hét
Diffúz nagy B-sejtes lymphoma xenograft	BCL-6, MUM-1	Sirolimus, Temsirolimus	3 mg/tkg, 10mg/tkg	3 alkalom/hét, per os, 5 alkalom/hét, sc.	3 hét
Burkitt-lymphoma xenograft	CD20	Sirolimus	3 mg/tkg	3 alkalom/hét, per os	4 hét



16. Ábra: Tumormarkerek vizsgálata xenograftokban

Hodgkin lymphoma xenograft humán CD30 és CD15, DLBCL-xenograft humán MUM-1 és BCL-6 expressziója (IHC, 200x). Burkitt lymphoma xenograft humán CD20 expresszióját már korábban kimutattuk.

3.12. Statisztikai analízis

Az adatok számtani átlaga (\bar{x}) és standard deviációja (SD) 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 Khi^2 próbával (log-rank teszt) határoztuk meg. A számításokat GraphPad (GraphPad, San Diego, California, USA), PAST (PAST letölthető szoftver <http://folk.uio.no>), SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) szoftver segítségével végeztük.

4. EREDMÉNYEK

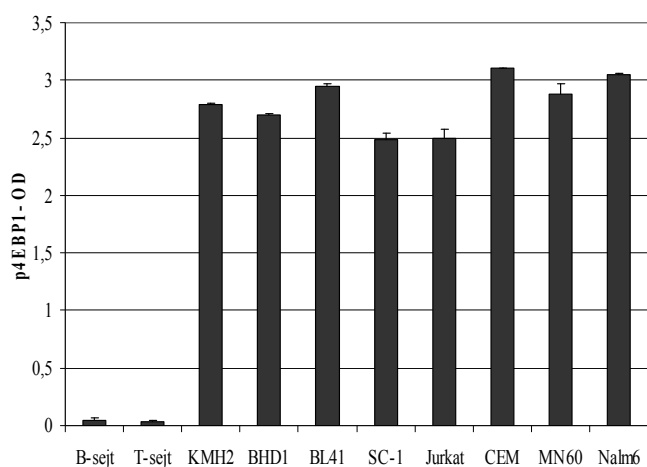
4.1. mTOR aktivitás a különböző lymphoma sejtvonalakban és humán biopsziás mintákban

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. Előbbi fehérjék expresszióját, mennyiségét ELISA, immuncitokémia és Western blot segítségével vizsgáltuk. A három legjobban ismert és leggyakrabban vizsgált mTOR célmolekula a 4EBP1 és a riboszomális S6 Kináz és utóbbi célfehérjéje, a riboszomális S6. Többféle ELISA esszé (p-mTOR, p-S6 és p-4EBP1) felhasználhatóságát is kipróbáltuk és összehasonlítottuk egymással egy a gyerekkori ALLeS minták mTOR aktivitását célzó vizsgálat során [118], amely alapján a p-4EBP1 ELISA volt a legmegbízhatóbb és legérzékenyebb. Ezért p-4EBP1 ELISA segítségével jellemeztük a lymphoma és leukémia sejtek mTOR aktivitását. A tonsillából izolált normál B,- és T-sejtekben mért értékekhez képest a lymphoma és leukémia tumorsejtvonalak szignifikánsan nagyobb mennyiségű p-4EBP1 fehérjét expresszáltak, ami emelkedett mTOR aktivitásra utal. Normál B-, és T-sejtekhez viszonyítva a B-sejt eredetű sejtvonalakban közel 50-szeresére, a T-sejt eredetű sejtvonalakban 80-100-szorosára emelkedett az mTOR aktivitást jellemző p-4EBP1 fehérje mennyisége (17. Ábra).

Cytospin lemezekén végzett immuncitokémiai vizsgálataink eredményei is megerősítették a különböző leukémia és lymphoma sejtek fokozott mTOR aktivitását. Valamennyi sejtvonalban kimutattuk az mTOR kináz fehérje expresszióját, ebben jelentős eltérést a sejtvonalak és a normál sejtek között nem tapasztaltunk. Párhuzamosan azonban az aktív mTOR kináz (p-mTOR) fehérje mennyisége, illetve foszforilált, indirekt célmolekulája, a riboszomális S6 fehérje magas expressziót mutatott a különböző daganatos sejtvonalakban. A kétféle mTOR komplex megoszlását is vizsgáltuk, két olyan molekula expressziójának kimutatásával, amelyek a C1 és C2 komplexek kulcsfontosságú alkotói. Az mTORC1-komplexre a Raptor fehérje, mTORC2-komplexre a Rictor fehérje expressziója utal. A különböző sejtvonalakban eltérő expressziót mutattak ezek a fehérjék (18. Ábra). BHD1 és KMH2 sejtekben jelentős mennyiségű Rictor fehérjét, míg alacsony mennyiségű Raptort tudunk

kimutatni ICC-vel, ez a két komplex arányát tekintve mTORC2 dominanciára utal. HT58 sejtekben a Rictor:Raptor arány alapján a két komplex kiegyenlített expresszióját figyeltük meg. Ezt a megfigyelésünket Rictor Western blot eredményeink is alátámasztják, ahol az előzőekhez hasonlóan eltérő mértékű Rictor expresszió jellemezte a különböző lymphoma sejteket. A három vizsgált sejtvonal közül a HT58 esetében volt a legalacsonyabb a Rictor expressziója (19. Ábra). Raptor esetében az ellenanyag nem alkalmas Western blot technikára.

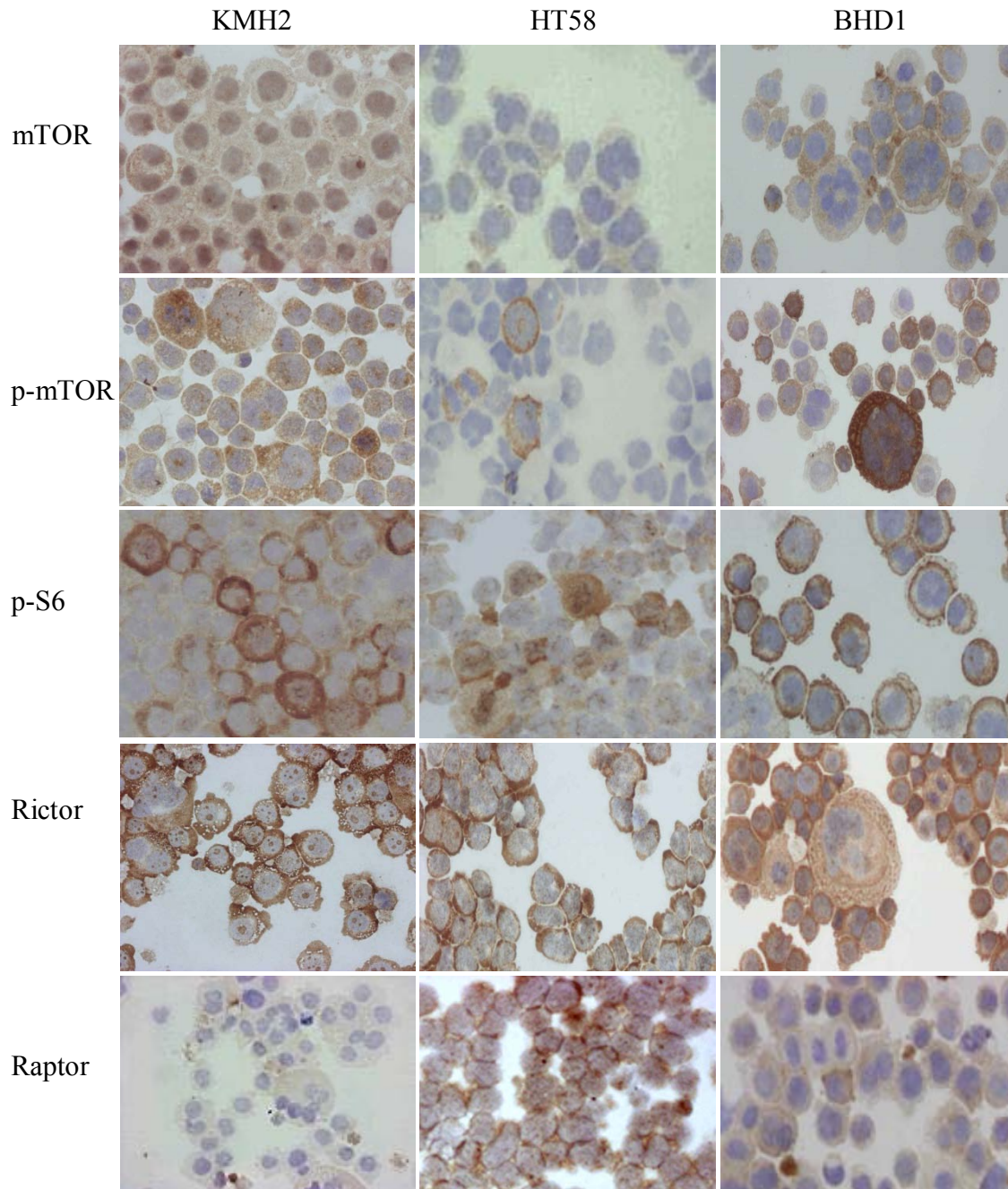
a.



b.

Viszonyítás	B-sejt	KMH2	BHD1	BL41	BL-41	SC-1
B-sejtekhez	1x	55,8x	54x	59x	59x	49,6x
T-sejtekhez	-	-	-	-	-	-
	T-sejt	Jurkat	CEM	MN60	Nalm6	
B-sejtekhez	-	-	-	57,6x	61x	
T-sejtekhez	1x	80,3x	100x	-	-	

17. Ábra: Különböző lymphoma és leukémia sejtvonalak emelkedett mTOR aktivitása. a: A lymphoma és leukemia sejtekben szignifikánsan ($p < 0,05$) magasabb OD értékeket mértünk p-4EBP1 ELISA-val. b: Lymphoma és leukemia sejtvonalak mTOR aktivitása 50-100-szorosa a normál B-, és T-sejteknek. (Jurkat, CEM: T-ALL, MN60, Nalm6: B-ALL, KMH2: HL, SC-1 follikuláris lymphoma, BL41: Burkitt lymphoma, BHD-1: mediasztinális DLBCL)

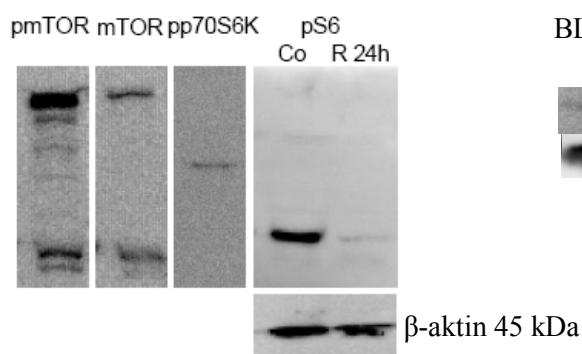


18. Ábra: Hodgkin lymphoma (KMH2), Burkitt lymphoma (HT58) és DLBCL (BHD1) sejtvonalak mTOR aktivitásának és mTOR komplex fehérjéinek ICC vizsgálata.

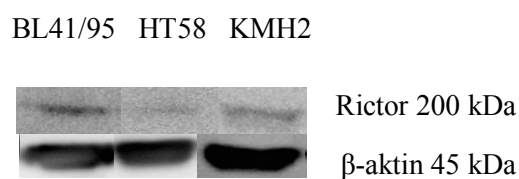
A lymphoma sejtvonalak magas p-mTOR és p-S6 expressziót, magas mTOR-aktivitást mutatnak. Az mTOR C1 és C2 komplexek közötti megoszlása eltérő, KMH2 és BHD1 sejtekben mTORC2 dominancia (magas Rictor, alacsony Raptor expresszió) jellemző, HT58 sejtekben közel azonos a két komplex mennyisége (ICC, 400x).

Az mTORC1-gátló rapamycin a lymphoma-leukémia sejtek mTOR aktivitására gyakorolt hatását 24 h-ás *in vitro* kezelés után Western blot technikával vizsgáltuk. A HT58, BHD1 és KMH2 sejtek esetében egyaránt igazoltuk a rapamycin p-S6 mennyiségét csökkentő hatását (19. Ábra).

a.



b.



19. Ábra: A rapamycin csökkentette a lymphomasejtek mTORC1 aktivitását

a. HL-sejtek (KMH2) mTOR kináz (mTOR, pmTOR) és aktív célfehérjéinek (pp70S6K, pS6) expressziós vizsgálata Western blot-tal. 24h rapamycin kezelést követő mTOR aktivitás csökkenés eredményeként a p-S6 mennyisége szignifikánsan csökkent a vizsgált sejtekben (co: kontroll, R: rapamycin 50 ng/ml). b. A sejtvonalak (BL41/95, HT58: Burkitt-lymphoma, KMH2: HL) eltérő Rictor expressziót mutatnak (Western blot, Rictor, β-aktin)

4.2. Humán lymphoma-biopsziák mTOR-aktivitásának vizsgálata immunhisztokémiával

Első TMA-vizsgálatunkban a lymphomák széles skáláját, gyakorlatilag minden lymphoma típust reprezentáló TMA blokkokon tanulmányoztuk az mTOR szignál aktivitását p-mTOR, p-S6, p-p70S6K immunhisztokémiai reakciók segítségével (5. Táblázat).

A p-S6 festődés negatívnak vagy legfeljebb enyhén pozitívnak (+) volt értékelhető a reaktív, nem malignus lymphocytákban, míg a belső pozitív kontrollnak tekinthető plazmasejtek erős pozitivitást (+++) mutattak.

Az általunk vizsgált marginális zóna lymphomák, perifériás T-sejtes lymphomák, krónikus lymphoid leukemiák esetében a minták túlnyomó többségében gyenge vagy negatív immunhisztokémiai reakciókat kaptunk. Ezekben a lymphomákban tehát az mTOR-szignál fokozott aktivitása nem jellemző. Follikuláris lymphomák (FL) vizsgálatokor ellentmondásos eredményeket kaptunk. A p-S6 festések a FL minták 100%-ában negatívak voltak, viszont a p-mTOR és p-p70S6K az esetek több mint felében kifejezett pozitivitást mutatott. Tőlünk független vizsgálatok szerint is az mTOR aktivitás legmegbízhatóbb IHC markere a p-S6 festés. Ennek a csoportnak az mTOR aktivitását ezért ezen eredmények alapján nem határoztuk meg, ez mindenképpen további vizsgálatokat igényel.

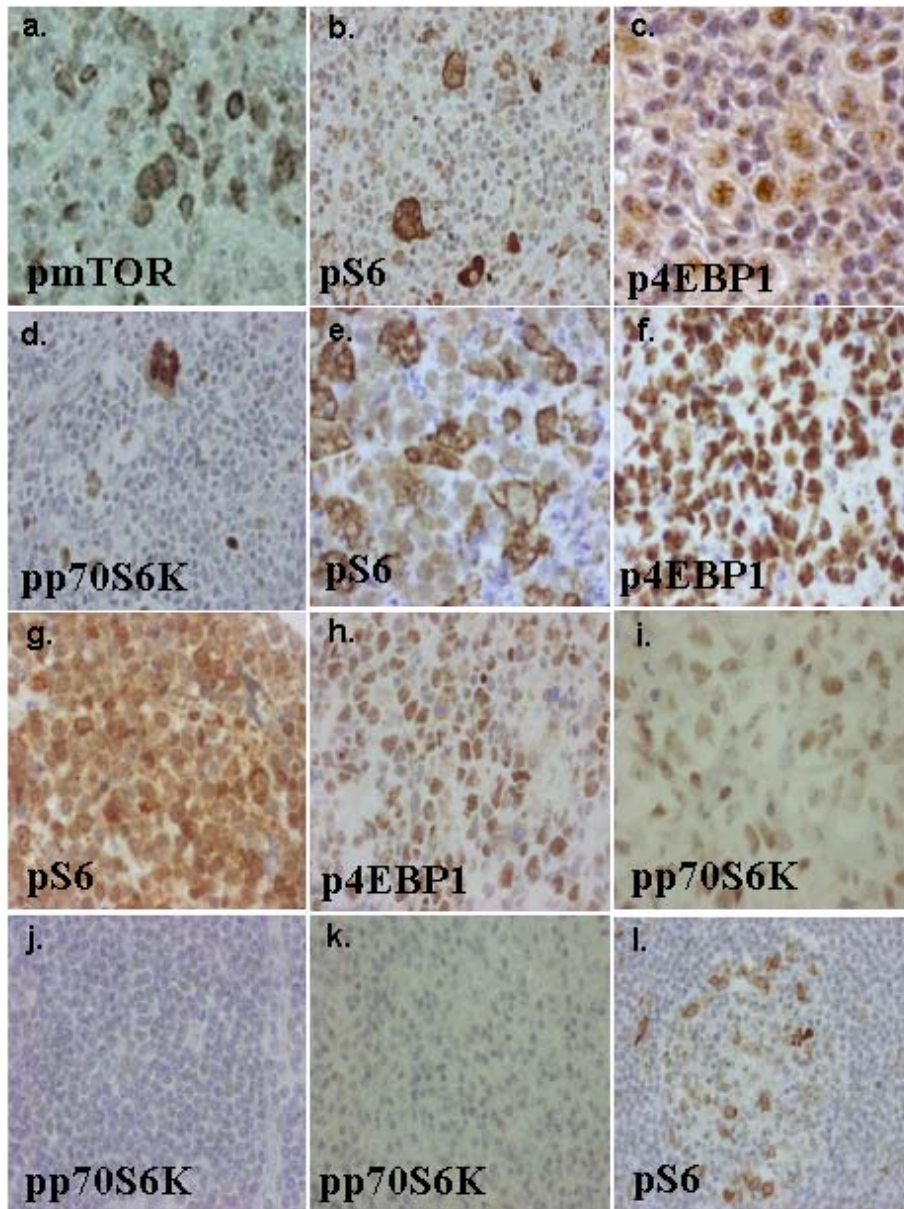
Bizonyos lymphoma típusok - ide tartozik a Hodgkin lymphoma, a diffúz nagy B-sejtes lymphoma (DLBCL), az anaplasiás nagy-sejtes lymphoma (ALCL), köpenysejtes lymphoma, a lymphoplasmocytás lymphoma és a Burkitt lymphoma - magas mTOR aktivitást mutattak (20. Ábra). Ezekben a lymphoma típusokban a sejtekben a vizsgált esetek legalább 50%-ában az mTOR aktivitás a tumort infiltráló reaktív lymphocyták mTOR aktivitásánál - a p-S6, p-p70S6K és p-mTOR IHC alapján - magasabb intenzitással volt értékelhető. A HL-ák ebben az első TMA vizsgálatban (27 eset) az esetek közel 100 %-ában magas mTOR aktivitást mutattak, ez alapján fontosnak tartottuk tovább tanulmányozni ezt a lymphomacsoportot. A DLBCL két alcsoportjában, a centrum germinativum (GC) és a nem centrum germinativum (non-GC) eredetű, (vagy más néven aktivált B-sejtek profilját mutató - ABC) csoportban

eltérő mTOR aktivitást tapasztaltunk, utóbbi rosszabb prognózisú csoportot jellemezte magas mTOR aktivitás, de az alacsony esetszám miatt ezt az eredményt statisztikailag értékelni még nem lehetett. Ezek alapján érdekesnek tartottuk nagyobb esetszámmal tovább tanulmányozni az összefüggést a DLBCL-ek típusai, progressziója és a magas mTOR aktivitás között.

5. Táblázat: Különböző lymphoma típusok mTOR aktivitásának meghatározása

TMA-lemezeken p-mTOR, p-p70S6K és p-S6 -IHC festések értékelése alapján BL, HL, MCL, ALCL és DLBCL mintákban a tumorsejtek magas mTOR aktivitást mutattak. Abban az esetben, amikor a vizsgált minták nem voltak egyformák mTOR aktivitás tekintetében, azt százalékos értékekkel jeleztük az értékelés mellett. (+: magas mTOR aktivitás, -: alacsony mTOR aktivitás, ?: IHC eredményeink alapján nem meghatározható az mTOR aktivitás, n: esetszám)

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

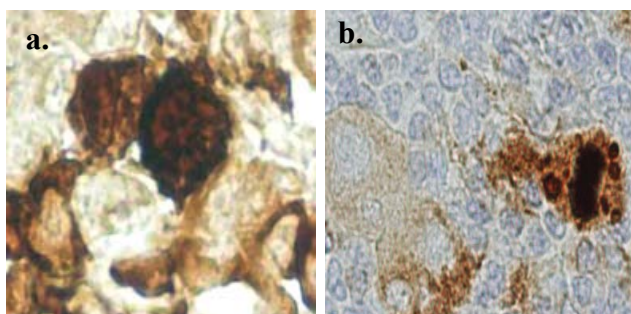


20. Ábra: Különböző lymphomák mTOR aktivitásának vizsgálata TMA lemezeken.

Magas mTOR-aktivitást mutató lymphomák: a-d.: Hodgkin lymphoma, e,f.: Burkitt lymphoma, g.: köpenysejtes lymphoma, h.: DLBCL, i.: anaplasziás nagy-sejtes lymphoma, mTOR-aktivitást nem mutató lymphomák: j.: krónikus lymphoid leukemia/kissejtes lymphoma, k.: marginális zóna lymphoma; l.: reaktív nyirokcsomó (IHC, 200x, 400x).

4.3. Mitotikus lymphoid sejtek mTOR aktivitása

A TMA vizsgálatainkban megfigyeltük, hogy a normál lymphocyták és a lymphoma sejtek között megjelenő osztódó formák magasabb mTOR aktivitással rendelkeznek, mint a nem osztódó alakok (21. Ábra).



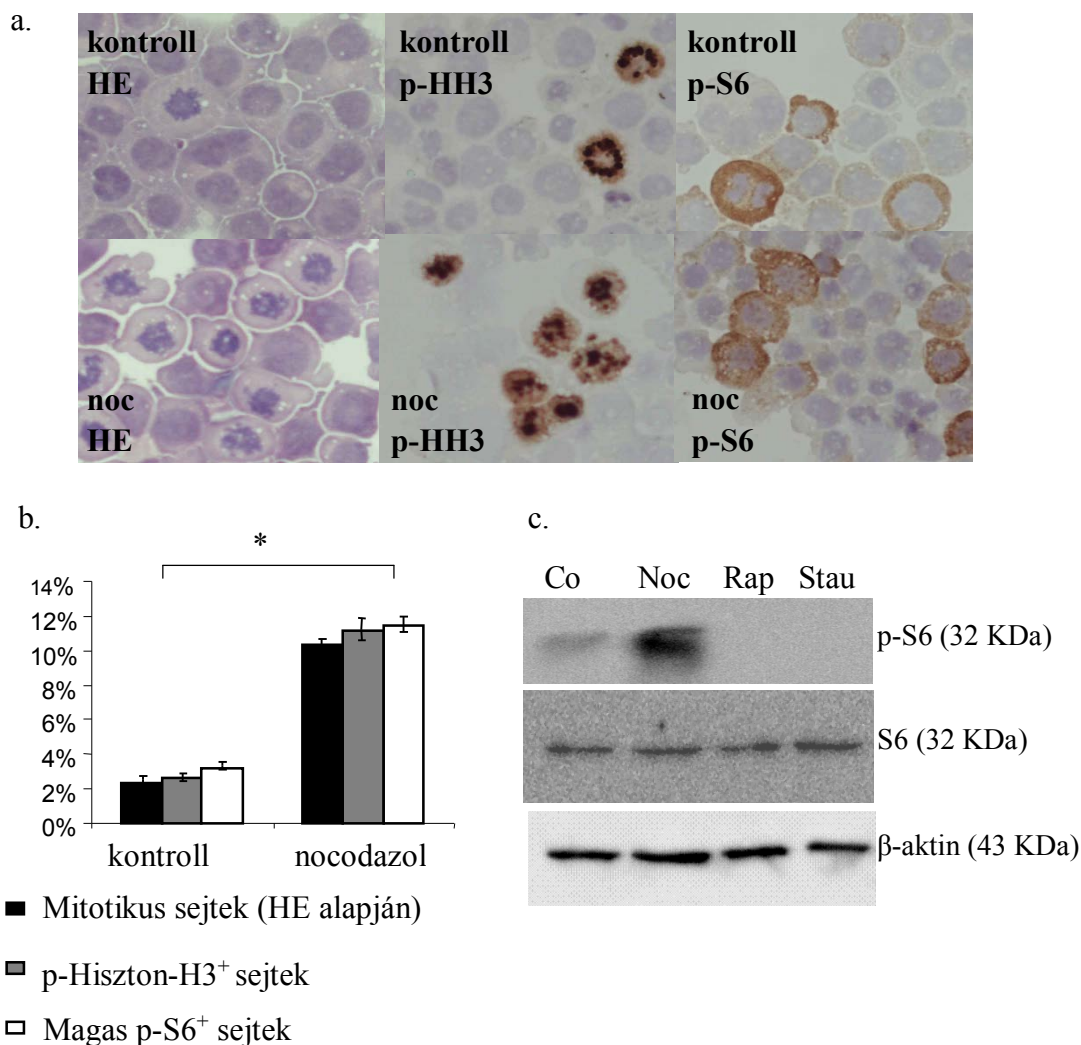
21. Ábra: Mitotikus lymphoid sejtek magas mTOR aktivitást mutattak

Reaktív nyirokcsomóban (a, p-S6 IHC, 400X) és Hodgkin-lymphomában (b, p-HH3, p-S6 kettős immun-reakció, 400x) a mitotikus alakok magasabb mTOR aktivitása IHC-festések alapján.

Ezt a jelenséget lymphoma és leukémia sejtvonalakon vizsgáltuk meg. *In vitro* a sejtciklust szinkronizáló kezeléseket végeztünk. Staurosporin és rapamycin kezelésekkel G1 blokkot idéztünk elő a sejtenyészetekben, nocodazol kezelés után (mikrotubulusok polimerizációját gátolja – mitózis blokkolása) a sejtek felhalmozódtak az osztódási fázisban. Ezek a kezelések lehetővé tették, hogy megfelelő számú sejten tudjuk vizsgálni az adott sejtciklus fázisban lévő sejtek mTOR aktivitását.

Nocodazol kezelés után, az osztódó sejteket p-HH3 ICC festéssel tettük jól láthatóvá, könnyen számolhatóvá, ezeknek az osztódó alakoknak a száma szignifikánsan megnőtt a kezelés hatására (táblázat), párhuzamos citospinekben azonos mértékben emelkedett a magasabb mTOR aktivitást (+++) mutató sejtek mennyisége is. A hematoxilin háttérfestés jól felismerhetővé tette az osztódó sejtekre jellemző kromoszómák elrendeződését, ezek a sejtek intenzív (+++) p-S6 festést mutattak. A staurosporin és az mTOR gátló rapamycin kezelések proliferáció gátló hatását is

kimutattuk, 24 h-val rapamycin és staurosporin kezelést követően az osztódási alakokkal párhuzamosan a magas mTOR aktivitást mutató sejtek is gyakorlatilag teljesen eltűntek a citospin készítményekben (22. Ábra).



22. Ábra: A sejtciklust befolyásoló, szinkronizáló kezelések hatása a p-S6 fehérje mennyiségének változására

a: p-HH3 és p-S6 ICC festés 24h nocodazol kezelés után. b: A mitotikus alakokat HE-lemezeken számoltuk, a p-HH3 pozitív sejtek és a +++ p-S6 sejtek arányát az ICC-t követően számoltuk le (HL sejtvonala: KMH2, 400x). Az erős p-S6 pozitivitást mutató sejtek aránya, a mitotikus alakokkal megegyező mértékben emelkedett meg a kontrollhoz képest ($p < 0,05$). c: A kezelések hatására változó S6 aktivitás kimutatása Western blottal KMH2 sejteken.

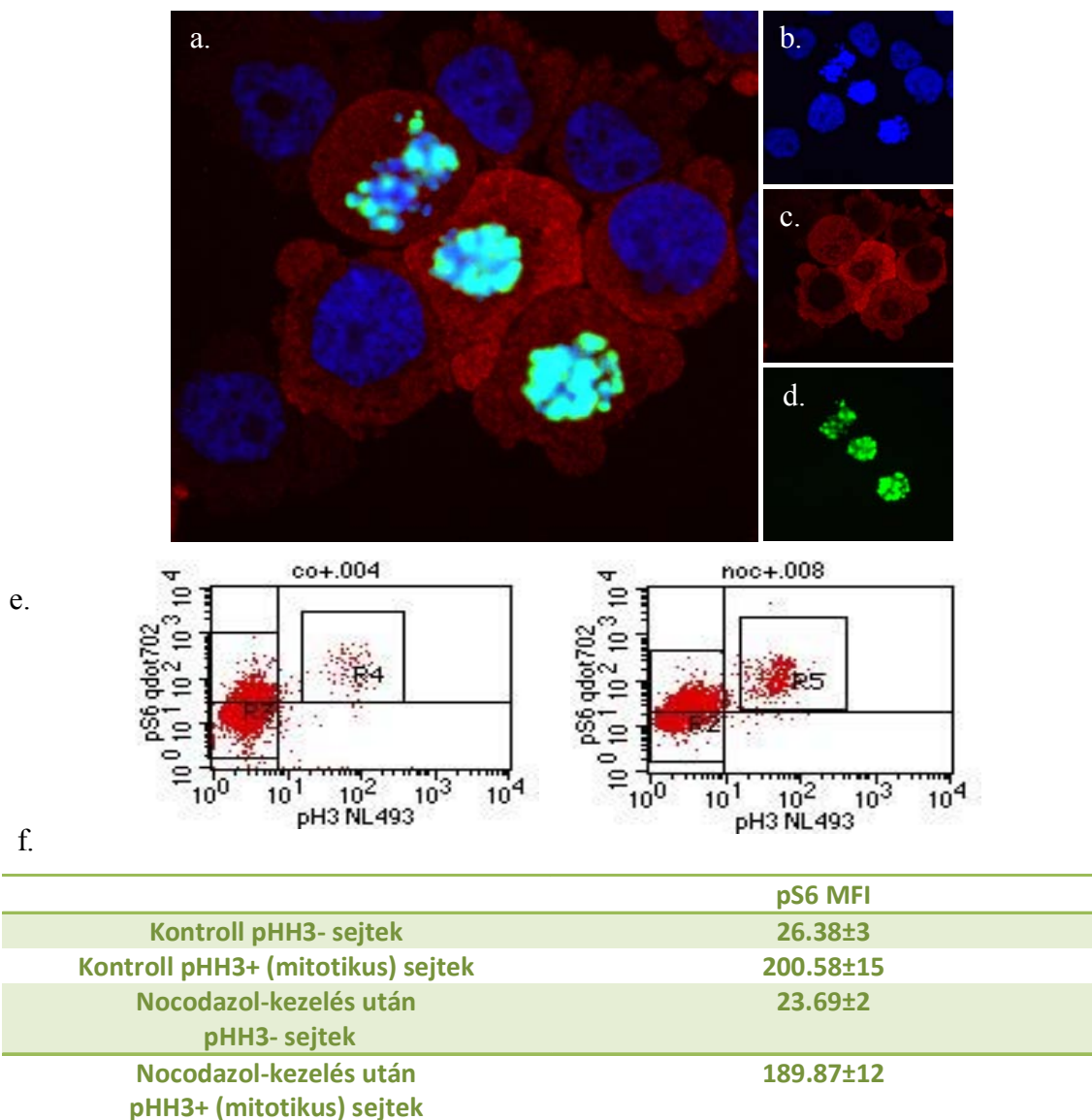
Western blot segítségével is igazoltuk a tenyészetekben az mTOR aktivitásának változásait nocodazol, staurosporin és rapamycin kezelés után. A riboszomális S6 fehérje mennyisége a kezelt és kezeletlen kontroll tenyészetekben megegyező, míg a fehérje foszforilált formáinak mennyisége az mTOR aktivitás változásával párhuzamosan változott. Eszerint az osztódási alakokban feldúsult tenyészetben a p-S6 mennyisége fokozódott, míg az osztódási alakok számának jelentős csökkenésével párhuzamosan a rapamycin és staurosporin kezelt tenyészetekben foszforilált S6 fehérje mennyisége nem éri el a Western blot technikával kimutatható mértéket, a kontroll szint alá csökkent.

Kettős fluoreszcens ICC jelölést alkalmazva áramláscitometria és konfokális mikroszkóp segítségével is megvizsgáltuk az osztódó sejtek mTOR aktivitását, p-S6 expresszióját a sejtciklus egyéb fázisaiban lévő sejtekéhez képest (23. Ábra). Kettős immunreakciók (p-S6 és p-HH3) segítségével vizsgáltuk a fokozott p-S6 expresszió (fokozott mTOR aktivitás) és a mitózis viszonyát lymphoma sejtekben. Kontroll és nocodazol kezelt tenyészetekben vizsgáltuk áramlási citométer és konfokális mikroszkóp segítségével a kettősen (p-S6 és p-HH3) festett, illetve nem kettősen pozitív sejteket.

Fluoreszcens ellenanyagokkal festett készítményeket áramlási citométerrel vizsgálva a kontroll sejtekben kevesebb osztódási alak (p-HH3+) figyelhető meg, míg a nocodazol kezelés után ezek aránya jelentősen emelkedik. A kontroll és nocodazol kezelt mintákban egyaránt találhatóak kettősen pozitív (p-HH3, p-S6) sejtek, ezek száma a nocodazol kezelt tenyészetekben a kezelés következtében jóval magasabb. Az is megfigyelhető, hogy a kettős pozitív sejtek mTOR aktivitását jellemző p-S6 festődés intenzitása (mean érték) hasonlóan magas a kontroll és a kezelt tenyészetekben, 10X magasabb, mint a p-HH3 negatív (nem osztódó) sejteké. Ezzel a vizsgálattal egyértelműen sikerült igazolnunk, hogy az osztódó lymphoid sejtekben az mTOR aktivitásra jellemző p-S6 fehérje mennyisége emelkedett (23. Ábra).

Egyéb nem lymphoid tumorokban (carcinoma, sarcoma) és tumorsejtvonalakban az osztódó daganatsejtekben nem tudtuk az alap p-S6 pozitivitáshoz képest emelkedettebb p-S6 pozitivitást egyértelműen kimutatni [119].

Az mTOR aktivitás emelkedése, a foszforilált riboszomális S6 fehérje mennyiségének megemelkedése eddigi eredményeink szerint az osztódó normál lymphoid és lymphoma sejtek egyik jellegzetessége.

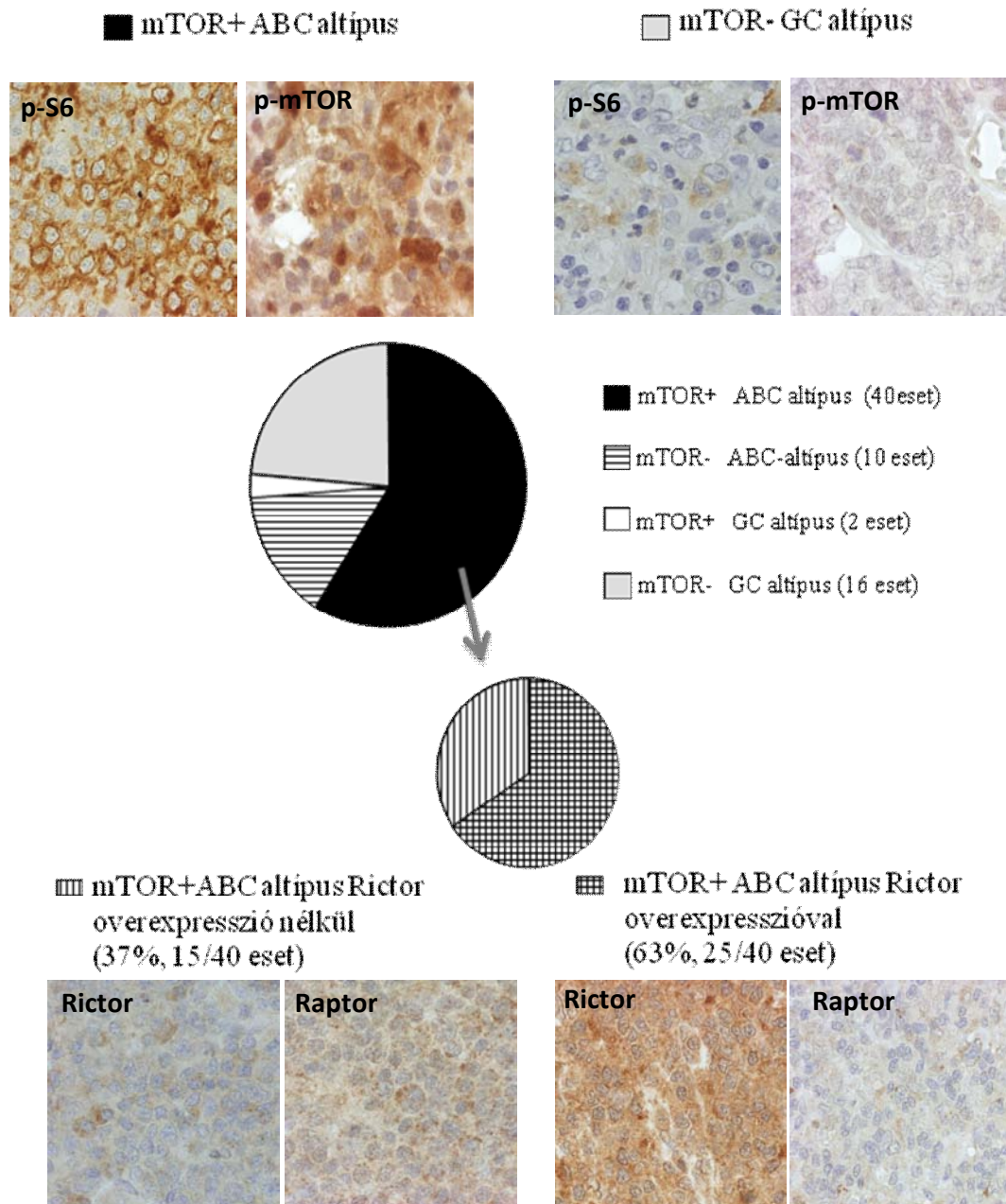


23. Ábra: Intenzív p-S6 és p-Hisztin H3 festés kolokalizációja osztódó lymphoma sejtekben a-d: Kettős fluoreszcens immunfestés konfokális mikroszkópiával (KMH2, 400x, b: sejtmagfestés: DAPI-kék, c: p-S6 citoplazmatikus piros jelölés, d: p-HH3 sejtmagi zöld reakció). e: Kettős fluoreszcens immunfestés áramlási citométerrel. Nocodazol kezelés hatására megnőtt az intenzív p-S6 festést mutató sejtek mennyisége dotplot grafikonon ábrázolva (KMH2-Hodgkin lymphoma sejtvonala). f: Az átlagos fluoreszcencia intenzitások (MFI) emelkedtek az osztódó sejtekben.

4.4. DLBCL és HL magas esetszámú vizsgálata

4.4.1. DLBCL

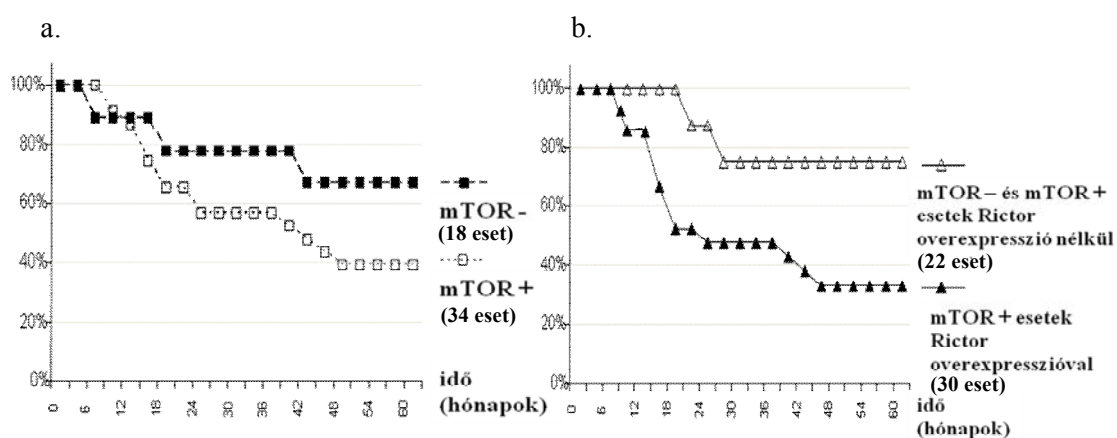
TMA lemezeken DLBCL-ás betegek biopsziás mintáit vizsgáltuk. Az mTOR aktivitás jellemzéséhez és a DLBCL altípus meghatározáshoz szükséges IHC reakciókat is elvégeztük, összegyűjtöttük a betegek klinikai és túlélési adatait. 68 humán biopsziás mintának IHC értékelését sikerült elvégezni minden esetben. Magas p-S6 (IHC-vel legmegbízhatóbb markere az mTOR aktivitásnak) expresszió 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 (mTOR aktív, mTOR+), míg a jelenlegi kezelési lehetőségek mellett jobb prognózisú csiraközpont eredetű DLBCL-ák (GC-DLBCL) esetében gyakorlatilag nem tudtunk mTOR aktivitást (mTOR inaktív, mTOR-) kimutatni (18 esetből csak kettőben találtunk enyhe pS6 pozitivitást). Ezekben az esetekben értékeltük a két különböző mTOR komplexre jellemző fehérje, a Raptor és a Rictor IHC eredményeket is. Az összes eset 43%-ában fokozott Rictor expressziót figyeltünk meg, az mTOR aktív esetek közel kétharmadát (63%) jellemezte a magas Rictor expresszió, illetve a Raptorhoz képest domináns Rictor expresszió (legalább + különbség a két fehérje IHC reakciójának értékelésében, ld. módszerek; 24. Ábra, 6. Táblázat).



24. Ábra: Diffúz nagy B-sejtes lymphomák mTOR aktivitásának és Rictor, Raptor expressziójának vizsgálata.

Az ABC/non-GC-DLBCL-ben szignifikánsan több magas mTOR aktivitású eset tartozott, amelyek többsége Rictor overexpressziót mutatott (IHC, 200x)

A 68 esetből értékelhető, 5 éves vagy annál hosszabb követési adatokkal 52 betegnél rendelkezünk. Ezekben az esetekben statisztikailag elemeztük a betegek klinikai adatait az IHC-eredményekkel összehasonlítva. Szignifikáns összefüggést találtunk az mTOR aktivitás és a DLBCL altípusok megoszlása között. Magas mTOR aktivitású esetekben szignifikánsan magasabb volt a Rictor overexpresszió előfordulása is. Összefüggést találtunk a betegek túlélési adatai és az mTOR aktivitás között. Az emelkedett mTOR aktivitás, az ABC/nonGC eredetűhöz hasonlóan negatív prognosztikai faktorként jellemezte a betegséget. Az 5 éves túlélési (overall survival) adatokat az mTOR aktivitás függvényében ábrázoltuk. Kimutattuk, hogy az alacsony mTOR aktivitással (mTOR-, mTOR inaktív) jellemezhető DLBCL-ás betegek túlélése szignifikánsan jobb, mint a magas mTOR aktivitásúaké (mTOR+, mTOR aktív). Az alacsony mTOR aktivitású esetekhez hasonlóak a Rictor overexpresszió nélküli (mTORC1 dominancia), de magas mTOR aktivitású esetek túlélési adatai. Ezek szerint az mTORC2-höz (Rictor overexpresszió) kapcsolható mTOR aktivitás szignifikánsan rosszabb túlélési eredményekkel függ össze (25. Ábra).



25. Ábra: DLBCL-ás betegek 5 éves túlélése (Kaplan-Meier görbe) és az mTOR aktivitás összefüggései 52 beteg (42 ABC/non-GC-DLBCL, 10 GC-DLBCL) túlélési adatainak és mTOR aktivitásának elemzése alapján. a: A magas mTOR aktivitás (mTOR+) rosszabb prognózissal járt együtt (34 mTOR+ eset: 33 non-GC, 1 GC). b: A Rictor domináns magas mTOR aktivitással jellemzett betegek prognózisa volt a legrosszabb (30 eset: 29 non-GC, 1 GC). Szignifikánsan jobb prognózist mutattak az alacsony mTOR aktivitású (18 eset, mTOR-) és a magas mTOR aktivitású, de Rictort nem overexpresszáló esetek (4 non-GC) ($p < 0,05$).

6. Táblázat: DLBCL-TMA vizsgálatban szereplő esetek klinikai jellemzőinek kapcsolata az mTOR aktivitással

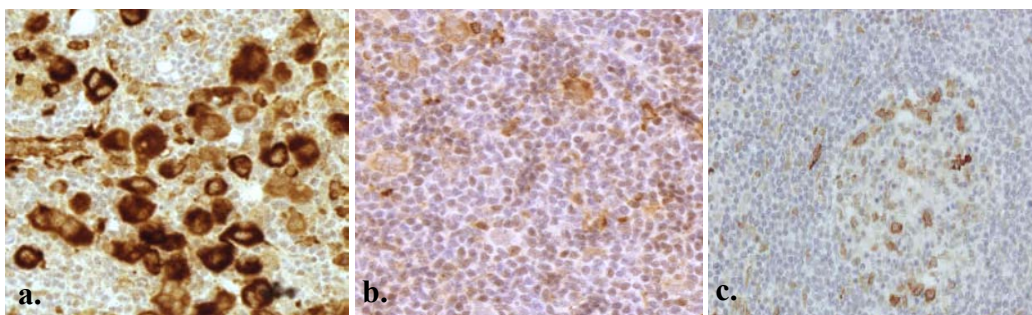
Az ABC/non-GC altípust szignifikánsan magasabb mTOR aktivitás jellemezte (*p<0,05)

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

4.4.2. Hodgkin lymphoma

Összesen 83 Hodgkin lymphomás beteg biopsziás mintáit vizsgáltuk és megállapítottuk, hogy a Hodgkin lymphomákat általánosan magas mTOR aktivitás jellemzi (77/83, 92,7%) a szövettani altípustól függetlenül (26. Ábra, 7. Táblázat). Összesen 72 betegnél ismerjük a teljes klinikai kórtörténetet, ezeknél az eseteknél összevetettük a betegség lefolyását az mTOR aktivitással (6 alacsony és 66 magas mTOR aktivitású eset). A legtöbb esetben a magas mTOR aktivitás ellenére a betegek komplett remisszióba kerültek (53/66, 80%). Azok a betegek, akikben a daganatsejtek alacsony mTOR aktivitást mutattak (6 eset) a komplett remisszió 5 éves betegségmentes túléléssel járt a betegek 100%-ában. A betegség következtében elhunyt betegek esetében (10 eset), pedig kivétel nélkül magas mTOR aktivitást mutattunk ki.

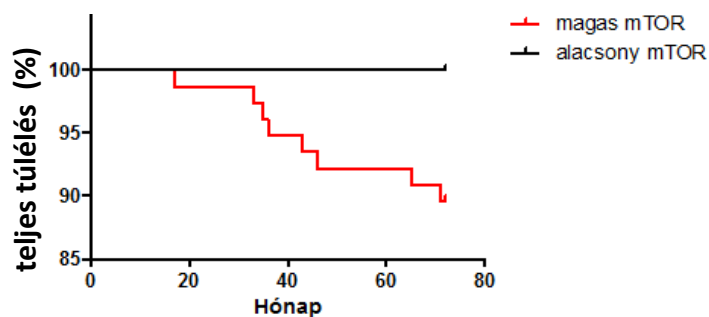
Az összes vizsgált esetet (n=83) elemezve az alacsony mTOR aktivitást mutató betegek teljes túlélése a hat éves követési periódusban 100% (6/6), a magas mTOR aktivitású betegeké 85% (66/77) volt, ez a különbség nem szignifikáns az alacsony mTOR aktivitású betegek kis száma miatt (27. Ábra).



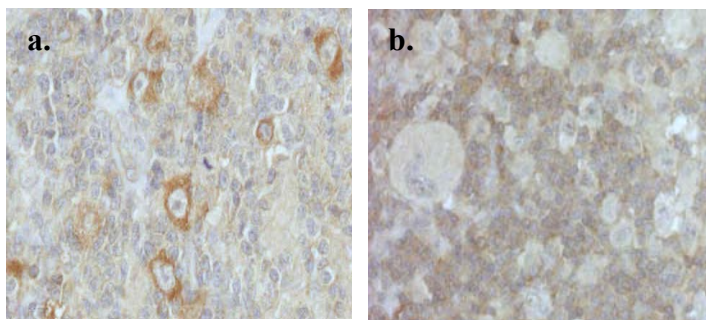
26. Ábra: Hodgkin lymphomák mTOR aktivitása

A megvizsgált esetek 93%-a (77/83) magas mTOR aktivitást (a.) mutatott. Az alacsony mTOR aktivitású esetek (b.) a nyirokcsomóval (c.) összevethető mértékű expressziót mutattak (IHC, 200x).

Megvizsgáltuk, hogy Hodgkin lymphomák más daganatokhoz, pl. az előbb bemutatott DLBCL-ekhez hasonlóan mutatnak-e mTORC2 dominanciát. Utóbbira az mTOR komplexek jelenlétére jellegzetes fehérjék, a Raptor és a Rictor expressziójából, IHC vizsgálatából következtethetünk. A DLBCL esetek 43%-ban kimutatott Rictor dominancia a HL-ekben nem jellemző. Bár a HL sejtvonalakban ICC vizsgálatunkban kifejezett Rictor expressziót találtunk (ld. korábban), a humán szövetmintákban 83 beteg mintáját megvizsgálva csak 1 esetben tudtunk Rictor overexpressziót kimutatni (28. Ábra)



27. Ábra: Hodgkin lymphomás betegek túlélése és mTOR-aktivitása közti összefüggés Kaplan-Meier görbén ábrázolva az eredményeket nem találtunk szignifikáns korrelációt (log-rank teszt $p=0,42$).



28. Ábra: Az mTOR két komplexének vizsgálata Hodgkin lymphomában.

HL-ben nem jellemző az mTORC2-komplexhez köthető mTOR aktivitás, egy esetben találtunk Rictor overexpressziót (a.), a többi eset nagyon alacsony Rictor expressziót mutatott (b.) (IHC, 400x).

7. Táblázat: HL-TMA vizsgálatban szereplő esetek klinikai jellemzőinek kapcsolata az mTOR aktivitással

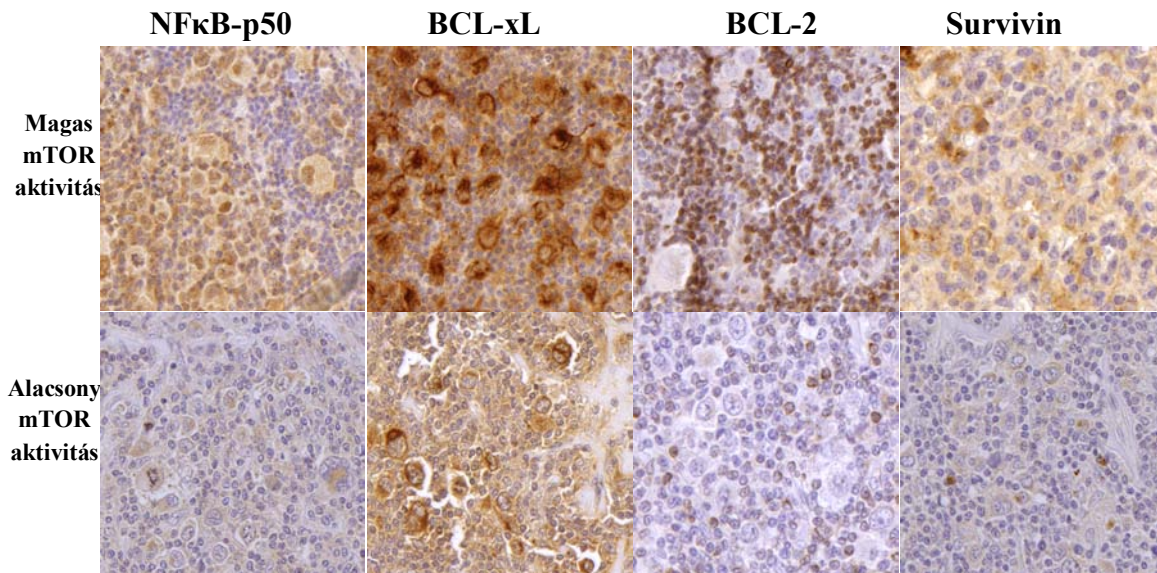
(NS: nodular sclerosis, MC: kevertsejtes, LR: lymphocyta gazdag, LD: lymphocyta depléciós altípus, CR: komplett remisszió)

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

4.5. mTOR aktivitás lehetséges targetjei HL-ben

4.5.1. Antiapoptotikus fehérjékkel kapcsolatos vizsgálatok

A Hodgkin-Sternberg/Reed sejtek jellegzetessége bizonyos antiapoptotikus fehérjék magas expressziója. Az NFκB-p50 transzkripciós faktor jellegzetes magi és a BCL-xL citoplazmatikus pozitivitása az általunk vizsgált mintákban kifejezett volt. Citoplazmatikus BCL-2 expressziót az esetek közel 30%-a mutatott, Survivin pozitivitást a minták 65%-ában láttunk, jellegzetesen sejtmagi és citoplazmatikus reakciókkal (29. Ábra). Vizsgálatunkban a BCL-xL és a NFκB-p50 fehérjék expressziója és az mTOR aktivitás között feltételeztünk összefüggést, de Fisher's exact teszttel nem találtunk szignifikáns korrelációt ($p=0,07$).

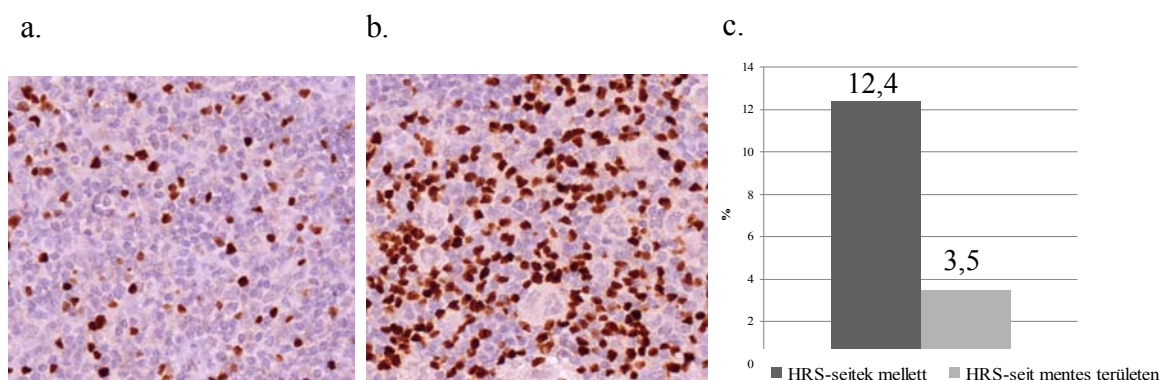


29. Ábra: Antiapoptotikus fehérjék expressziója magas és alacsony mTOR aktivitású mintákban (IHC, 200x).

4.5.2. Hodgkin lymphomás esetekben a mikrokörnyezet bizonyos tényezőinek vizsgálata

Regulátor T sejtek előfordulása HL biopsziás minták Hodgkin/Sternberg-Reed-sejtekben gazdag és tumorsejtmentes területein

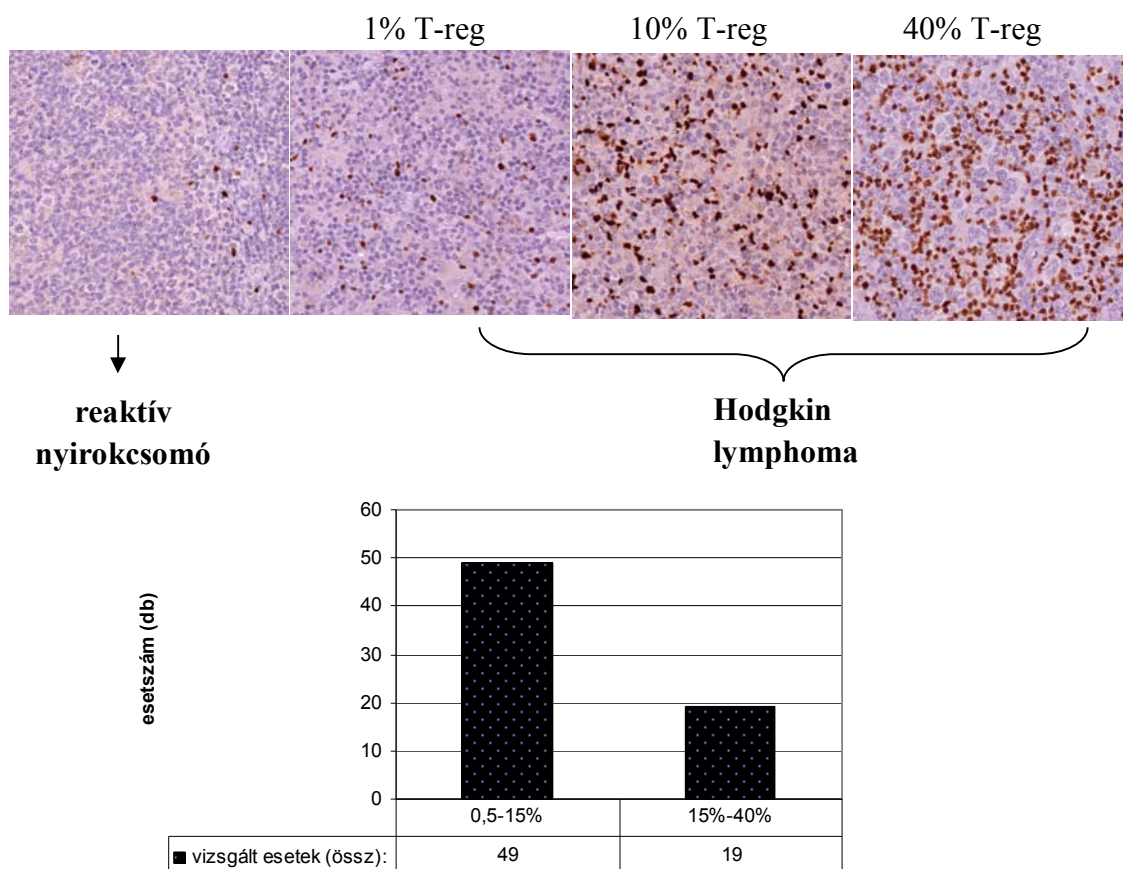
Hodgkin lymphomákban a tumorsejtek mikrokörnyezetében nagy mennyiségű FOXP3 pozitív regulátor T-sejtet (Treg-sejt) mutattunk ki. Összehasonlítottuk a vizsgált biopsziás mintákon belül a tumorsejt (HRS) gazdag és tumorsejt (HRS) mentes területeken a Treg-sejtek gyakoriságát. Szignifikánsan nagyobb mennyiségben fordultak elő Treg-sejtek a HRS-sejtek közvetlen környezetében, mint a tumorsejtektől távolabbi területeken, ami a Treg-sejtek és HRS-sejtek közti együttműködés lehetőségét veti fel (30. Ábra).



30. Ábra: Regulátor T-sejtek a tumorsejtek mikrokörnyezetében.

HRS sejtekben gazdag területen (a.) és HRS mentes területen (b.) a FOXP3 magi pozitivitás és kiértékelésének eredménye (c.) (IHC, 200x, Mirax software, $p < 0,01$).

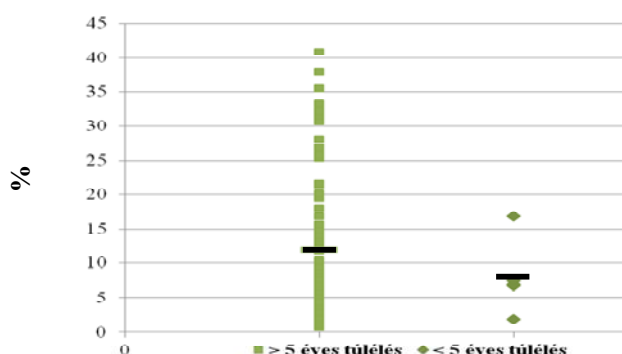
Összesen 68 HL beteg biopsziás mintájában vizsgáltuk meg a Treg-sejtek mennyiségét a HRS-sejtek környezetében. 49 betegnél az összes sejt kevesebb mint 15%-át alkották Treg-sejtek, 19 betegnél 15%-nál magasabb volt a Treg-sejtek mennyisége a tumorban, 40%-ot nem haladta meg egy esetben sem ez az érték (31. Ábra). A regulátor T-sejtek %-os megoszlása a HL altípusaival nem mutatott korrelációt.



31. Ábra: Treg-sejtek mennyiségi meghatározása HL mikro környezetében

A betegek többségére 0,5-15% Treg mennyiség volt jellemző, ami a normál szövetekhez képest emelkedett expressziót jelent (IHC, 200x).

Összevetettük a Treg-sejtek vizsgálata során kapott százalékos értékeket a betegek klinikai adataival. A regulátor T-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 (32. Ábra).



32. Ábra: A regulátor T-sejtek mennyisége és a prognózis kapcsolata

A Treg-sejtek magasabb mennyisége (17%-nál magasabb) 100%-os, 5 évet meghaladó túléléssel párosult.

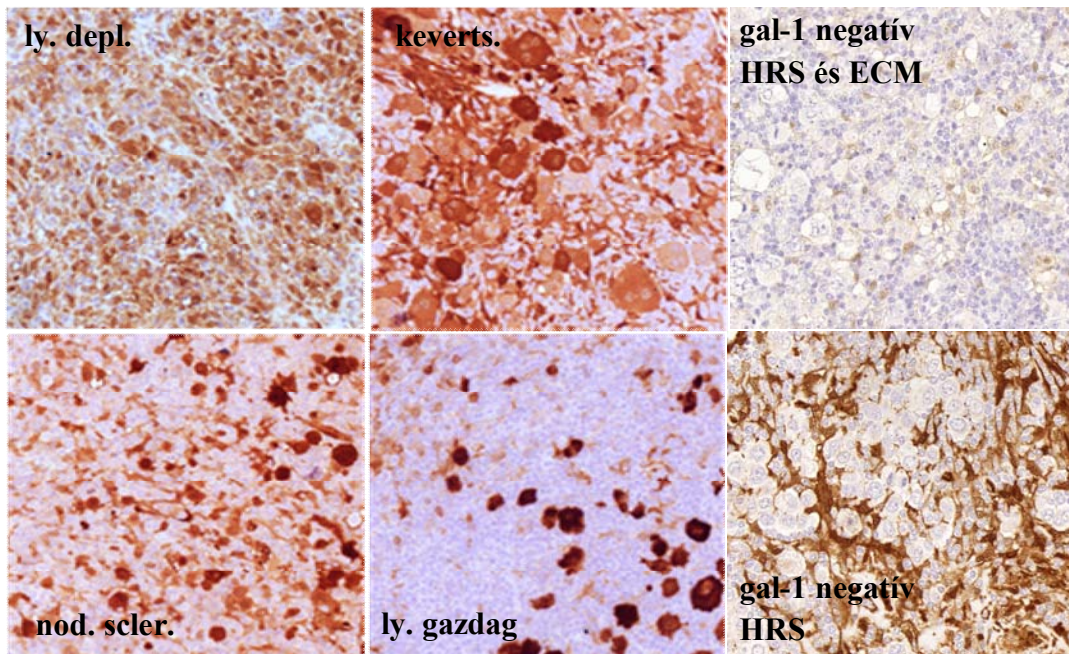
Galektin-1 expresszió lymphoma sejtvonalakban és HL biopsziás esetekben

Irodalmi adatok szerint a galektin-1-nek fontos szerepe lehet a regulátor T-sejtek toborzásában és a túlélésében. Megvizsgáltuk különböző lymphoma/leukemia sejtvonalak galektin-1 expresszióját RNS és fehérjeszinten. Kimutattuk, hogy a Hodgkin lymphoma sejtvonalak izolált normál B-, és T-sejteknél magasabb galektin-1 expressziót mutatnak, míg más általunk eddig vizsgált sejtvonalak a normál sejtekhez hasonló mértékben (DLBCL, hisztiocitás lymphoma és AML sejtvonalak) vagy nem expresszálnak galektin-1-et (Burkitt lymphoma, ALL sejtvonalak). Az RNS és fehérje szintű galektin-1 expressziós eredményeink jól korreláltak egymással (34. Ábra).

73 Hodgkin lymphomás beteg biopsziás mintáin végeztük el a galektin-1 expresszió vizsgálatát immunhisztokémiai jelölés alapján. A galektin-1 fehérjének jelentős expresszióját figyeltük meg a tumorsejtekben és az ECM-ban egyaránt az esetek többségében (63/73, 86%). A galektin-1 expresszió alacsony volt vagy nem jelent meg a tumorsejtekben az esetek 14%-ában (10/73). 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

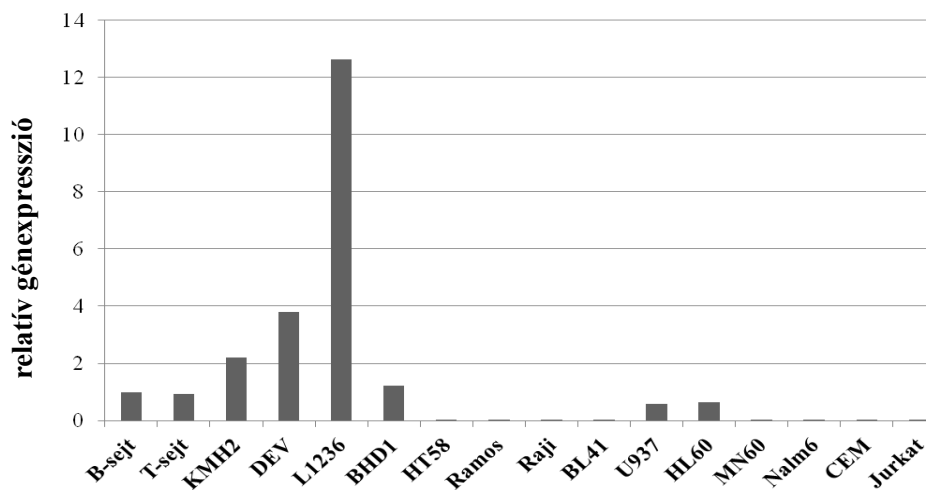
hiányzott a galektin-1 expresszió. A galektin-1 expressziós mintázat nem mutatott különbséget a különböző altípusok esetében (33. Ábra).

A regulátor T-sejtek mennyisége és a galektin-1 expresszió közti összefüggések vizsgálatát 68 esetben tudtuk elvégezni. 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.

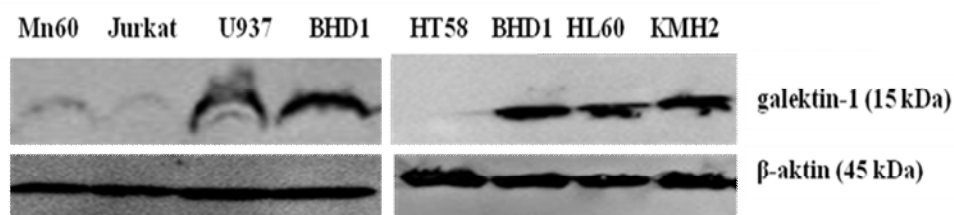


33. Ábra: Galektin-1 expresszió a különböző klasszikus HL szövettani altípusokban (nod. scler.: nodular sclerosis, ly. gazdag: lymphocita gazdag, ly. depl.: lymphocita depléciós, keverts.: kevertsejtes; IHC, 200x)

a.



b.



34. Ábra: Galektin-1 expresszió vizsgálata lymphoma/leukemia sejtvonalakban

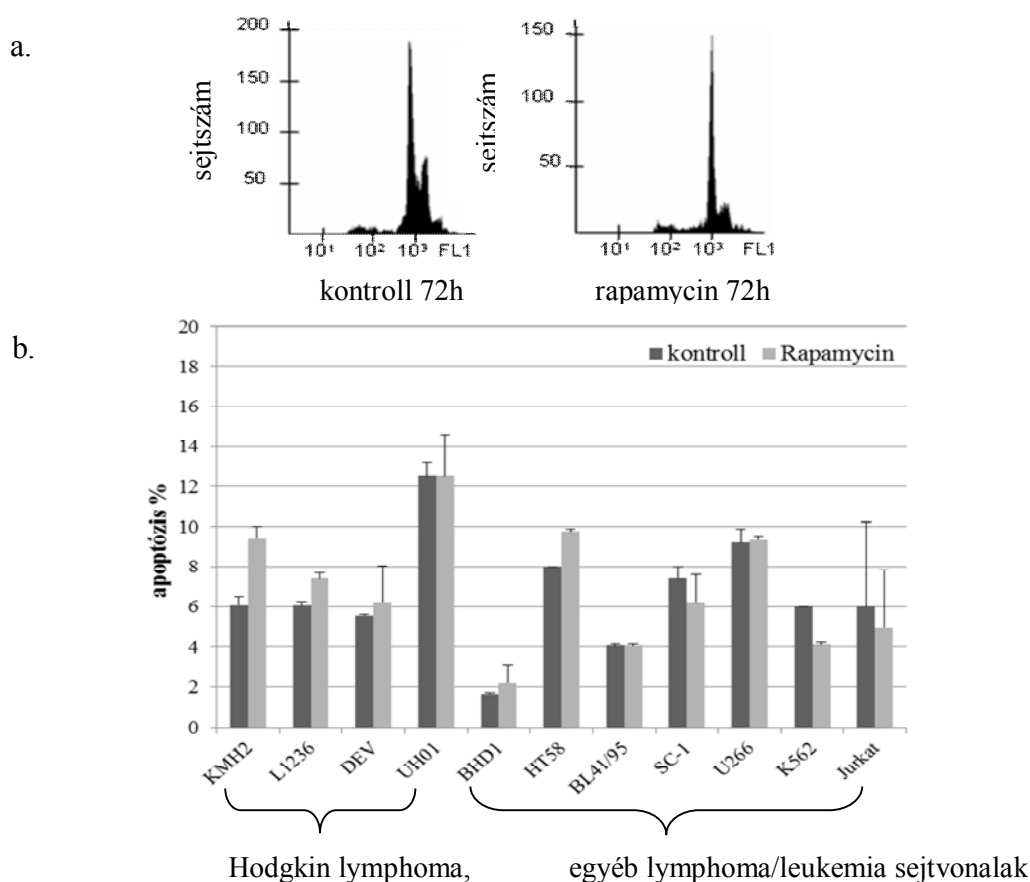
a: Galektin-1 mRNS expresszó különböző lymphoma/leukemia sejtvonalakban normál B sejtekhez viszonyítva (KMH2, DEV, L1236-HL, BHD1-DLBCL, HT58, Ramos, Raji, BL41- Burkitt-ly, U937-hisztiocitás lymphoma, HL-60-AML, MN60, Nalm-6-B-ALL, CEM, Jurkat- T-ALL; galektin-1 real-time PCR).

b: Lymphoma sejtvonalak galektin-1 expressziója (WB)

4.6. mTOR gátlók hatásának vizsgálata lymphomákban *in vitro*

4.6.1. Rapamycin hatása

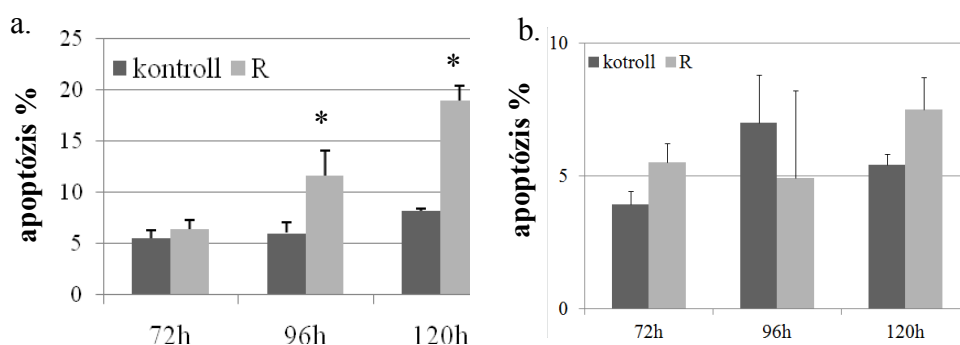
Különböző lymphoma/leukemia sejt vonalakat kezeltünk klasszikus és új generációs mTOR gátlókkal. Az indukált apoptózis (áramlási citométer) és a proliferációgátlás (Alamar blue assay) mértékét 24-72 órás kezelés után vizsgáltuk. Az mTOR-gátló kezelés után minden vizsgált esetben kifejezett G1 blokkot figyeltünk meg, ami proliferációgátlást eredményezett, de a spontán apoptózis mértéke ennyi idő alatt nem emelkedett (35. Ábra).



35. Ábra: Rapamycin *in vitro* hatása

a. G1 blokk bemutatása a KMH2 sejt vonalban b. apoptózisindukció hiánya 72 h kezelés után valamennyi vizsgált sejt vonalban (KMH2, L1236, DEV, UH-01-Hodgkin ly, DLBCL-mediasztinális diffúz nagy B-sejtes ly, HT58, BL41/95-Burkitt ly, SC-1-follikuláris ly, U266-myeloma multiplex, K562-CML, Jurkat-T-ALL; FL1: fluoreszcencia intenzitás)

A rapamycin hatását hosszabb (120h-144h) kezelési idő után KMH2 (HL) és BHD1 (DLBCL) sejtvonalakban vizsgáltuk. 4-5-6 napos kezelés (természetesen a médiumok megfelelő frissítése és a rapamycin pótlása mellett) KMH2 sejtekben már szignifikánsan növelte az apoptózis mértékét, míg BHD1 sejtekben nem tapasztaltunk a spontán apoptózisnál magasabb értékeket (36. Ábra).



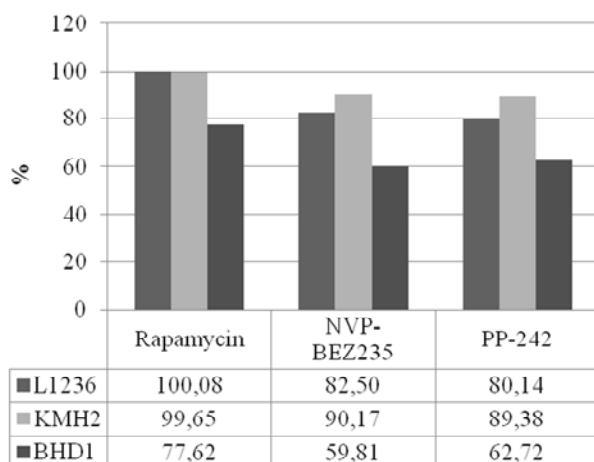
36. Ábra: A rapamycin hosszú távú hatása KMH2 (a.) és BHD1 (b.) sejtvonalon

(apoptózis mérés áramlási citométerrel, 72-120 h, R: rapamycin, 50ng/ml,

*: kontrollhoz képest szignifikánsan emelkedett az apoptózis mértéke; $p < 0,05$)

4.6.2. Dual inhibitor kezelések hatása

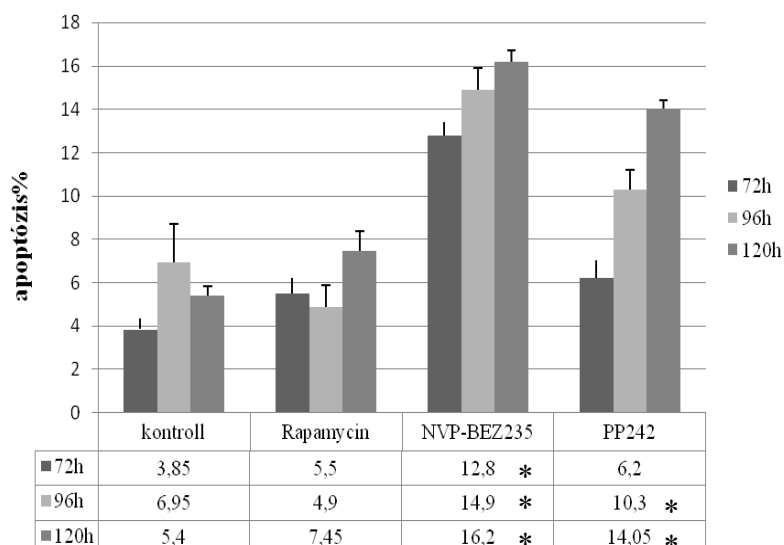
TMA vizsgálataink szerint a Hodgkin lymphomákra nem jellemző a Rictor dominancia, a DLBCL ABC-altípusában viszont kifejezett Rictor overexpressziót láttunk. Összehasonlítottuk az mTORC2 aktivitását is gátló duál inhibitorok (NVP-BEZ-235 és PP-242) és a rapamycin *in vitro* hatását HL és DLBCL sejtvonalakon. A duál inhibitorok HL sejtvonalakban és DLBCL sejtekben is a rapamycinnél nagyobb mértékben csökkentették a sejtek proliferációját (37. Ábra).



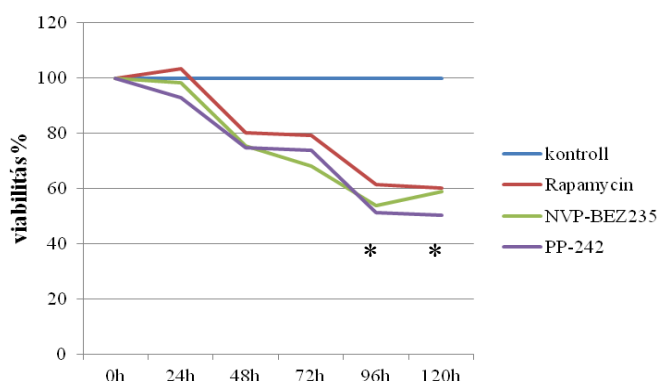
37. Ábra: Rapamycin és duál-inhibitor kezelések hatásának összehasonlítása

Hodgkin-lymphoma (KMH2, L1236) és DLBCL (BHD1) sejtvonalakon. A viabilitás értékeket ábrázoltuk a kontrollhoz képest (72 h, Rapamycin 50 ng/ml, NVP- BEZ235- 1 μ M, PP-242- 1 μ M, Alamar blue-teszt, nincsenek szignifikáns eltérések).

Összehasonlítottuk a rapamycin és a duál inhibitorok hatását BHD1 sejtvonalban. A rapamycinnel kezelt csoportban az apoptózis százalékos aránya nem emelkedett a kontroll csoportban mért fölé. Ezzel szemben a duál inhibitorok közül az NVP-BEZ235 72 h kezelés után már apoptózist indukált, 96 és 120 h-nál pedig mindkét duál inhibitor szignifikánsan emelte az apoptózist (38-39. Ábra).



38. Ábra: Klasszikus és új generációs mTOR-gátló kezelések összehasonlítása DLBCL (BHD1) sejtvonalon (apoptózis mérés áramlási citométerrel: 72-120 h, *: $p < 0,05$)

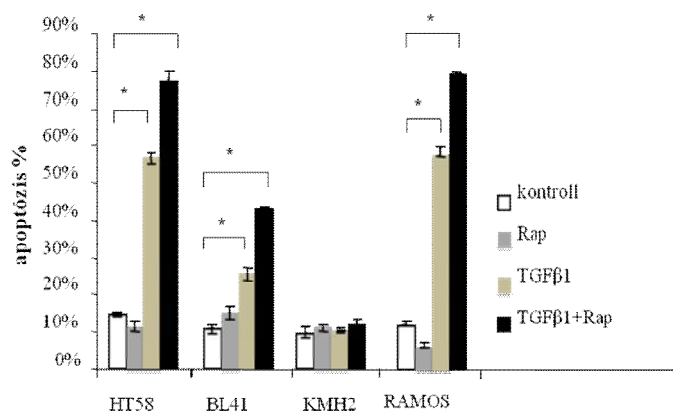


39. Ábra: klasszikus és új generációs mTOR-gátló kezelések összehasonlítása DLBCL (BHD1) sejtvonalon *: szignifikáns proliferációgátló hatás mindhárom szerrel 96 és 120h-nál ($p < 0,05$); Alamar blue-teszt:24-120h)

4.6.3. Rapamycin kezelés kombinációban

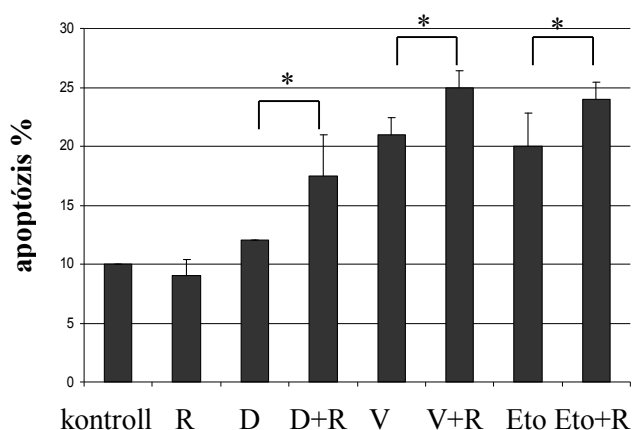
Számos esetben fokozhatja a rapamycin jól ismert kemoterápiás szerek hatását, akár felfüggesztheti a kezelőszerrel szemben kialakuló/kialakult rezisztenciát. Saját *in vitro* vizsgálatainkban különböző lymphoma sejtekben vizsgáltuk a rapamycin hatását a TGF β kezeléssel kombinációban, a TGF β érzékenység fokozásában illetve a lymphomák kezelésében használt kemoterápiás szerekkel kombinációban.

A rapamycin fokozta a TGF β apoptózist indukáló hatását (HT58, BL41, Ramos) és bizonyos a TGF β hatásaival szemben rezisztens sejtekben (HT58r) helyreállította a TGF β érzékenységet is (40. Ábra).



40. Ábra: Kombinációs kezelések hatásának vizsgálata. A Rapamycin-kezelés emeli a TGF β 1 apoptotikus hatását bizonyos lymphoma sejtvonalakban (HT58, BL41, Ramos-Burkitt lymphoma, KMH2-Hodgkin lymphoma; 72 h, apoptózismérés áramlási citometriával, $*p < 0,05$).

Kombinációban bizonyos szerek esetén az indukált apoptózis mértékének fokozódását láttuk. A rapamycin HL sejtekben *in vitro* fokozta az indukált apoptózis mértékét doxorubicin, vincristin és etoposide mellett (41. Ábra).



41. Ábra: Kombinációs kezelések hatásának vizsgálata

(KMH2, 72 h). (R: rapamycin 50 ng/ml, D: doxorubicin 0,2 μ M/ml, V: vincristin 10 nM/ml, Eto: etoposide 1 μ M/ml, *: szignifikáns apoptózis emelkedés, $p < 0,05$)

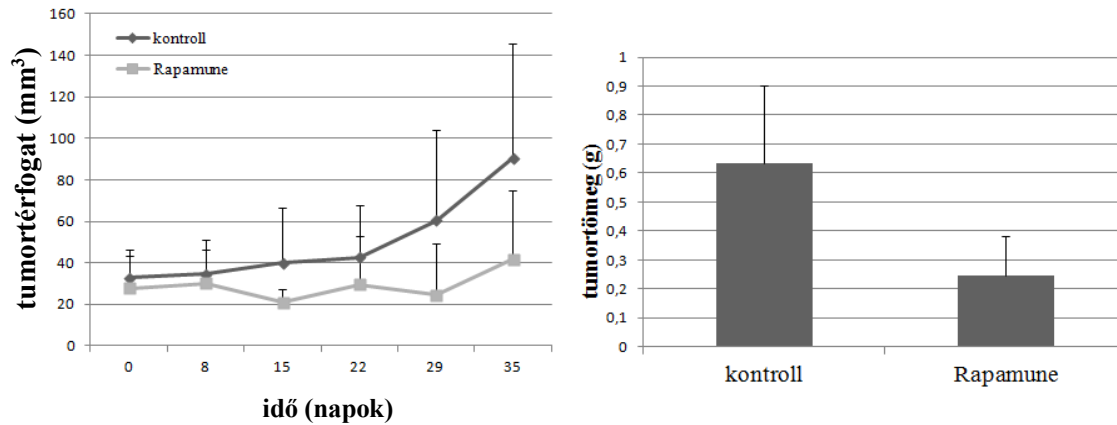
4.7. mTOR gátlók hatásának vizsgálata lymphoma xenograftokban *in vivo*

Hodgkin, Burkitt és DLBCL xenograftokban végeztünk mTOR-gátló kezeléseket rapalógokkal. A kezelések hatására mindhárom xenograft modellben csökkent a tumorok növekedése a kontrollhoz képest (42. Ábra, 8. Táblázat), a tumortömegek a kísérlet végén szignifikánsan alacsonyabbak voltak a kontroll csoportok tumortömegéhez képest. Legnagyobb különbséget a leggyorsabb növekedésű Burkitt lymphoma modellben mutattunk ki. A HT58 (BL) sejteket közvetlen beoltva két héten belül már tapintható daganatok alakultak ki, míg a HL és DLBCL xenograftok létrehozása többlépcsős oltást igényel.

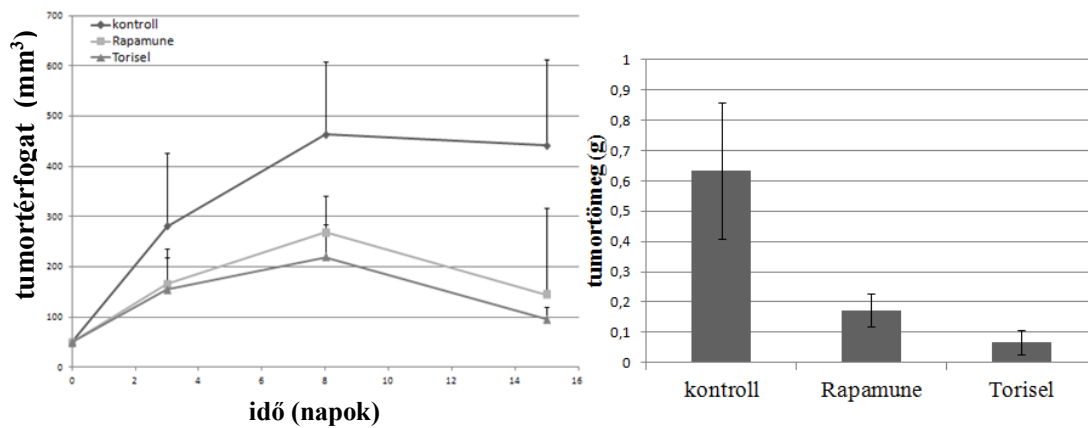
8. Táblázat: Az *in vivo* mTOR-gátló kezelések végén mért tumortömegek

	HL-xenograft	DLBCL-xenograft	BL-xenograft
kontroll	0,65 g	0,63 g	5,29 g
kezelt (Sirolimus)	0,25 g	0,17 g	1,67 g
(Temsirolimus)		0,07 g	

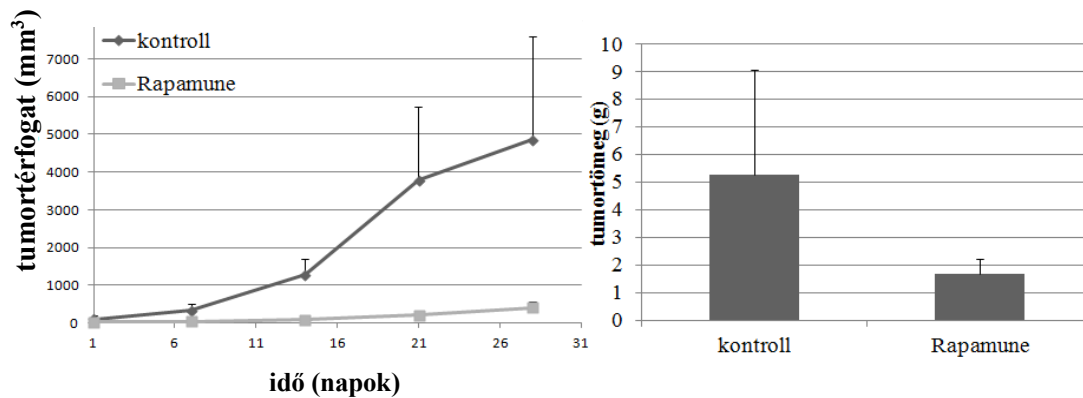
1. Hodgkin lymphoma xenograft



2. DLBCL xenograft



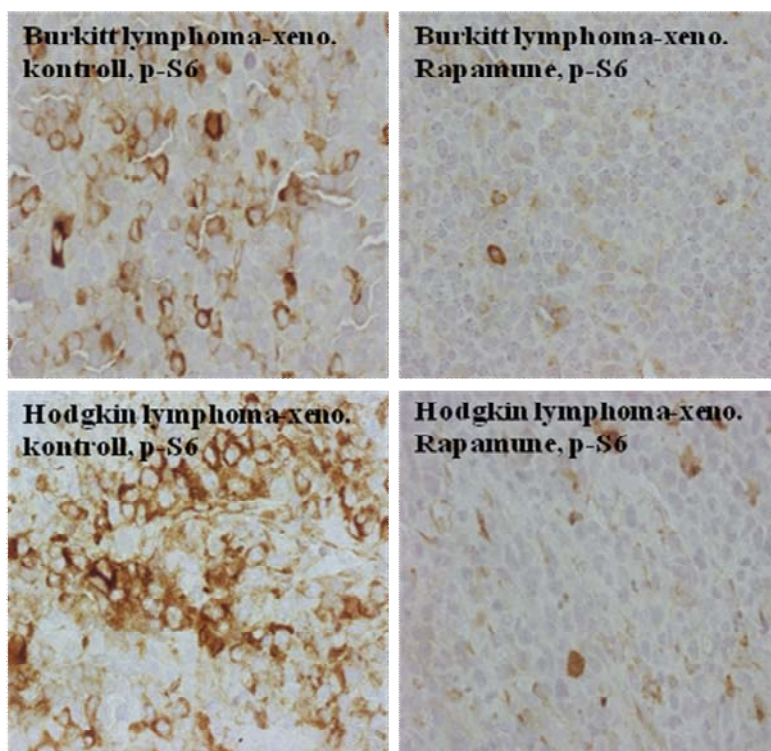
3. Burkitt lymphoma xenograft



42. Ábra: Az mTOR-gátló kezelés csökkentette a tumornövekedést lymphoma xenograft modellekben.

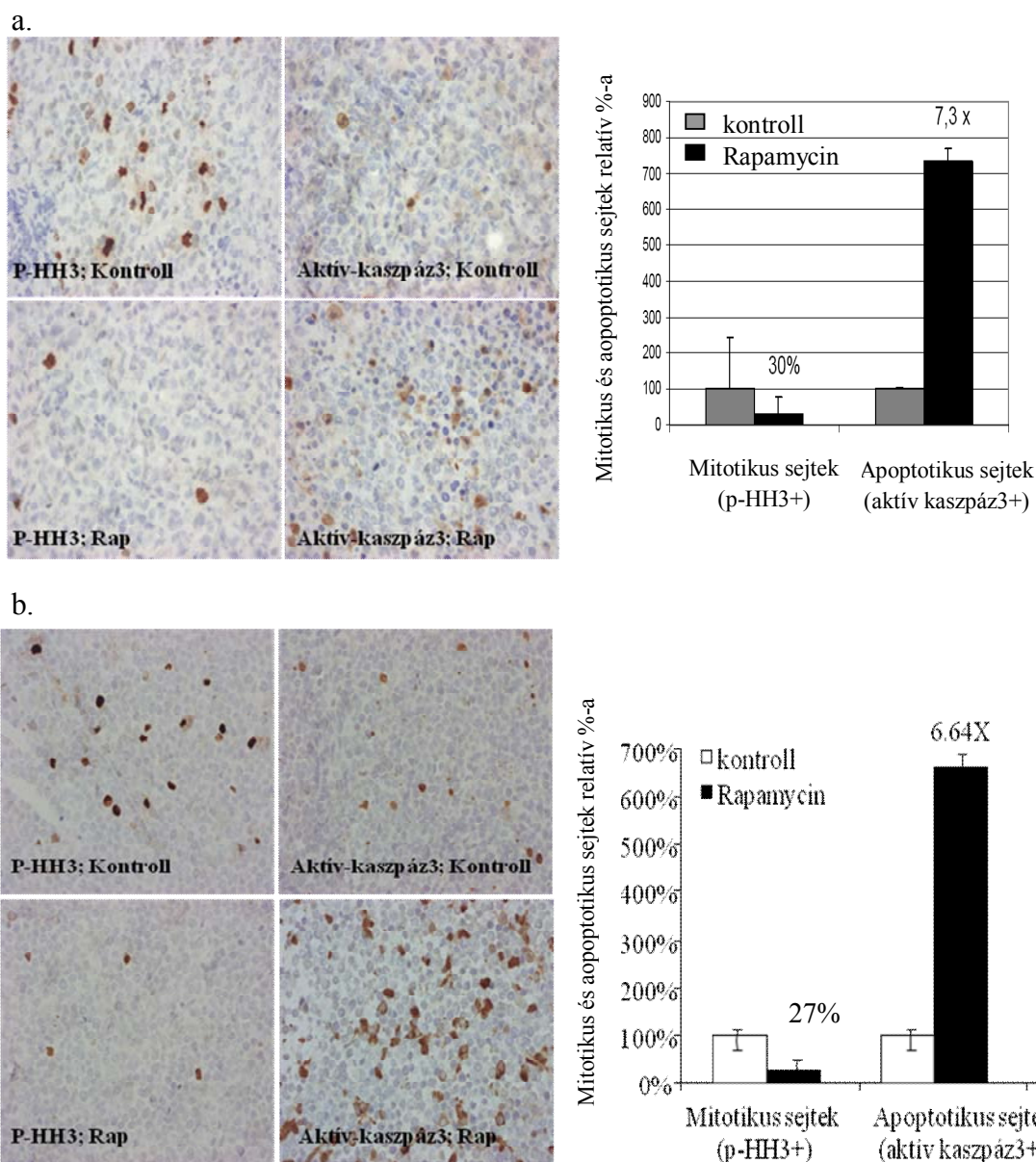
A grafikonok a kísérlet közben mért tumortérfogat változásokat és a kísérlet végén mért tumortömegeket ábrázolják.

A kezelt tumorok megváltozott, csökkent tumornövekedésének hátterét vizsgálva az eltávolított mintákban igazoltuk az mTOR aktivitás csökkenését (43. Ábra) és vizsgáltuk a proliferáció mértékének és a spontán apoptózis mértékének változásait. A sejtproliferációt a mitotikus alakokban megjelenő foszfo-hisztón H3 (p-HH3) molekula IHC vizsgálatának segítségével mutattuk ki. A kezelt csoportban a kontrollhoz képest szignifikánsan kevesebb p-HH3 pozitív sejtet számoltunk a különböző xenograftokban. KMH2 xenograft esetében a proliferáció mértéke a kontroll 30%-ára esett vissza. Az apoptózis szöveti metszetekben legmegbízhatóbb és legérzékenyebb markerének az aktív kaszpáz-3-nak IHC kimutatásával a tumoron belül az apoptotikus sejtek arányát tudtuk meghatározni. A rapamune *in vivo* szignifikánsan emelte az apoptózist mértékét. KMH2 esetében a kimutatható apoptózisok száma több, mint 7-szeresére emelkedett (44. Ábra). A BHD1 és az *in vivo* gyorsabb növekedésű HT58 xenograftok esetében is hasonló mértékű proliferációs és apoptotikus változást tapasztaltunk, ami egyértelműen jelzi a rapamune kezelése *in vitro* kifejezett apoptotikus hatásait már monoterápiában is.



43. Ábra: Xenograft tumorok IHC-vizsgálata

Lymphoma xenograftok (HL és BL) mTOR aktivitása magas, amely mTOR-gátló kezelés (Rapamune) hatására *in vivo* is csökkent (Hodgkin lymphoma (KMH2) xenograft és Burkitt lymphoma (HT58) xenograft, IHC, 400x)

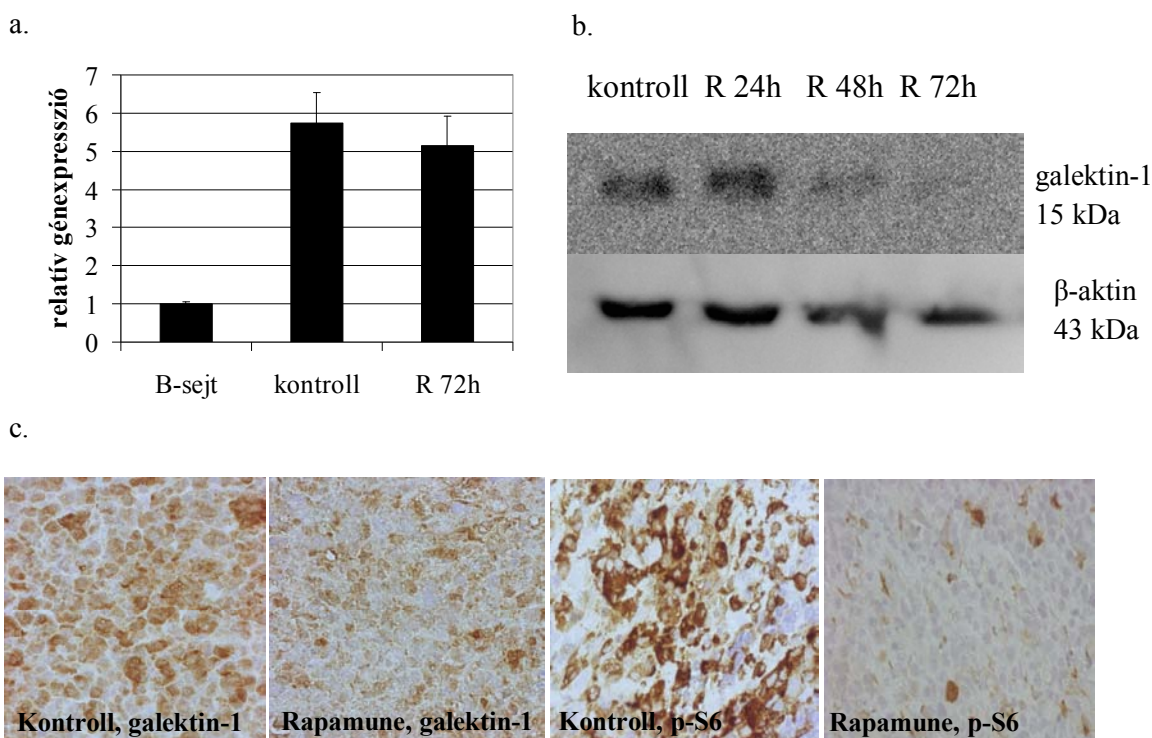


44. Ábra: *In vivo* proliferációgátlás és apoptózisindukció rapamycin kezelést követően

A xenograft tumorokban proliferációs (p-HH3) és apoptotikus (aktív kaspáz-3) markerekkel végeztünk IHC vizsgálatokat, majd összehasonlítottuk a kontroll és mTOR-gátlóval kezelt csoportokat. Reprezentatív IHC, 200x, p-HH3, aktív kaspáz-3, szignifikáns különbségek ábrázolása a kontroll és kezelt csoportok proliferációja és apoptotikus aktivitása között. (a.: Hodgkin lymphoma xenograft; b: Burkitt lymphoma xenograft)

4.8. mTOR aktivitás és galektin-1 expresszió kapcsolata

A Hodgkin lymphoma sejtvonalak és a biopsziás minták vizsgálata során jelentős galektin-1 expressziót és mTOR aktivitást mutattunk ki. Rapamycinnel kezelt HL sejtekben real-time PCR és Western blot technika segítségével követtük a galektin-1 mRNS és fehérje expresszió változását. Az mTOR aktivitás gátlása HL-sejtekben transzkripciós szinten nem befolyásolta a galektin-1 szintet (real-time PCR), viszont translációs 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 nem csak *in vitro*, hanem *in vivo* is (45. ábra).



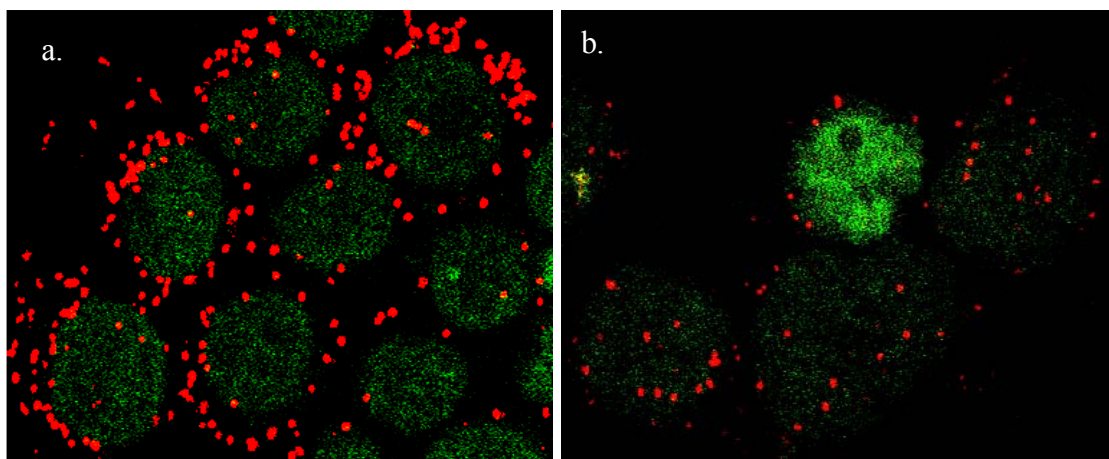
45. Ábra: Az mTOR-gátló kezelések hatásának vizsgálata a galektin-1 expresszióra

a: A galektin-1 mRNS-ének transzkripciója nem változott mTOR-gátlás hatására. (Real-time PCR, normál B-sejtekhez viszonyítva; kontroll: KMH2, R: rapamycin 50 ng/ml).

b: Az mTOR gátlás csökkentette a galektin-1 termelést fehérjeszinten. Az mTOR aktivitás csökkenésével párhuzamosan csökkent a galektin-1 expresszió *in vitro* Hodgkin lymphoma sejtekben (WB, KMH2, R: rapamycin 50 ng/ml) és *in vivo* HL-xenograftban (c, Rapamune: 3 mg/tkg, IHC 200x).

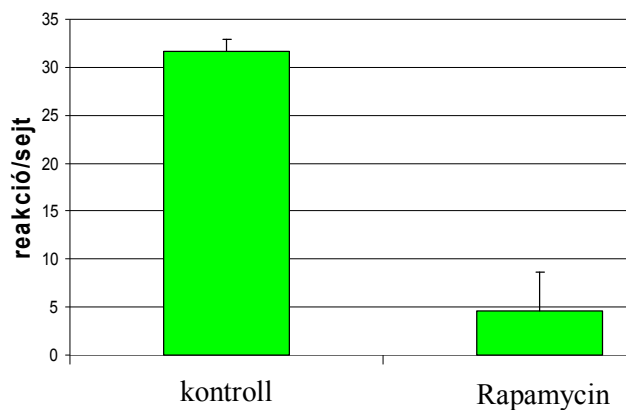
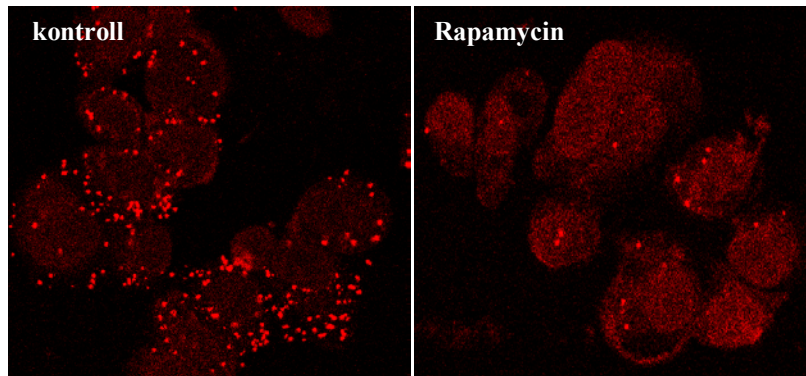
4.9. Az mTOR aktivitás in situ vizsgálata

A sejtek mTOR aktivitásának meghatározása különböző foszfoproteinek kimutatásán keresztül nem könnyű. Az mTOR aktivitásának pontos, kvantitatív in situ meghatározása érdekében a Duolink technika beállítását kezdtük meg, amely foszfoproteinek mennyiségének in situ kvantitív értékelését tenné lehetővé, illetve a technika kifejlesztői szerint fehérje-fehérje komplexek kimutatására alkalmas kvantitatív módszer is. Munkánk során beállítottuk sejtvonalakon p-S6 (az aktív riboszomális S6) mennyiségi vizsgálatára a Duolink technikát. Többféle cytospin fixálási technika közül meghatároztuk, hogy 4%-os paraformaldehid fixálás és permeabilizálás (Triton-X-100) mellett működik a p-S6 illetve S6 ICC festés és a Duolink előhívási módszer is (46. Ábra). Bizonyítottuk, hogy a módszer adott foszfo-protein (p-S6) mennyiségi változásait valóban kvantitatív módon képes meghatározni *in vitro* rapamycin kezelt sejtek cytospin preparátumain (47. Ábra). Lymphoma sejtvonalakon Rictor és mTOR kettős ICC vizsgálatot is végeztünk Duolink előhívással. A különböző lymphoma sejtvonalakban az mTORC2 komplexek mennyisége kvantitatívan összehasonlítható lehet, a komplex mennyiségének változása követhetővé válik (48. Ábra). Megkezdtük a technika beállítását formalinban fixált paraffinos anyagokon nem fluoreszcens, tormaperoxidáz (HRP) konjugált technikával is.



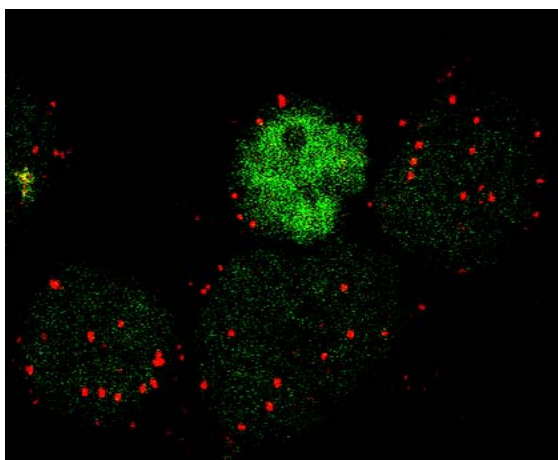
46. Ábra: mTOR aktivitás kimutatása Duolink-technikával

A vizsgálatban egérben termeltetett elsődleges S6- ellenanyagot, (Cell Signaling) és nyúlban termeltetett elsődleges p-S6- ellenanyagot (Cell Signaling) használtunk. (a: BHD1-DLBCL-sejtvonal, b: DEV-HL-sejtvonal; piros: pontszerű pozitív reakció, zöld: sejtmagok autofluoreszcenciája; 1000x)



47. Ábra: mTOR-gátlás hatásának meghatározása Duolink módszerrel

P-S6 mennyiségi változásainak kvantitatív meghatározása *in vitro* rapamycin (50 ng/ml, 24 h) kezelt sejtek cytospin preparátumain (MDA-MB-241 emlőcarcinoma sejtek, Blobfinder software-rel értékelve; piros: pontszerű pozitív reakció; 1000x).



48. Ábra: mTORC2 aktivitás kimutatása Duolink módszerrel

Rictor- egérben termeltetett elsődleges ellenanyag, Bethyl lab.; mTOR-nyúlban termeltetett elsődleges ellenanyag, Bethyl lab., DEV-Hodgkin lymphoma sejtvonal (piros: pontszerű pozitív reakció, zöld: sejtmagok autofluoreszcenciája; 1000x).

5. MEGBESZÉLÉS

Az mTOR-aktivitás szabályozásának zavara, függetlenedése a szabályozó faktoroktól számos neopláziás folyamatban bekövetkezhet és fennmaradhat. A daganatkeletkezésben lényeges folyamatként felsorolt [1, 2] számos mechanizmust befolyásol az mTOR kináz nem megfelelően szabályozott aktivitása [9]. Az elmúlt évtizedben megindultak a különböző típusú daganatok mTOR aktivitásával kapcsolatos legkülönbözőbb *in vitro*, patológiai és klinikai vizsgálatok egyaránt. Ehhez a témához kapcsolódó vizsgálatokat végeztünk humán lymphomák, elsősorban a HL-ek és a DLBCL-ek mTOR aktivitásának és gátlásának feltérképezésével. Munkánk alapján számos a klinikai vizsgálatok és a terápiafejlesztés számára is fontos, eddig nem közölt, új megállapításokra jutottunk.

5.1. Humán HL és DLBCL biopsziás eredmények

5.1.1. Hodgkin lymphoma

Hazai HL-ás betegek klinikai adataiban a nemzetközi adatokkal megegyezően a vizsgált esetek 10%-át a betegség előrehaladott stádiuma, kedvezőtlen prognózis jellemzi [120]. Utóbbi betegeknél a 10 éves teljes túlélés alig haladja meg a 40 %-ot és gyakorlatilag minden betegnél „esemény” (progresszió/kiújulás/halál) következik be. A kétféle prognózisú betegcsoport kezelés szempontjából fontos kihívásokat jelent. A betegek többségénél, ahol jó prognózis várható, a terápia kialakításánál és a kezelés során, a jövőbeni terápiai fejlesztésekben a kedvezőtlen késői mellékhatások csökkentése egy fontos szempont, hiszen többségében fiatal betegekről van szó. A betegek tizedénél azonban, a rossz prognózisú csoportban a terápia hatékonyságának emelése a cél [120, 121]. Mindkét esetben szükség van még a kezelési protokollok további fejlesztésére.

Napjainkban az egyik legjelentősebb irányzat a terápia hatékonyságával kapcsolatos fejlesztésekben a célzott daganatellenes szerek kutatása. Ezek a szerek kritikus, a daganatnövekedés és progresszió szempontjából kulcsfontosságú molekuláris célpontokat támadnak. A HL-ák esetében ilyen célpont lehet a tumorsejtek felszínén nagy mennyiségben jelen levő CD30, mert ezen keresztül adott terápiás szer daganatsejtekhez történő specifikus eljuttatása valósulhat meg, jelenleg ilyen

ellanyag-gyógyszer konjugátumokkal (Brentuximab vedotin) folynak már vizsgálatok [122]. Előbbi mellett hiszton deacetiláz inhibitorokkal (panobinostat), mTOR gátlókkal (everolimus) és immunomodulátor anyagokkal (lenalidomide) végeznek még fázisvizsgálatokat HL-ák esetében [123]. A standard terápiával is jó gyógyulási eredményeket mutató daganatokban, mint a HL esetében is a célzott szerek bevezetése azonban sokkal nehezebb. A HL terápiája változott ugyan az elmúlt évtized során, pl. az alkilezőszerek elhagyásával a szekunder malignus daganatok megjelenésének kockázata csökkent, a technikai feltételek javulásával minimalizálták a betegek sugárterhelését és a képpalkotó technikák fejlődésével a betegek stádium meghatározása és követése is hatékonyra vált [124], de a HL-ák kezelési protokolljába az utóbbi 30 évben nem vezettek be új hatóanyagokat, célzott daganatellenes szereket.

Eredményeink alapján a Hodgkin lymphomás betegek tumorainak túlnyomó többségét (92%) magas mTOR-aktivitás jellemzi, ami potenciális terápiai célpont lehet. HL-sejtvonalakban és ezzel párhuzamosan néhány humán nyirokcsomó biopsziában is kimutatták már korábban a magas AKT és ezzel összefüggésben az mTOR aktivitást, mTORC1-gátló kezelésekkel igazolták, hogy a magas Akt, 4EBP1 és p70S6K aktivitás PI3K-függő [125]. Hodgkin lymphomás betegek mTOR-aktivitását eddig nagy esetszámmal, altípusokra lebontva azonban még nem vizsgálták. HL-ekben mTORC2 aktivitásra az emelkedett sejtmagi AKT, mTOR és p70S6K aktivitásból következtettek 6 eset vizsgálata alapján [126], ezt saját vizsgálataink nem erősítik meg. Emelkedett Rictor expressziót, mTORC2 komplex jelentős mennyiségű előfordulását vizsgálataink nem támasztották alá HL-ek esetében. Rictor expresszió csak egyetlen esetben volt IHC-vel kimutatható a HRS-sejtekben, ami az mTOR aktivitás hátterében az mTORC1 komplex aktivitásának meglétét támasztja alá. Az mTOR-komplexek vizsgálata nem alapulhat pusztán az AKT aktiváció, p-AKT kimutatásán, illetve az mTOR sejtmagi megjelenésének vizsgálatán. Utóbbi néhány közleményben előfordul, de ezek az eredmények ellentmondanak a Rictor fehérje lokalizációjával kapcsolatos eredményeknek (saját vizsgálatainkban minden esetben citoplazmatikus festődéseket figyeltünk meg az IHC-val, fluoreszcens immuncitokémiai vizsgálatok pedig kizárólag citoplazmatikus előfordulást mutattak és hasonló közlemények is kizárólag a citoplazmában írják le a Rictor fehérjét [127]).

Az mTOR fokozott aktivitása az irodalmi adatok szerint HL-ákban nem köthető a kináz mutációjához, és a legtöbb esetben a PI3K/AKT/mTOR jelút tagjai sem mutatnak genetikai változásokat lymphomákban [128]. Renné és munkatársai kimutatták, hogy HL-es betegek 75%-ában magas a PDGFRA receptor tirozin kináz expressziója, valamint 30%-ában egyéb TKR-ok aktivitását (DDR2, EPHB1, RON, TRKB) is leírták [129]. Az TKR-ok aktivitása és az mTOR aktivitás emelkedése között nem hematológiai daganatokban már többen kerestek összefüggéseket. GIST-ben a PDGFRA mutációt tartalmazó esetek 83%-a mutatott magas mTOR aktivitást [130], sporadikus és öröklött NF-1 funkció zavarhoz társuló MPNST-ben kapcsolatot találtak a növekedési faktor receptorok (PDGFRA,B,EGFR) és a magas mTOR aktivitás között [131].

Az mTOR-aktivitás vizsgálatunkban korrelációt mutatott az antiapoptotikus fehérje, a BCL-xL és a HL patogenezisében jelentős szerepet betöltő transzkripciós faktor, az NFκB-p50 expressziójával. Ezeknek a fehérjéknek az aktivitásáról és szerepéről HL-ben már több adat áll rendelkezésünkre. A daganat kialakulása szempontjából fontos jelutakat vizsgáló tanulmányban kimutatták, hogy HL-ben magas az NFκB aktivitás, és számos antiapoptotikus fehérje szintje megemelkedik (BCL-xL, Survivin, BCL-2) [132]. Az NFκB konstitutív aktivitása befolyásolja az IKK aktivitást és a STAT5a expressziót, valamint támogatja a ciklin D1 expressziót, ezzel elősegítve a sejtciklus előrehaladását. Párhuzamosan az NFκB transzkripciós aktivitása a BCL-xL expresszió fokozásán keresztül gátolja az apoptotikus folyamatokat a tumorsejtekben [133]. Eredményeink szerint ezt a folyamatot erősítheti az mTOR-aktivitás emelkedése HL-ben. Eddigi *in vitro* kísérletek alapján az mTOR-gátlás bizonyos esetekben csökkentette az NFκB-aktivitást HL-sejtvonalakban [134]. Az NFκB funkciógátlása hatásos terápiának bizonyult HL modellekben [135]. A mi esetünkben pedig az mTOR gátlása csökkentette a tumornövekedését HL sejtvonalakban *in vitro* és *in vivo*. Kimutatták már, hogy a rapamycin-kezelés T-ALL sejtvonalban stabilizálni képes az NFκB inhibitor molekuláját, az IκBα-t, ami szintén az mTOR-aktivitás és az NFκB aktivitás közti kapcsolat lehetőségét erősíti [136, 137].

Megvizsgáltuk az mTOR aktivitás és a mikrokörnyezet kapcsolatát HL-ban és az mTOR aktivitás szerepét a galektin-1 expresszió szabályozásában *in vitro* HL sejtvonalakban is. A galektin-1-et, a mikrokörnyezet egyik a tumor ellenes

immunválasz szempontjából gyakran vizsgált molekuláját, az HRS-sejtekben és a mikro környezetben egyaránt kimutattuk TMA-vizsgálatunkban. A galektin-1 expresszió és az mTOR-aktivitás kapcsolatát eddig más daganatokban nem írták még le. Hodgkin lymphomában a galektin-1 expresszió és a prognózis korrelációt mutatott a III-IV-es stádiumú csoportban (magas mikro környezeti galektin1 expresszió korrelált az alacsony esemény-mentes túléléssel - [138]), ezt mi saját vizsgálatainkban megerősíteni nem tudtuk, mert a jó prognózisú HL-ek is jelentős galektin1 expressziót mutattak. *In vitro* azt tudtuk azonban igazolni, hogy az mTOR aktivitásnak szerepe van a HL sejtekben galektin-1 fehérjeszintű expressziójában (transzlációs szint). Ha figyelembe vesszük, hogy a galektin-1 fehérje fontos szerepet játszik a mikro környezetben, a T-reg sejtek toborzásában, valamint, hogy vizsgálatainkban kimutattuk a T-reg sejtek jelentős akkumulációját a tumorsejtek környezetében, akkor ezeknek a folyamatoknak az mTOR aktivitástól való függése mindenképpen érdekes tényező lehet a HL-ák progressziója szempontjából. Saját eredményeink azonban ennek igazolására még nem elégségesek.

A regulátor T-sejtek száma minden esetben magasabb volt a daganatsejtek közvetlen környezetében, mint a tumorsejtmentes területeken, a különböző HL altípusok esetében ebben különbséget nem tudunk igazolni. A tumorsejtek mikro környezetében a Treg-sejtek mennyisége széles határok között változott a vizsgált esetekben (1-40%). A betegek többségére 5-15% Treg mennyiség volt jellemző, ami a normál szövetekhez képest emelkedett expressziót jelent. Azokban az esetekben, ahol ennél magasabb, 17%-feletti Treg mennyiséget mutattunk ki kivétel nélkül eseménymentes jó prognózisúak voltak. A Treg-sejtek szerepét a HL-ák patogenezisében és a betegség prognózisában már több tanulmányban is vizsgálták, ellentmondásos eredményekkel [139-141]. Egy tanulmányban a FOXP3 pozitív sejtek alacsony mennyiségét a citotoxikus T-sejtek számának emelkedésével együtt HL-ákban a rövidebb túléléssel hozták kapcsolatba [99]. Az eredmények tumortípusonként is eltérőek: petefészekrák esetén a tumort infiltráló Treg-sejtek nagy száma a rossz prognózissal mutatott összefüggést [103], prosztatara kóros betegek túlélésével nem korrelált, follikuláris lymphoma és DLBCL betegeknél a hosszabb túléléssel mutatott korrelációt [105, 142]. A Treg-sejtek szerepe a daganat kialakulásában lehet meghatározó, a gyulladáshoz vezető folyamatok visszaszorítása az immunreakció csökkentése megvédi a daganatsejteket a szervezet daganatelleni immunreakciójától. Ebben a korai

neopláziás folyamatban a HRS-sejtek által termelt galektin-1 is részt vehet a Treg-sejtek toborzásában, a HL-ák jellegzetes mikrokoznyezetének kialakításában.

Annak ellenére, hogy HL-ák nagy esetszámú mTOR-aktivitás vizsgálatairól eredmények az irodalomban még nem érhetőek el, a kezdeti különböző lymphomatípusokat reprezentáló fázis vizsgálatok után [143] az mTOR-gátlók tesztelése HL-ákban is elindult. Egy fázis II vizsgálatot végeztek eddig 19 előrehaladott stádiumú HL-ás beteg bevonásával. 10 mg everolimust kaptak naponta, szájon át a betegek ciklusonként (1 ciklus 4 hétig tartott). 8 beteg került parciális remisszióba, 1 betegnél teljes remissziót állapítottak meg, további 8 betegnél stabilizálódott a betegség, 1 betegnél progrediált a betegség az első ciklus után és 1 betegnél a ciklus befejezése előtt. Az eredmények nagyon biztatóak, az ORR (objective response rate) 47%, ez magasabb, mint ami a köpenysejtes lymphomás betegeknek (ORR: 40%) ismert, ahol az mTOR-gátlók a klinikai gyakorlatban is alkalmazhatóvá váltak. A betegek a kezelést jól tolerálták, az első ciklus után 5 betegnél kellett csökkenteni a dózist 5 mg-ra, egy beteg 3 éven keresztül kapta a kezelést. [72]. Ezek és saját eredményeink megerősítik, hogy érdemes HL-ás beteget olyan további fázisvizsgálatokba bevonni, ahol mTOR-gátlókat alkalmaznak.

5.1.2. Diffúz nagy B-sejtes lymphoma

A daganatellenes szerek fejlesztése nem meglepően mindig az agresszívebb, rossz prognózisú, gyors progressziót mutató daganatokra összpontosít. A diffúz nagy B-sejtes lymphomák esetében már a terápia részét képezi a célzott, anti-CD20 molekula, a rituximab, amelyet 1997-ben törzskönyvezett az FDA (Food and Drug Administration) a folliculáris lymphomák kezelésére és azóta világszerte sikeresen alkalmazzák a B-sejtes hematológiai malignitások ellen [120, 144, 145].

DLBCL-es betegek biopsziás mintáiban az mTOR-aktivitást már vizsgálták korábban és megállapították a PI3K/AKT/mTOR jelút fokozott aktivitását [146]. Az mTOR-út vonal célzott gátlását megkezdték fázisvizsgálatokban előrehaladott stádiumú DLBCL-es betegeken. Rendelkezésünkre állnak tehát a rapalógokkal szembeni terápiás választ mutató adatok. Meglepő módon annak ellenére, hogy a DLBCL-es mintákban kimutatták az mTOR aktivitást, csak a betegek 30%-a reagált pozitívan a rapalóg

kezelésre [74]. Ezek az adatok kérdéseket vetettek fel a DLBCL-ek mTOR aktivitásával kapcsolatban. Saját munkánkban 68 DLBCL-es beteg bevonásával végeztünk TMA-vizsgálatot, ahol kimutattuk, hogy a magas mTOR-aktivitás elsősorban az mTORC2 komplexhez (Rictor overexpresszió) köthető. Az mTORC2 aktivitás eredményeink szerint a rossz prognózisú aktivált B sejt típusú DLBCL-ek csoportjára jellemző, ez az mTORC2-aktivitás alapján elkülöníthető csoport adhatja a klasszikus mTOR-gátlókra nem reagáló hányadát az eddig vizsgált betegeknek. Eredményeink rámutatnak, hogy például ezért is lehetnek kevésbé sikeresek az eddigi mTOR-gátló fázisvizsgálatok DLBCL-ekben, hiszen a fázisvizsgálatokba előrehaladott, rossz prognózisú betegeket vonnak be, akik eredményeink alapján DLBCL esetén többségében inkább mTORC2 komplexhez köthető aktivitással rendelkeznek.

5.2. *In vitro* és *in vivo* kísérletek

In vitro, lymphoma sejtvonalakon végzett kísérleteinkben klasszikus (Rapamycin) és új generációs mTOR-gátlók (NV-BEZ235, P-242) hatását vizsgáltuk.

Kimutattuk, hogy az mTOR-aktivitás az osztódó lymphoid sejtekben magasabb, normál és daganatos mintákban a környező sejteknél, ami az mTOR egy újabb, eddig még nem ismert funkcióját feltételezi. Ezt a TMA-vizsgálataink során megfigyelt jelenséget *in vitro* lymphoma és leukemia sejtvonalakon igazoltuk és kvantitatív kiértékelést követően közzétettük [119].

Az mTOR-gátlás minden vizsgált esetben G1 blokkot, proliferációgátlást eredményezett. A rapamycin és a duál inhibitor kezelések proliferációs hatásait összehasonlító vizsgálatainkban az új generációs célzott molekulákkal végzett mTOR-gátlás bizonyult hatásosabbnak. A rapamycin apoptózist indukáló hatását hosszabb (120 h) kezelési idő után a HL sejtvonalakban tudtuk kimutatni. A 72 h után még nem jelentkező, de hosszabb kezelési idő után már megjelenő apoptózis magyarázható azzal, hogy a sejtciklus blokkolását a tumorsejtek nem képesek tolerálni ennyi ideig, ezért az apoptotikus programok beindulnak és a sejtek pusztulásához vezetnek [147]. A rapamycin hosszútávú apoptotikus hatását a fokozott, magasabb Rictor, mint Raptor expressziójú DLBCL sejtvonalban nem tudtuk kimutatni. Az NVP-BEZ235 dual

inhibitor viszont már 72 h kezelési idő után is indukálta az apoptózist, ennek az mTOR gátlónak hatása jelentősebb volt minden sejtvonal esetében a másik két gátlónál.

Az mTOR-gátlók együttes alkalmazása kemoterápiás szerekkel eredményeink szerint szinergista hatást mutat HL-sejtekben doxorubicin, vincristin és etoposid mellett, ami megerősíti Dutton és mts-ai által leírt rapamycin és doxorubicin szinergista hatásról szóló korábbi eredményeket [125]. Más célzott szerek közül a hiszton-deacetiláz inhibitor kombinációs kezelések hasonlóan biztató eredményeket mutattak, növelve az apoptózisindukciót [67]. Saját és mások által közölt eredmények megerősítik, hogy a rapamycin önmagában rövidtávon nem, viszont kemoterápiás szerekkel együtt alkalmazva növeli az apoptózist *in vitro* [134, 148, 149]. A szinergista hatás felveti a betegek szervezetét kevésbé megterhelő terápia összeállításának lehetőségét úgy, hogy az mTOR-gátlókkal kombinálva a kemoterápiában eddig alkalmazott dózisokat csökkenteni lehetne.

Egy a napjainkban elvégzett fázis II vizsgálatban DLBCL-es betegeket kezeltek mTOR-gátlóval (everolimus) és rituximabbal kombinációban [150]. Az ORR jobb volt a monoterápiás eredményeknél mindkét szerre nézve, ez szintén a megfelelő kombinációs kezelések keresésére hívja fel a figyelmet. A vizsgálatban előrehaladott stádiumú, a konvencionális terápiára rosszul reagáló betegeket kezeltek. A rapalóggal kombinált rituxumab használata olyan betegeknél is eredményeket mutatott, akik a rituximab-kezelésre korábban rosszul reagáltak [150].

In vivo kísérleteinkben a rapamycin monoterápiás hatását vizsgáltuk HL-, DLBCL,- és Burkitt-lymphoma xenograft modelljeinkben. Korábbi adatok szerint HL-xenograftokban a rapalógok gátolták a tumor növekedését [134]. Vizsgálatainkban a proliferációgátlás mellett apoptózisindukciót is kimutattunk. A rapalógok *in vivo* jelentkező apoptózisindukciója a hosszú távú mTOR-gátló hatás következménye lehet. Emellett az *in vivo* jelenlevő citokinek és egyéb extracelluláris hírvivő molekulák szintén erősíthetik a rapalógok hatását [151], ezt saját *in vitro* a rapamycin TGF β -val kombinált kezeléseink is alátámasztják.

Kísérleti eredményeink és a klinikai terápiás fejlesztési törekvések is alátámasztják, hogy mind a klasszikus, mind az új generációs mTOR-gátlók további

vizsgálata fontos lehet a magas mTOR-aktivitást mutató HL,- és DLBCL-betegek esetében.

Az mTOR-szignál egyre pontosabb ismerete, az mTOR kináz aktivitásának megoszlása két komplexe között felhívja a figyelmet az mTOR-gátlók alkalmazása során a megfelelő betegcsoport és a megfelelő inhibitor kiválasztásának fontosságára. Az első lépést követően, amelyben kimutatják az mTOR fokozott aktivitását, azt is tisztázni kell, hogy ez melyik komplexhez köthető. Ennek megállapítására két megközelítés áll rendelkezésünkre. A két komplex különböző célfehérjéket foszforilál, így a foszforilált alakok mennyiségének emelkedése utal az adott komplex jelenlétére, p-4EBP1, p-p70S6K és p-S6 mellett mTORC1 aktivitást, az AKT Ser473 foszforilált formája mTORC2 aktivitásra utal. A foszforilált fehérjék kimutatása, különösen az AKT esetében nagyon bizonytalan, mert vizsgálatokkal bizonyították, hogy a fixálástól függően a fehérjék lebomolhatnak és kimutathatatlaná válik aktivitásuk a szövetekben [152]. A két komplex emellett egymás működését is befolyásolja, ami nehezíti a pontos értékelést. Vizsgálhatjuk közvetlenül a két mTOR-komplexet is, jellegzetes alkotófehérjék expressziójának kimutatásával. Így az mTORC1-et a Raptor, az mTORC2-t a Rictor fehérje expresszióján keresztül azonosíthatjuk például. A legpontosabb eredményt kísérleteink alapján akkor kaphatjuk, ha in situ vizsgáljuk az adott mTORC1 vagy C2-komplexekben az mTOR kináz aktivitását (aktív formáját a p-mTOR-t). A Duolink módszernél erre van lehetőség, ennél az előhívási technikánál igazoltuk, hogy csak akkor kapunk immunjelölődést, ha az aktív mTOR kináz (p-mTOR) és a Rictor vagy Raptor megfelelő távolságon belül, valóban komplexben (fehérje-fehérje komplex) van jelen a sejtben, tehát aktív komplexet alkot. Ennek meghatározása megfelelő elsődleges ellenanyagokkal lehetséges, a technika beállítását megkezdjük.

Munkánk során HL-ákban és DLBCL-ákban kapott eredményeink megerősítik az mTOR-szignál jelentőségét. A hematológiai malignitások közül lymphomákon kívül leukémiákban is vizsgáltuk az mTOR aktivitását. Munkacsoportunk gyermekkori ALL-ás betegekben a magas mTOR aktivitást mint prognosztikus tényezőt mutatta ki [118]. Munkánkban vizsgált hematológiai malignitások közül a HL-ák, DLBCL-ák és ALL-ák mTOR aktivitása eredményeink szerint a célzott terápia egyik fontos alkalmazási

területe lehet. Mindenképpen hasznos azonban a magas mTOR aktivitás megállapítása az mTOR-gátlókkal kezelendő betegekből. Emellett a megfelelő mTOR-gátló kiválasztásához szükséges az mTORC1 és mTORC2 komplexek arányának és aktivitásának vizsgálata.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

I. Vizsgálatainkban jellemeztük a 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 sejt, a Hodgkin (HL) és diffúz nagy B sejt lymphomákat (DLBCL) magas mTOR aktivitás jellemzi, míg a marginális zóna, a perifériás T sejt, 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 62 %-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%. Ebben a lymphomatípusban eredményeink szerint a DLBCL-ekkel 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 sikerült igazolnunk.

- 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 a T-reg sejtek nagyon magas aránya HRS-sejtekben gazdag területeken jó prognózisra utal.
- d. Igazoltuk HL sejtvonalakban *in vitro* és *in vivo* is, hogy az mTORC1 aktivitás gátlása fehérje 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* HL sejtvonalakban és *in vivo* lymphoma xenograftokban.
- b. Vizsgáltuk különböző lymphomatípusok mTORC1 és mTORC2 komplexekre jellemző fehérjeit 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 – Eredményeink szerint 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 legoptimálisabb mTOR gátlószerek kiválasztását (rapalógok, kettős gátlók) várhatóan kombinációs kezelésben.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A neopláziás folyamatok kialakulása, a daganat növekedése, a daganatsejtek proliferációja és túlélése hátterében gyakran különböző jelutak magváltozott aktivitása áll. A PI3K/AKT/mTOR jelút fokozott aktivitása szolid daganatokban és köpenysejtes lymphomákban a daganatkialakulás és növekedés fontos szabályozója. Az aktív mTOR (mammalian target of rapamycin) kináz két komplex (mTORC1, mTORC2) meghatározó eleme.

Az mTOR aktivitás szerepét vizsgáltuk különböző humán lymphomákban, összefüggéseket keresve a betegek klinikai adataival. Hodgkin lymphomákban (HL) tanulmányoztuk, hogy a magas mTOR aktivitás milyen a daganat túlélésében fontos folyamatokban vesz részt (antiapoptotikus mechanizmusok és mikroenvironmenti változások).

Meghatároztuk azokat a humán lymphoma típusokat, amelyekre magas mTOR aktivitás jellemző. Kimutattuk, hogy a mitotikus lymphoid sejtek mTOR aktivitása magasabb, mint a nem osztódó sejteké. Nagyobb esetszámot tartalmazó TMA-blokkokon (tissue micro array) tovább vizsgáltuk a diffúz nagy B-sejtes lymphoma (DLBCL) és a HL eseteket. Szignifikáns összefüggést mutattunk ki DLBCL-ás betegek altípus megoszlása (csíráközpont eredetű és nem csíráközpont eredetű DLBCL-ák) és az mTOR aktivitás között. DLBCL-ban a fokozott mTOR aktivitás negatív prognosztikus markernek bizonyult. HL-ák 92%-a magas mTOR aktivitást mutatott (mTORC1-hez köthető), ami prognosztikus faktorként nem, viszont terápiás célpontként felhasználható.

HL-ák mikroenvironmentének vizsgálata szerint a regulátor T-sejtek mennyisége a mikroenvironmentben, valamint a galektin-1 expresszió a tumorsejtekben és az extracelluláris mátrixban emelkedett. A magas mTOR aktivitás és a galektin-1 expresszió között kapcsolatot találtunk *in vitro* kísérleteinkben, ahol az mTOR gátlás transzlációs szinten csökkentette a galektin-1 expressziót.

Az mTOR-gátlás jelentőségét – proliferációgátló és apoptotikus hatását – humán lymphoma xenograftokban (HL, DLBCL, Burkitt lymphoma) bizonyítottuk. *In vitro* kombinációs kezelésekben a rapamycin apoptotikus hatást fokozó szerepét igazoltuk.

Munkánkban meghatároztuk azokat a lymphoma típusokat, amelyekben az mTOR-gátlás célzott terápiaként alkalmazható lehet. Eredményeink alapján annak meghatározása, hogy melyik komplexhez köthető az mTOR aktivitás nagyon fontos a megfelelő mTOR-gátló (klasszikus vagy kettős gátlók) kiválasztásában. A jövőben várhatóan kombinációs kezelésben az mTOR-gátlók használata hozzájárulhatna a jobb túlélés eléréséhez és lehetőleg a dózisok csökkentéséhez magas mTOR aktivitást mutató lymphomákban.

8. SUMMARY

Neoplastic processes, tumor growth, and tumor cell proliferation and survival is often due to the altered activation of different signaling pathways. The increased activity of PI3K/AKT/mTOR signaling has been shown to be an important regulator of tumor growth in several solid tumors and in mantle cell lymphomas. The active form of mTOR kinase (mammalian target of rapamycin) is a key signaling molecule, and it exists in two different complexes, mTORC1 and mTORC2.

In the present work, mTOR activity was investigated in different lymphoma types, in parallel with clinical data. We also examined in Hodgkin lymphomas (HL) the role of mTOR activity in survival mechanisms such as antiapoptotic protein expression and alterations in the microenvironment.

We determined which lymphoma types display characteristic high mTOR activity in our TMA (tissue micro array) study. We observed that mTOR activity is increased in mitotic lymphoid cells compared to interphasic cells. The number of diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) and HL cases was extended in a further set of TMA. We observed significantly higher mTOR activity in the non centrum germinativum derived subtype of DLBCL than in the centrum germinativum derived subtype, which was a prognostic marker; 63% of mTOR active cases showed Rictor overexpression, indicating mTORC2 activity. High mTOR activity was also established in 92% of HL cases, which was linked to mTORC1. This finding was not a prognostic marker, however, it can be useful in targeted therapy.

We observed the overexpression of the antiapoptotic protein BCL-xL and NFκB-p50 in the majority of mTOR active HLs. HLs showed high numbers of regulatory T cells in the microenvironment and high expression of galectin-1 in tumor cells and in the extracellular matrix, when compared to reactive lymph nodes.

We confirmed that mTOR inhibition had significant antiproliferative and antiapoptotic effects in lymphoma cell lines and in lymphoma xenografts (HL, DLBCL, Burkitt lymphoma). We also showed that rapamycin was able to augment the effect of chemotherapeutic agents and TGFβ.

Taken together, mTOR activity may be a potential therapeutic target in different lymphoma types. However, patient and inhibitor selection criteria must be carefully considered. The combination of mTOR inhibitors with other agents will probably offer the highest efficiency for achieving the best clinical response, and may also allow dose reduction in order to decrease late treatment toxicity in these cases.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Hanahan D, Weinberg RA. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70.
2. Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-74.
3. Murakami M, Ichisaka T, Maeda M, Oshiro N, Hara K, Edenhofer F, Kiyama H, Yonezawa K, Yamanaka S. (2004) mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 24: 6710-8.
4. Lempiainen H, Halazonetis TD. (2009) Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. *EMBO J*, 28: 3067-73.
5. Tsang CK, Qi H, Liu LF, Zheng XF. (2007) Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today*, 12: 112-24.
6. Populo H, Lopes JM, Soares P. (2012) The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *Int J Mol Sci*, 13: 1886-918.
7. Sabatini DM. (2006) mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer*, 6: 729-34.
8. Pearce LR, Huang X, Boudeau J, Pawlowski R, Wullschleger S, Deak M, Ibrahim AF, Gourlay R, Magnuson MA, Alessi DR. (2007) Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J*, 405: 513-22.
9. Menon S, Manning BD. (2008) Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene*, 27 Suppl 2: S43-51.
10. Davies MA. (2011) Regulation, role, and targeting of Akt in cancer. *J Clin Oncol*, 29: 4715-7.
11. Lindsley JE, Rutter J. (2004) Nutrient sensing and metabolic decisions. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 139: 543-59.
12. Inoki K, Zhu T, Guan KL. (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115: 577-90.
13. Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K, Wang CY, He X, MacDougald OA, You M, Williams BO, Guan KL. (2006) TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell*, 126: 955-68.

14. Shackelford DB, Shaw RJ. (2009) The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*, 9: 563-75.
15. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 30: 214-26.
16. Caron E, Ghosh S, Matsuoka Y, Ashton-Beaucage D, Therrien M, Lemieux S, Perreault C, Roux PP, Kitano H. (2010) A comprehensive map of the mTOR signaling network. *Mol Syst Biol*, 6: 453.
17. Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. (2008) Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol*, 10: 935-45.
18. Ikenoue T, Inoki K, Yang Q, Zhou X, Guan KL. (2008) Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J*, 27: 1919-31.
19. Garcia-Martinez JM, Alessi DR. (2008) mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J*, 416: 375-85.
20. Kim EK, Yun SJ, Ha JM, Kim YW, Jin IH, Yun J, Shin HK, Song SH, Kim JH, Lee JS, Kim CD, Bae SS. (2011) Selective activation of Akt1 by mammalian target of rapamycin complex 2 regulates cancer cell migration, invasion, and metastasis. *Oncogene*, 30: 2954-63.
21. Charest PG, Shen Z, Lakoduk A, Sasaki AT, Briggs SP, Firtel RA. (2010) A Ras signaling complex controls the RasC-TORC2 pathway and directed cell migration. *Dev Cell*, 18: 737-49.
22. Bracho-Valdes I, Moreno-Alvarez P, Valencia-Martinez I, Robles-Molina E, Chavez-Vargas L, Vazquez-Prado J. (2011) mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused. *IUBMB Life*, 63: 896-914.
23. Sonenberg N, Gingras AC. (1998) The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol*, 10: 268-75.
24. Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. (2012) A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature*, 485: 109-13.

25. Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P. (2007) mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature*, 450: 736-40.
26. Yecies JL, Manning BD. (2011) Transcriptional control of cellular metabolism by mTOR signaling. *Cancer Res*, 71: 2815-20.
27. Kopper L, Timar J. (2011) mTOR complexes -- molecular spiders in molecular networks. *Magy Onkol*, 55: 287-94.
28. Mizushima N. (2010) The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 22: 132-9.
29. Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. (2009) ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem*, 284: 12297-305.
30. Hsu PP, Kang SA, Rameseder J, Zhang Y, Ottina KA, Lim D, Peterson TR, Choi Y, Gray NS, Yaffe MB, Marto JA, Sabatini DM. (2011) The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science*, 332: 1317-22.
31. Zinzalla V, Stracka D, Oppliger W, Hall MN. (2011) Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell*, 144: 757-68.
32. Saci A, Cantley LC, Carpenter CL. (2011) Rac1 regulates the activity of mTORC1 and mTORC2 and controls cellular size. *Mol Cell*, 42: 50-61.
33. Laplante M, Sabatini DM. (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149: 274-93.
34. Engelman JA. (2009) Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer*, 9: 550-62.
35. Philp AJ, Campbell IG, Leet C, Vincan E, Rockman SP, Whitehead RH, Thomas RJ, Phillips WA. (2001) The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res*, 61: 7426-9.
36. Ogita S, Lorusso P. (2011) Targeting phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)-Akt beyond rapalogs. *Target Oncol*, 6: 103-17.
37. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Konishi H, Karakas B, Blair BG, Lin C, Peters BA, Velculescu VE, Park BH. (2004) The

- PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther*, 3: 772-5.
38. Trotman LC, Niki M, Dotan ZA, Koutcher JA, Di Cristofano A, Xiao A, Khoo AS, Roy-Burman P, Greenberg NM, Van Dyke T, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. (2003) Pten dose dictates cancer progression in the prostate. *PLoS Biol*, 1: E59.
 39. Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, Hostetter G, Boguslawski S, Moses TY, Savage S, Uhlik M, Lin A, Du J, Qian YW, Zeckner DJ, Tucker-Kellogg G, Touchman J, Patel K, MousSES S, Bittner M, Schevitz R, Lai MH, Blanchard KL, Thomas JE. (2007) A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*, 448: 439-44.
 40. Davies MA, Stemke-Hale K, Tellez C, Calderone TL, Deng W, Prieto VG, Lazar AJ, Gershenwald JE, Mills GB. (2008) A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *Br J Cancer*, 99: 1265-8.
 41. Jiang BH, Liu LZ. (2008) Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment. *Drug Resist Updat*, 11: 63-76.
 42. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, Linn SC, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Hauptmann M, Beijersbergen RL, Mills GB, van de Vijver MJ, Bernards R. (2007) A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*, 12: 395-402.
 43. Eichhorn PJ, Gili M, Scaltriti M, Serra V, Guzman M, Nijkamp W, Beijersbergen RL, Valero V, Seoane J, Bernards R, Baselga J. (2008) Phosphatidylinositol 3-kinase hyperactivation results in lapatinib resistance that is reversed by the mTOR/phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BEZ235. *Cancer Res*, 68: 9221-30.
 44. Chapuis N, Tamburini J, Green AS, Willems L, Bardet V, Park S, Lacombe C, Mayeux P, Bouscary D. (2010) Perspectives on inhibiting mTOR as a future treatment strategy for hematological malignancies. *Leukemia*, 24: 1686-99.
 45. Levis M, Small D. (2003) FLT3: ITDoes matter in leukemia. *Leukemia*, 17: 1738-52.

46. Fathi AT, Grant S, Karp JE. (2010) Exploiting cellular pathways to develop new treatment strategies for AML. *Cancer Treat Rev*, 36: 142-50.
47. Ahmad EI, Gawish HH, Al Azizi NM, Elhefni AM. (2011) The prognostic impact of K-RAS mutations in adult acute myeloid leukemia patients treated with high-dose cytarabine. *Onco Targets Ther*, 4: 115-21.
48. Kharas MG, Fruman DA. (2005) ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. *Cancer Res*, 65: 2047-53.
49. Vu C, Fruman DA. (2010) Target of rapamycin signaling in leukemia and lymphoma. *Clin Cancer Res*, 16: 5374-80.
50. Palomero T, Sulis ML, Cortina M, Real PJ, Barnes K, Ciofani M, Caparros E, Buteau J, Brown K, Perkins SL, Bhagat G, Agarwal AM, Basso G, Castillo M, Nagase S, Cordon-Cardo C, Parsons R, Zuniga-Pflucker JC, Dominguez M, Ferrando AA. (2007) Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat Med*, 13: 1203-10.
51. Pene F, Claessens YE, Muller O, Viguie F, Mayeux P, Dreyfus F, Lacombe C, Bouscary D. (2002) Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene*, 21: 6587-97.
52. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, Kohlhammer H, Lamy L, Zhao H, Yang Y, Xu W, Shaffer AL, Wright G, Xiao W, Powell J, Jiang JK, Thomas CJ, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Johnson NA, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Wilson WH, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Braziel RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Pierce SK, Staudt LM. (2010) Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*, 463: 88-92.
53. Schatz JH. (2011) Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in non-Hodgkin's lymphoma: results, biology, and development strategies. *Curr Oncol Rep*, 13: 398-406.
54. Smith SM. (2012) Targeting mTOR in mantle cell lymphoma: current and future directions. *Best Pract Res Clin Haematol*, 25: 175-83.

55. Hoy SM, McKeage K. (2010) Temsirolimus: In relapsed and/or refractory mantle cell lymphoma. *Drugs*, 70: 1819-29.
56. Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, Grimaldi C, Manzoli L, McCubrey JA. (2009) Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling network in acute myelogenous leukemia. *Expert Opin Investig Drugs*, 18: 1333-49.
57. Tay K, Dunleavy K, Wilson WH. (2010) Novel agents for B-cell non-Hodgkin lymphoma: science and the promise. *Blood Rev*, 24: 69-82.
58. Benjamin D, Colombi M, Moroni C, Hall MN. (2011) Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 10: 868-80.
59. Martel RR, Klicius J, Galet S. (1977) Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol*, 55: 48-51.
60. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*, 22: 159-68.
61. Faivre S, Kroemer G, Raymond E. (2006) Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov*, 5: 671-88.
62. Guarini A, Minoia C, Giannoccaro M, Rana A, Iacobazzi A, Lapietra A, Raimondi A, Silvestris N, Gadaleta CD, Ranieri G. (2012) mTOR as a target of everolimus in refractory/relapsed Hodgkin lymphoma. *Curr Med Chem*, 19: 945-54.
63. Yao JC, Phan AT, Chang DZ, Wolff RA, Hess K, Gupta S, Jacobs C, Mares JE, Landgraf AN, Rashid A, Meric-Bernstam F. (2008) Efficacy of RAD001 (everolimus) and octreotide LAR in advanced low- to intermediate-grade neuroendocrine tumors: results of a phase II study. *J Clin Oncol*, 26: 4311-8.
64. Mita M, Sankhala K, Abdel-Karim I, Mita A, Giles F. (2008) Deforolimus (AP23573) a novel mTOR inhibitor in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs*, 17: 1947-54.
65. Hess G, Smith SM, Berkenblit A, Coiffier B. (2009) Temsirolimus in mantle cell lymphoma and other non-Hodgkin lymphoma subtypes. *Semin Oncol*, 36 Suppl 3: S37-45.
66. Smith SM, van Besien K, Karrison T, Dancey J, McLaughlin P, Younes A, Smith S, Stiff P, Lester E, Modi S, Doyle LA, Vokes EE, Pro B. (2010)

- Temsirolimus has activity in non-mantle cell non-Hodgkin's lymphoma subtypes: The University of Chicago phase II consortium. *J Clin Oncol*, 28: 4740-6.
67. Lemoine M, Derenzini E, Buglio D, Medeiros LJ, Davis RE, Zhang J, Ji Y, Younes A. (2012) The pan-deacetylase inhibitor panobinostat induces cell death and synergizes with everolimus in Hodgkin lymphoma cell lines. *Blood*, 119: 4017-25.
 68. Rizzieri DA, Feldman E, Dipersio JF, Gabrail N, Stock W, Strair R, Rivera VM, Albitar M, Bedrosian CL, Giles FJ. (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: 2756-62.
 69. Yee KW, Zeng Z, Konopleva M, Verstovsek S, Ravandi F, Ferrajoli A, Thomas D, Wierda W, Apostolidou E, Albitar M, O'Brien S, Andreeff M, Giles FJ. (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: 5165-73.
 70. Decker T, Sandherr M, Goetze K, Oelsner M, Ringshausen I, Peschel C. (2009) A pilot trial of the mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitor RAD001 in patients with advanced B-CLL. *Ann Hematol*, 88: 221-7.
 71. Tobinai K, Ogura M, Maruyama D, Uchida T, Uike N, Choi I, Ishizawa K, Itoh K, Ando K, Taniwaki M, Shimada N, Kobayashi K. (2010) Phase I study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in Japanese patients with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma. *Int J Hematol*, 92: 563-70.
 72. Johnston PB, Inwards DJ, Colgan JP, Laplant BR, Kabat BF, Habermann TM, Micallef IN, Porrata LF, Ansell SM, Reeder CB, Roy V, Witzig TE. (2010) A Phase II trial of the oral mTOR inhibitor everolimus in relapsed Hodgkin lymphoma. *Am J Hematol*, 85: 320-4.
 73. Ghobrial IM, Gertz M, Laplant B, Camoriano J, Hayman S, Lacy M, Chuma S, Harris B, Leduc R, Rourke M, Ansell SM, Deangelo D, Dispenzieri A, Bergsagel L, Reeder C, Anderson KC, Richardson PG, Treon SP, Witzig TE.

- (2010) Phase II trial of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus in relapsed or refractory Waldenstrom macroglobulinemia. *J Clin Oncol*, 28: 1408-14.
74. Witzig TE, Reeder CB, LaPlant BR, Gupta M, Johnston PB, Micallef IN, Porrata LF, Ansell SM, Colgan JP, Jacobsen ED, Ghobrial IM, Habermann TM. (2011) A phase II trial of the oral mTOR inhibitor everolimus in relapsed aggressive lymphoma. *Leukemia*, 25: 341-7.
75. Witzig TE, Geyer SM, Ghobrial I, Inwards DJ, Fonseca R, Kurtin P, Ansell SM, Luyun R, Flynn PJ, Morton RF, Dakhil SR, Gross H, Kaufmann SH. (2005) Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 23: 5347-56.
76. Taberero J, Rojo F, Calvo E, Burris H, Judson I, Hazell K, Martinelli E, Ramon y Cajal S, Jones S, Vidal L, Shand N, Macarulla T, Ramos FJ, Dimitrijevic S, Zoellner U, Tang P, Stumm M, Lane HA, Lebwohl D, Baselga J. (2008) Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*, 26: 1603-10.
77. Khokhar NZ, Altman JK, Plataniias LC. (2011) Emerging roles for mammalian target of rapamycin inhibitors in the treatment of solid tumors and hematological malignancies. *Curr Opin Oncol*, 23: 578-86.
78. Altman JK, Sassano A, Kaur S, Glaser H, Kroczyńska B, Redig AJ, Russo S, Barr S, Plataniias LC. (2011) Dual mTORC2/mTORC1 targeting results in potent suppressive effects on acute myeloid leukemia (AML) progenitors. *Clin Cancer Res*, 17: 4378-88.
79. Hoang B, Frost P, Shi Y, Belanger E, Benavides A, Pezeshkpour G, Cappia S, Guglielmelli T, Gera J, Lichtenstein A. (2010) Targeting TORC2 in multiple myeloma with a new mTOR kinase inhibitor. *Blood*, 116: 4560-8.
80. Feldman ME, Apsel B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggero D, Shokat KM. (2009) Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol*, 7: e38.

81. Bhatt AP, Bhende PM, Sin SH, Roy D, Dittmer DP, Damania B. (2010) Dual inhibition of PI3K and mTOR inhibits autocrine and paracrine proliferative loops in PI3K/Akt/mTOR-addicted lymphomas. *Blood*, 115: 4455-63.
82. Matolcsy A, Udvardy M, Kopper L. Érett B-sejtes non-Hodgkin lymphomák – Diffúz nagy B-sejtes lymphoma. In: Varga Gy, Krenács. L. (szerk.), *Hematológiai betegségek atlasza*. Medicina, Budapest, 2006: 274-280.
83. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. Mature B-cell neoplasms. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2008: 179-267.
84. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J, Jr., Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403: 503-11.
85. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, Ott G, Rosenwald A, Braziel RM, Campo E, Vose JM, Lenz G, Staudt LM, Chan WC, Weisenburger DD. (2011) Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*, 29: 200-7.
86. Kopper L, Schaff Zs. A vérképző és a limforetikuláris rendszer patológiája, In: Matolcsy A. (szerk.), *Patológia 1*. Medicina, Budapest, 2004: 531-606.
87. Matolcsy A, Udvardy M, Kopper L. Hodgkin lymphoma In: Nemes Z, Illés Á. (szerk.), *Hematológiai betegségek atlasza*. Medicina, Budapest, 2006: 336-348.
88. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. Hodgkin lymphoma. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2008: 321-334.

89. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, Culligan DJ, Johnston PW, Barker RN, Vickers MA. (2004) Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood*, 103: 1755-62.
90. Fischer M, Juremalm M, Olsson N, Backlin C, Sundstrom C, Nilsson K, Enblad G, Nilsson G. (2003) Expression of CCL5/RANTES by Hodgkin and Reed-Sternberg cells and its possible role in the recruitment of mast cells into lymphomatous tissue. *Int J Cancer*, 107: 197-201.
91. van den Berg A, Visser L, Poppema S. (1999) High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol*, 154: 1685-91.
92. Khnykin D, Troen G, Berner JM, Delabie J. (2006) The expression of fibroblast growth factors and their receptors in Hodgkin's lymphoma. *J Pathol*, 208: 431-8.
93. Hanamoto H, Nakayama T, Miyazato H, Takegawa S, Hieshima K, Tatsumi Y, Kanamaru A, Yoshie O. (2004) Expression of CCL28 by Reed-Sternberg cells defines a major subtype of classical Hodgkin's disease with frequent infiltration of eosinophils and/or plasma cells. *Am J Pathol*, 164: 997-1006.
94. Skinnider BF, Mak TW. (2002) The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 99: 4283-97.
95. Herbst H, Foss HD, Samol J, Araujo I, Klotzbach H, Krause H, Agathangelou A, Niedobitek G, Stein H. (1996) Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. *Blood*, 87: 2918-29.
96. Kim LH, Eow GI, Peh SC, Poppema S. (2003) The role of CD30, CD40 and CD95 in the regulation of proliferation and apoptosis in classical Hodgkin's lymphoma. *Pathology*, 35: 428-35.
97. Dotti G, Savoldo B, Pule M, Straathof KC, Biagi E, Yvon E, Vigouroux S, Brenner MK, Rooney CM. (2005) Human cytotoxic T lymphocytes with reduced sensitivity to Fas-induced apoptosis. *Blood*, 105: 4677-84.
98. Steidl C, Connors JM, Gascoyne RD. (2011) Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: increasing evidence of the importance of the microenvironment. *J Clin Oncol*, 29: 1812-26.

99. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, Bosch R, Garcia JF, Jaen J, Banham AH, Roncador G, Montalban C, Piris MA. (2005) Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res*, 11: 1467-73.
100. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299: 1057-61.
101. Piccirillo CA, Shevach EM. (2001) Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol*, 167: 1137-40.
102. Knutson KL, Disis ML, Salazar LG. (2007) CD4 regulatory T cells in human cancer pathogenesis. *Cancer Immunol Immunother*, 56: 271-85.
103. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 10: 942-9.
104. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. (2003) Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res*, 9: 606-12.
105. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo L, Martinez A, Roncador G, Montserrat E, Campo E, Banham AH. (2006) High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood*, 108: 2957-64.
106. Laderach DJ, Compagno D, Toscano MA, Croci DO, Dergan-Dylon S, Salatino M, Rabinovich GA. (2010) Dissecting the signal transduction pathways triggered by galectin-glycan interactions in physiological and pathological settings. *IUBMB Life*, 62: 1-13.
107. Rabinovich GA, Vidal M. (2011) Galectins and microenvironmental niches during hematopoiesis. *Curr Opin Hematol*, 18: 443-51.
108. Dhirapong A, Lleo A, Leung P, Gershwin ME, Liu FT. (2009) The immunological potential of galectin-1 and -3. *Autoimmun Rev*, 8: 360-3.
109. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. (2006) Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*, 16: 137R-157R.

110. Stowell SR, Qian Y, Karmakar S, Koyama NS, Dias-Baruffi M, Leffler H, McEver RP, Cummings RD. (2008) Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. *J Immunol*, 180: 3091-102.
111. Watanabe M, Takemasa I, Kaneko N, Yokoyama Y, Matsuo E, Iwasa S, Mori M, Matsuura N, Monden M, Nishimura O. (2011) Clinical significance of circulating galectins as colorectal cancer markers. *Oncol Rep*, 25: 1217-26.
112. Kim HJ, Do IG, Jeon HK, Cho YJ, Park YA, Choi JJ, Sung CO, Lee YY, Choi CH, Kim TJ, Kim BG, Lee JW, Bae DS. (2013) Galectin 1 expression is associated with tumor invasion and metastasis in stage IB to IIA cervical cancer. *Hum Pathol*, 44: 62-8.
113. Iurisci I, Tinari N, Natoli C, Angelucci D, Cianchetti E, Iacobelli S. (2000) Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res*, 6: 1389-93.
114. Kim SJ, Lee SJ, Sung HJ, Choi IK, Choi CW, Kim BS, Kim JS, Yu W, Hwang HS, Kim IS. (2008) Increased serum 90K and Galectin-3 expression are associated with advanced stage and a worse prognosis in diffuse large B-cell lymphomas. *Acta Haematol*, 120: 211-6.
115. D'Haene N, Catteau X, Maris C, Martin B, Salmon I, Decaestecker C. (2008) Endothelial hyperplasia and endothelial galectin-3 expression are prognostic factors in primary central nervous system lymphomas. *Br J Haematol*, 140: 402-10.
116. Moisan S, Demers M, Mercier J, Magnaldo T, Potworowski EF, St-Pierre Y. (2003) Upregulation of galectin-7 in murine lymphoma cells is associated with progression toward an aggressive phenotype. *Leukemia*, 17: 751-9.
117. Mihalik R, Uher F, Pocsik EE, Berczi L, Benczur M, Kopper L. (1996) Detection of Drug-induced Apoptosis by Flow Cytometry after Alkaline Extraction of Ethanol Fixed Cells. *Pathol Oncol Res*, 2: 78-83.
118. Nemes K, Sebestyén A, Mark A, Hajdu M, Sticz T, Nagy E, Barna G, Varadi Zs, Kovács G, Kopper L, Csoka M. (2013) Mammalian target of rapamycin (mTOR) activity dependent phospho-protein expression in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *PLoS One*, 8: e59335.

119. Egervari G, Mark A, Hajdu M, Barna G, Sapi Z, Krenacs T, Kopper L, Sebestyén A. (2011) Mitotic lymphoma cells are characterized by high expression of phosphorylated ribosomal S6 protein. *Histochem Cell Biol*, 135: 409-17.
120. Simon Z, Keresztes K, Miltenyi Z, Rész Z, Varoczy L, Vadasz G, Gergely L, Illes A. (2007) Our experiences in treating patients with Hodgkin disease in the last decade. *Orv Hetil*, 148: 675-82.
121. Yurchenko M, Sidorenko SP. (2010) Hodgkin's lymphoma: the role of cell surface receptors in regulation of tumor cell fate. *Exp Oncol*, 32: 214-23.
122. Younes A, Gopal AK, Smith SE, Ansell SM, Rosenblatt JD, Savage KJ, Ramchandren R, Bartlett NL, Cheson BD, de Vos S, Forero-Torres A, Moskowitz CH, Connors JM, Engert A, Larsen EK, Kennedy DA, Sievers EL, Chen R. (2012) Results of a pivotal phase II study of brentuximab vedotin for patients with relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, 30: 2183-9.
123. Jona A, Younes A. (2010) Novel treatment strategies for patients with relapsed classical Hodgkin lymphoma. *Blood Rev*, 24: 233-8.
124. Diehl V, Thomas RK, Re D. (2004) Part II: Hodgkin's lymphoma--diagnosis and treatment. *Lancet Oncol*, 5: 19-26.
125. Dutton A, Reynolds GM, Dawson CW, Young LS, Murray PG. (2005) Constitutive activation of phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cells through a mechanism involving Akt kinase and mTOR. *J Pathol*, 205: 498-506.
126. De J, Brown RE. (2010) Tissue-microarray based immunohistochemical analysis of survival pathways in nodular sclerosing classical Hodgkin lymphoma as compared with Non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Clin Exp Med*, 3: 55-68.
127. Gibault L, Ferreira C, Perot G, Audebourg A, Chibon F, Bonnin S, Lagarde P, Vacher-Lavenu MC, Terrier P, Coindre JM, Aurias A. (2012) From PTEN loss of expression to RICTOR role in smooth muscle differentiation: complex involvement of the mTOR pathway in leiomyosarcomas and pleomorphic sarcomas. *Mod Pathol*, 25: 197-211.

128. Chalhoub N, Baker SJ. (2009) PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol*, 4: 127-50.
129. Renne C, Willenbrock K, Kuppers R, Hansmann ML, Brauninger A. (2005) Autocrine- and paracrine-activated receptor tyrosine kinases in classic Hodgkin lymphoma. *Blood*, 105: 4051-9.
130. Sapi Z, Fule T, Hajdu M, Matolcsy A, Moskovszky L, Mark A, Sebestyén A, Bodoky G. (2011) The activated targets of mTOR signaling pathway are characteristic for PDGFRA mutant and wild-type rather than KIT mutant GISTs. *Diagn Mol Pathol*, 20: 22-33.
131. Perrone F, Da Riva L, Orsenigo M, Losa M, Jocolle G, Millefanti C, Pastore E, Gronchi A, Pierotti MA, Pilotti S. (2009) PDGFRA, PDGFRB, EGFR, and downstream signaling activation in malignant peripheral nerve sheath tumor. *Neuro Oncol*, 11: 725-36.
132. Garcia JF, Camacho FI, Morente M, Fraga M, Montalban C, Alvaro T, Bellas C, Castano A, Diez A, Flores T, Martin C, Martinez MA, Mazorra F, Menarguez J, Mestre MJ, Mollejo M, Saez AI, Sanchez L, Piris MA. (2003) Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood*, 101: 681-9.
133. Re D, Kuppers R, Diehl V. (2005) Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, 23: 6379-86.
134. Jundt F, Raetzl N, Muller C, Calkhoven CF, Kley K, Mathas S, Lietz A, Leutz A, Dorken B. (2005) A rapamycin derivative (everolimus) controls proliferation through down-regulation of truncated CCAAT enhancer binding protein {beta} and NF- κ B activity in Hodgkin and anaplastic large cell lymphomas. *Blood*, 106: 1801-7.
135. Mathas S, Lietz A, Janz M, Hinz M, Jundt F, Scheiderei C, Bommert K, Dorken B. (2003) Inhibition of NF- κ B essentially contributes to arsenic-induced apoptosis. *Blood*, 102: 1028-34.
136. Lai JH, Tan TH. (1994) CD28 signaling causes a sustained down-regulation of I kappa B alpha which can be prevented by the immunosuppressant rapamycin. *J Biol Chem*, 269: 30077-80.

137. Tunon MJ, Sanchez-Campos S, Gutierrez B, Culebras JM, Gonzalez-Gallego J. (2003) Effects of FK506 and rapamycin on generation of reactive oxygen species, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, 66: 439-45.
138. Kamper P, Ludvigsen M, Bendix K, Hamilton-Dutoit S, Rabinovich GA, Moller MB, Nyengaard JR, Honore B, d'Amore F. (2011) Proteomic analysis identifies galectin-1 as a predictive biomarker for relapsed/refractory disease in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 117: 6638-49.
139. Kelley TW, Pohlman B, Elson P, Hsi ED. (2007) The ratio of FOXP3+ regulatory T cells to granzyme B+ cytotoxic T/NK cells predicts prognosis in classical Hodgkin lymphoma and is independent of bcl-2 and MAL expression. *Am J Clin Pathol*, 128: 958-65.
140. Schreck S, Friebel D, Buettner M, Distel L, Grabenbauer G, Young LS, Niedobitek G. (2009) Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol*, 27: 31-9.
141. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, Dirnhofer S. (2008) Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, 93: 193-200.
142. Li J, Qian CN, Zeng YX. (2009) Regulatory T cells and EBV associated malignancies. *Int Immunopharmacol*, 9: 590-2.
143. Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM. (2009) Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *J Clin Oncol*, 27: 2278-87.
144. Fang C, Xu W, Li JY. (2010) A systematic review and meta-analysis of rituximab-based immunochemotherapy for subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *Ann Hematol*, 89: 1107-13.
145. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, Gascoyne RD, Cassileth PA, Cohn JB, Dakhil SR, Woda B, Fisher RI, Peterson BA, Horning SJ. (2006) Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 24: 3121-7.

146. Zhao MY, Auerbach A, D'Costa AM, Rapoport AP, Burger AM, Sausville EA, Stass SA, Jiang F, Sands AM, Aguilera N, Zhao XF. (2009) Phospho-p70S6K/p85S6K and cdc2/cdk1 are novel targets for diffuse large B-cell lymphoma combination therapy. *Clin Cancer Res*, 15: 1708-20.
147. Zalatnai A. (2005) Review: potential role of cell cycle synchronizing agents in combination treatment modalities of malignant tumors. *In Vivo*, 19: 85-91.
148. Ishizuka T, Sakata N, Johnson GL, Gelfand EW, Terada N. (1997) Rapamycin potentiates dexamethasone-induced apoptosis and inhibits JNK activity in lymphoblastoid cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 230: 386-91.
149. Shi Y, Frankel A, Radvanyi LG, Penn LZ, Miller RG, Mills GB. (1995) Rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin in vitro. *Cancer Res*, 55: 1982-8.
150. Barnes J, Jacobsen E, Feng Y, Freedman A, Hochberg E, Lacasce A, Armand P, Joyce R, Sohani A, Rodig S, Neuberg D, Fisher D, Abramson J. (2013) Everolimus in combination with rituximab induces complete responses in heavily pretreated diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*, 98: 615-9
151. Dello Russo C, Lisi L, Tringali G, Navarra P. (2009) Involvement of mTOR kinase in cytokine-dependent microglial activation and cell proliferation. *Biochem Pharmacol*, 78: 1242-51.
152. Baker AF, Dragovich T, Ihle NT, Williams R, Fenoglio-Preiser C, Powis G. (2005) Stability of phosphoprotein as a biological marker of tumor signaling. *Clin Cancer Res*, 11: 4338-40.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények

1. *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**
2. 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**
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. Sági Z, Füle T, Hajdu M, Matolcsy A, Moskovszky L, **Márk Á**, Sebestyén A, Bodoky G. The activated targets of mTOR signaling pathway are characteristic for PDGFRA mutant and wild-type rather than KIT mutant GISTs. *Diagn Mol Pathol.* 2011, 1:22-33. **IF: 2,257**
2. Kenessey I, Bánki B, **Márk Á**, Varga N, Tóvári J, Ladányi A, Rásó E, Tímár J. Revisiting CB1 receptor as drug target in human melanoma. *Pathol Oncol Res.* 2012, 4:857-66. **IF: 1,366**

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**

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Őszinte köszönettel tartozom elsősorban témavezetőmnek, Dr. Sebestyén Annának, aki a kezdetektől bizalommal tanított és támogatott és megmutatta nekem, hogy a kutatómunka mekkora precizitást és fáradhatatlan lelkesedést igényel.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Kopper László professzor úrnak, hogy az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Ph.D. programjában lehetőséget biztosított a kutatáshoz és munkám során segítséget nyújtott és mindig hangsúlyozta a kutatás legfontosabb elemét, a helyes, érthető kérdésfeltevést.

Köszönettel tartozom Dr. Matolcsy András professzor úrnak, hogy Ph.D. munkámat az Intézetben végezhettem és szakmai fejlődésemet támogatta.

Szerencsés vagyok, hogy a Kopper-laborban dolgozhattam/dolgozhatok, ahol a munkatársaim – Csorba Gézné, Mallászné Bagi Györgyi, Böszörményi Judit, Dr. Hajdu Melinda, Nagy Noémi és Dr. Sticz Tamás – megmutatták nekem, hogy a figyelmesség és a jó közösség mennyi erőt ad a munkához.

Köszönöm Nagy Noéminek és Dr. Váradi Zsófiának a laborban közösen eltöltött időért, hogy mindig jó hangulatban dolgoztunk együtt.

Köszönöm Dr. Hajdu Melindának a közös beszélgetéseket, hogy mindig lelkesen meghallgatott és angoltudása legjavát adta minden munkámhoz.

Köszönöm Csorba Géznének, hogy a sejttenyésztésben szerzett értékes tapasztalatait és titkait megosztotta velem.

Köszönöm Dr. Barna Gábornak, hogy megtanította nekem az áramlási citometriai vizsgálatok kivitelezését és elemzését.

Köszönöm Dr. Ladányi Andreának, Dr. Tóvári Józsefnek és Dr. Kenessey Istvánnak, hogy tudományos pályám elindulásakor mellett álltak és biztattak és azóta is bizalommal fordulhatok hozzájuk.

Köszönöm Dr. Csóka Monikának, Dr. Nagy Eszternek, hogy bátran fordulhattam hozzájuk kérdéseimmel.

Köszönöm minden kollégámnak az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben a sok segítséget és támogatást.

Köszönöm férjemnek, hogy mellett áll és szeretettel, türelemmel és bizalommal támogat minden nap. Köszönöm a családomnak – szüleimnek, testvéreimnek és

keresztanyámnak – hogy segítettek elérni a céljaimat, hogy mindig meghallgattak, bátorítottak, tanácsaikkal irányt mutattak és hogy gyermekkorom óta hisznek bennem.