

Az mTOR jelút aktivitását befolyásoló tényezők és szabályozási folyamatok Hodgkin lymphoma modellekben és szöveti mintákban

Doktori értekezés

Nagy Noémi

Semmelweis Egyetem
Patológiai tudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Vellainé Takács Krisztina, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Patonai Attila, Ph.D., egyetemi tanársegéd

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Buzás Edit Irén, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóth Erika, Ph.D, osztályvezető
Dr. Herszényi László, D.Sc., egyetemi docens

Budapest
2017

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke.....	3
1 Bevezetés.....	8
1.1 mTOR kináz.....	9
1.2 mTOR jelút.....	10
1.3 mTOR gátlók.....	13
1.3.1 Klasszikus mTOR inhibitorok.....	14
1.3.2 Új generációs mTOR inhibitorok.....	18
1.4 mTOR aktivitás haematológiai daganatokban.....	23
1.4.1 Hodgkin-lymphoma.....	24
1.4.2 mTOR gátlók lymphomák és leukémiák kezelésében.....	26
1.5 PI3K/AKT/mTOR jelút szabályozását érintő különböző tényezők.....	27
1.5.1 Mutációk.....	28
1.5.2 Más szignál útvonalak.....	31
1.5.2.1 Notch szignál.....	32
1.5.2.2 Notch szignál aktivitása tumorokban.....	35
1.5.2.3 Notch és mTOR útvonalak a jelátviteli hálózatban.....	37
1.6 mTOR aktivitás anyagcserét szabályozó hatása.....	38
1.6.1 Lymphoid sejtek anyagcseréje.....	40
1.6.2 Lymphoid tumorok anyagcsere változásai.....	41
2 Célkitűzések.....	43
3 Módszerek.....	44
3.1 <i>In vitro</i> vizsgálatok.....	44
3.1.1 Kezelések, biológiai hatások vizsgálata.....	44
3.1.1.1 Apoptózis mérés.....	45
3.1.1.2 Proliferáció vizsgálat.....	45
3.2 <i>In vivo</i> kísérletek.....	45
3.3 Humán szöveti minták.....	46
3.4 DNS szekvencia vizsgálatok.....	46
3.5 RNS expresszió változások vizsgálata.....	48
3.5.1 mRNS expresszió vizsgálatok.....	48
3.6 Fehérjeszintű expressziós vizsgálatok.....	50
3.6.1 Immuncito- és hisztokémiai festés.....	50
3.6.2 Western blot.....	51
3.6.3 Duolink®.....	51

3.7	Metabolit koncentráció meghatározása.....	53
3.8	Statisztika.....	54
4	Eredmények.....	55
4.1	mTOR és Notch útvonalak aktivitásának összefüggése.....	55
4.1.1	HL sejtek konstitutív Notch-1 aktivitása.....	55
4.1.2	Konstitutív NOTCH1 aktivitás háttérének vizsgálata.....	58
4.1.3	mTOR és Notch1 szignál aktivitást befolyásoló kezelések hatása.....	59
4.1.4	mTOR és NOTCH1 inhibitorok tumornövekedésre gyakorolt hatásai	62
4.2	Hodgkin lymphoma sejtek mTORC1 és C2 komplex aktivitás vizsgálata.....	65
4.2.1	mTOR aktivitási különbségek karakterizálása <i>in vitro</i>	65
4.2.2	mTOR inhibitorok tumornövekedés gátló hatása HL sejtekben	68
4.3	HL sejt vonalak anyagcsere folyamatai az mTOR aktivitás függvényében	71
4.3.1	HL sejt vonalak alap metabolikus aktivitása és összehasonlítása	72
4.3.2	Az mTOR inhibitorok metabolikus hatásai HL sejtekben	73
4.3.3	HL sejtek tápanyag-, energia-hasznosítási folyamatai	75
5	Megbeszélés.....	78
5.1	A Notch és az mTOR szignál aktivitásának kapcsolata HL-ban	78
5.2	mTOR komplexek aktivitása HL sejtekben.....	82
6	Következtetések.....	85
7	Összefoglalás.....	86
8	Summary.....	88
9	Irodalomjegyzék.....	90
10	Saját publikációk jegyzéke.....	108
11	Köszönetnyilvánítás	110

Rövidítések jegyzéke

4EBP1	4E kötő fehérje 1
ABC	avidin biotin komplex
ABVD	doxorubicin, bleomycin, vinblastine, dacarbazine
ADP	adenozin-difoszfát
AKT	v-akt egér thymoma virális onkogén homológ; szerin/treonin kináz
ALL	akut lymphoid leukémia
AML	akut myeloid leukémia
AMPK	adenozin-monofoszfát-aktiválta kináz
ATCC	American Type Culture Collection
ATF4	aktiváló transzkripció faktor 4
ATG	autofágia-kapcsolt gén
ATM	Ataxia Telangiectasia mutált fehérje
ATP	adenozin-trifoszfát
BAFF	B-sejt aktiváló faktor
BCR	B-sejt receptor
BLK	B-lymphocyta kináz
BRAF	V-raf egér sarcoma virális onkogén homológ B1
C1	komplex 1
C2	komplex 2
CCL5	kemokin ligand 5
CD40L	differentiálódási klaszter 40 ligandja
CLL	krónikus lymphoid leukemia/kis lymphocytás lymphoma
CLPs	lymphoid progenitorsejtek
CMPs	myeloid progenitorsejtek
c-MYC	celluláris myelocytomatosis onkogén
c-NOTCH1	hasított (aktivált) Notch1 receptor
Co-A	expresszió aktiváló kofaktor
Co-R	expresszió gátló kofaktor
CRC	colorectalis carcinoma
CT	komputertomográf

CVAD	ciklofoszfamid, vinkrisztin, doxorubicin és dexametazon
CXCR4/SDF-1	C-X-C kemokin receptor 4/stromal cell-derived factor 1
CSL	CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1 transzkripciós faktor
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DAPT	N-[N-(3,5-difluorofenilacetyl-L-alanyl)]-S-fenilglicin t-butilészter
DC	dendritikus sejtek
DEPTOR	DEP domain containing mTOR-interacting protein
DLBCL	diffúz nagy B-sejtes lymphoma
DLL	delta-like ligand
DN	dupla negatív
DNS	dezoxiribonukleinsav
ECL	erősített kemilumineszcencia
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
ERK	extracelluláris szignál-regulált kináz
ETP	korai thymikus progenitor sejt
FADH2	redukált flavin-adenin-dinukleotid
FAT	FRAP–ATM–TTRAP domén
FATC	C-terminuson elhelyezkedő FAT domén
FBS	fötális borjú savó
FBXW7	F-box/WD ismétlődéseket tartalmazó protein 7
FDG-PET	fluoro-deoxiglükóz pozitron emissziós tomográfia
FFPE	formalinban fixált paraffinba ágyazott
FKBP-12	12 kDa-os FK506-ot kötő fehérje
FoxO1	forkhead box O1 fehérje
FRAP	FKBP-rapamycin-asszociált fehérje
FRB	FK506-rapamycin kötő domén
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GDP	guanozindifoszfát
Glut1	glükóz transzporter1 fehérje
GRB10	növekedésfaktor receptort kötő fehérje 10
GSI	gamma-szekretáz inhibitor

GTP	guanozin- trifoszfát
HCC	hepatocelluláris carcinoma
HD	heterodimerizációs domén
HEAT	Huntington, elongációs faktor 3, PR65/A
HES-1	hairy/enhancer of split 1
HIF1α	hipoxia indukálta faktor 1 α transzkripció faktor
HK2	hexokináz 2
HL	Hodgkin lymphoma
HRP	torma-peroxidáz
HSC	haematopoetikus őssejt
ICC	immuncitokémia
IGF	inzulinszerű növekedési faktor
IGFR	inzulinszerű növekedési faktor receptor
IHC	immunhisztokémia
IL	interleukin
IRS-1	inzulin receptor szubsztrát 1
JAK	Janus kináz
LC-MS	folyadék kromatográfiás tömegspektrofotometria
LDHA	laktát dehidrogenáz A
LKB1	májkináz B1
MAML1	mastermind-like transzkripció koaktivátor1
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
mLST8	mammalian lethal with SEC13 protein 8
MPP	multipotens progenitorsejt
mSin1	mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1
MTHFD2	mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1
mTOR	mammalian target of rapamycin
NADH	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NEXT	Notch receptor extracellulárisan trunkált formája
NFκB	nukleáris factor κ B
NGS	újgenerációs szekvenálás
NHL	non-Hodgkin lymphoma

NICD	Notch-receptor intracelluláris domén
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidone
NOBA	3-nitrobenzil alkohol
NOBA	3-nitrobenzil alkohol
NRAS	neuroblastoma patkány sarcoma virális onkogén homolog
ORR	objektív válaszarány
PAX-5	paired box fehérje 5
PCR	polimeráz láncreakció
PDK	piruvát dehidrogenáz kináz
PEG300	polietilén glikol 300
PEST domén	prolin/glutamin/szerin/treonin-gazdag domén
PET	pozitron emissziós tomográfia
PFK	foszfofruktokináz
PI3K	foszfatidil-inozitol-3-kináz
PIK3CA	foszfatidil-inozitol-3-kináz katalitikus alegysége
PIKK	foszfatidil-inozitol 3 kinázt kötő kináz
PKC	protein kinase C
PRAS40	proline-rich AKT substrate of 40 k
Protor1/2	protein observed with rictor 1 and 2
p-S6	foszforilált riboszómális S6 fehérje
PTEN	tensin homolog deleted on chromosome 10
PVDF	polivinilidén fluorid
RAG	recombination activating genes
Raptor	regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin
RHEB	Ras homolog enriched in the brain
Rictor	rapamycin-insensitive companion of mTOR
RNS	ribonukleinsav
RT-PCR	reverz transzkripció-polimeráz láncreakció
S6K	riboszómális S6 kináz
SAHM1	MAML1-ből származtatott, alfa-hélixel kapcsolt molekula
SC	MAML1-ből származtatott, alfa-hélixel kapcsolt molekula
SCF	SKP1-CLU1-F-box

SDS	nátrium-dodecilszulfát
SGK1	szérum-, glükokortikoid indukált proteon kináz 1
SREBP	sterol regulatory element-binding protein 1
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SYK	lép tirozin kináz
TCRB	T-sejt-receptor-béta
TEC	thymus epithel sejtek
TFEB	Transcription factor EB
TGFβ	transzformáló növekedési faktor béta
TMA	szöveti multiblokk
TMS	trimetilklórszilán
TNFα	tumor nekrosis faktor α
T_{reg}	regulátor T-sejtek
TSC1/2	tuberous sclerosis komplex 1/2
TTRAP	TRAF és TNF receptort kodoló gén
ULK1	uncoordinated 51-like kinase 1
VEGF	vaszkuláris növekedési faktor

1 Bevezetés

A sejtek legkülönbözőbb funkcióinak, működésének szabályozásában nagyon fontos szerepet játszanak a jelátviteli útvonalak összességét jelentő jelátviteli hálózatok, amelyben számos ponton kapcsolódnak a különböző regulációs folyamatok egymáshoz. Ennek a bonyolult hálózatnak az aktivitása a sejt környezetétől és aktuális állapotától függően befolyásolja a sejtek differenciációját, proliferációját, túlélését vagy egyéb sejt-, szervspecifikus funkcióit. A hálózatban központi szabályozó szerepe van a számos növekedési faktor, stressz faktor, tápanyag- és energia ellátottságot monitorozó útvonalban is megjelenő mTOR (mammalian target of rapamycin) kináz fehérje aktivitásának is. Az mTOR aktivitás szabályozó szerepe jól ismert a sejtek fehérjeszintézisében, túlélésében, proliferációjában és anyagcseréjében egyaránt [1].

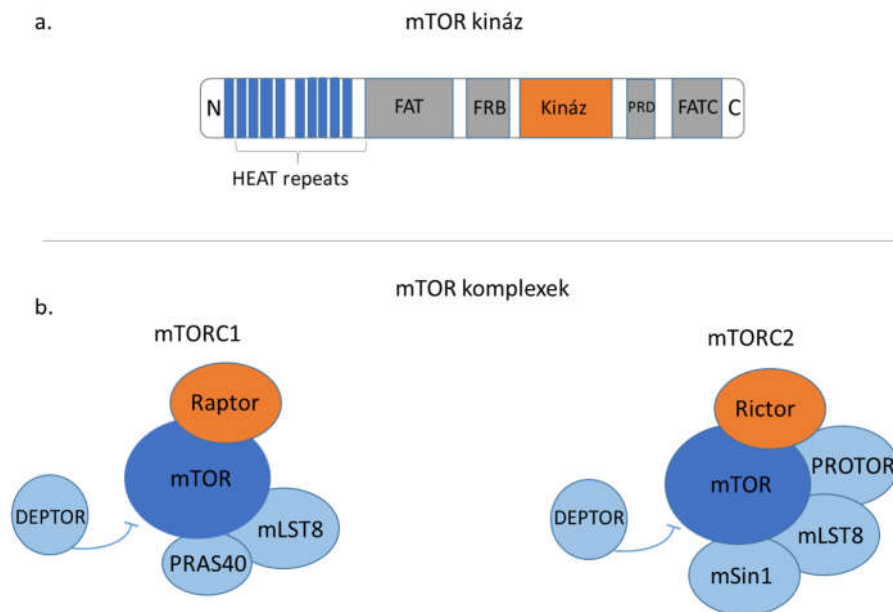
A daganatok kialakulásával és kezelésével kapcsolatos kutatásokban a PI3K/AKT/mTOR jelút elemeinek mutációs és aktivitás változásainak vizsgálata egyre több adatot szolgáltat [2]. A jelút fokozott aktivitása a daganatok többségében, szolid (pl.: emlő carcinoma, colorectalis carcinoma) és hematológiai malignitásokban (leukémiák, lymphomák) is jól ismert [1]. Különböző mTOR gátlók fejlesztése, klinikai alkalmazásának vizsgálata, egyes daganatok esetében a kezelések bevezetése, egyre nagyobb érdeklődésre tart számot. Párhuzamosan azonban még nincs elég adatunk arról, hogy az mTOR kináz aktivitását – a már sok esetben kimutatott hiperaktivitását – az adott daganattípusok esetében milyen tényezők vagy akár pontosan milyen, az adott daganatsejtekre jellemző jelátviteli változások eredményezik.

Doktori értekezésemben az mTOR jelátviteli útvonal aktivitását befolyásoló tényezők közül a Notch szignál aktivitás változásának szerepét vizsgáltam humán Hodgkin lymphomákban (HL) és colorectalis carcinomákban (CRC), illetve előbbieknél különböző modell rendszereiben. A vizsgálatokban az mTOR jelút anyagcserefolyamatokat szabályozó szerepét és tumornövekedésre gyakorolt hatását különböző mTOR inhibitorok (mTORI) segítségével is tanulmányoztam.

1.1 mTOR kináz

Az mTOR (mammalian target of rapamycin) szerin-threonin kináz elnevezését az 1970-es években a Húsvét-szigeten (Rapa Nui) felfedezett, *Streptomyces hygroscopicus* baktérium fajból izolált gátlószeréről, az eredetileg gombaellenes majd később immunszuppresszív hatóanyagként jellemzett rapamycinról kapta [3].

A fehérje domén szerkezet alapján a foszfatidil-inozitol 3 kinázt kötő kináz (PIKK) családba tartozik. N-terminális részén két, tandem ismétlődő α -hélixekből felépülő HEAT (Huntington, elongációs faktor 3, PR65/A) motívum helyezkedik el, melyet a FAT (FRAP–ATM–TTRAP) és az FRB (FKBP12-rapamycin-kötő) domén követi [4]. Az FRB domén a kináznak az a része, ahova az FKBP12 fehérje nagy affinitással kapcsolódik, a rapamycin ezen keresztül kötődik és képes a kináz domén aktivitását gátolni. A C-terminális felé haladva a kináz domén, a PRD (szabályozó régió) domén valamint a FATC (FRAP ATM TRRAP karboxi terminus) domén található a fehérjében (1. ábra a.) [5]



1. ábra Az mTOR kináz fehérje doménjei (a.) és az mTOR komplexek szerkezete (b.)

Az mTOR fehérje két nagy méretű multiprotein komplexben található a sejtekben. Ezeknek több eleme is azonos, az egyes komplexre jellemző egyedi fehérjék azonban biztosítják a két komplex szerkezeti, funkcionális és a különböző gátlószerekkel szembeni érzékenység különbségeit. Mindkét komplexben megtalálható az mTOR kináz és az mLST8 (mammalian lethal with sec-13 protein 8) kis adapter fehérje. A Raptor

(regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin) és a PRAS40 (proline-rich Akt substrate 40 kDa) az mTORC1 komplexben, míg a Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSin1 (mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1) és a Protor1/2 (protein observed with rictor 1 and 2) fehérjék az mTORC2 komplexben fordulnak elő [6]. A két komplex szerkezeti és működésbeli különbségeinek kialakításában a Raptor és a Rictor „scaffold” fehérjék fontos szerepet töltenek be, hozzájuk kötve tudnak a szabályozó és a target fehérjék kapcsolatba kerülni a kináz doménnel (1. ábra b.). A DEPTOR (DEP domain containing mTOR-interacting protein) fehérje – a kináz FAT-doménjéhez kapcsolódva – a komplexek szerkezeti különbségeitől függetlenül gátolja azok aktivitását [7].

1.2 mTOR jelút

Az mTOR kináz számos intracelluláris és extracelluláris folyamat szabályozásában vesz részt, befolyásolja a növekedést, a sejtproliferációt, energia és oxigén ellátást, stressz reakciókat, gyulladási folyamatokat, fehérje és lipid szintézist és az autofágiát. Az mTORC1 és C2 fontos elemei a PI3K-AKT jelútnak, valamint különböző növekedési faktor, tirozin kináz receptor útvonalaknak. A legkülönbözőbb receptorok aktivációjukat követően a foszforilációs kaszkádban, a PI3K foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP2) foszfatidilinozitol-3,4,5-trifoszfáttá (PIP3) alakítják (2. ábra). Ennek az átalakulásnak negatív szabályozója a PTEN (tensin homolog deleted on chromosome 10), jól ismert tumor szuppresszor fehérje, ami a PIP3-at visszaalakítja PIP2-vé. A foszforilációk sorozatát a protein dependens kináz (PKD), majd AKT szerint-threonin kináz fehérje aktivációja követi. Az AKT Thr 308-as helyen bekövetkező foszforilációja gátolja tuberous sclerosis komplex 1/2 (TSC 1/2) szintén gátló hatását a szignálban. A TSC1/2 komplex a RHEB (Ras homolog enriched in the brain) fehérjéhez kötött GTP GDP formává alakítását katalizálja, így negatívan befolyásolja az mTORC1 aktivációját [8]. A TSC1/2 fehérje számos más, a sejt aktuális állapotát monitorozó szabályozó útvonallal áll kapcsolatban [9, 10]. Ezek aktivitásának megfelelően a RHEB-GDP-kötött forma felé történő eltolódást katalizálhatja például az adenosin-monofoszfát-aktivált kináz (AMPK) is, amely aktivitása a hipoxiával és az alacsony energia ellátottsággal, az ATP/ADP arányával hozható összefüggésbe [11]. Más daganattípusok esetében ismert hiperaktív szignálok pl. a Wnt szignál, a TNF α jelátviteli útvonal vagy az EGFR útvonal, a PI3K-

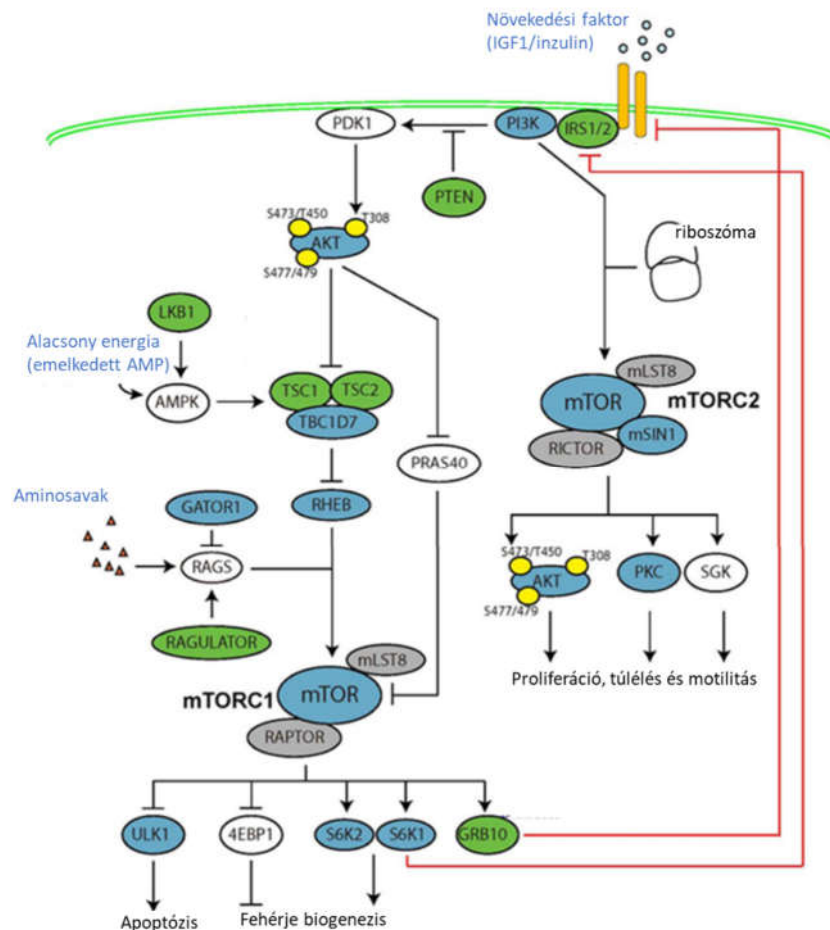
tól függetlenül, az AKT-hoz hasonlóan gátolja a TSC1/2 komplexet [12, 13]. Az előbbi regulációs útvonalak mellett, az mTORC1 komplex aktivitás szabályzásban kiemelkedő jelentősége van a komplex lizoszómális lokalizációjának is, amelyet a különböző aminosavak koncentráció viszonyai, a sejtek aminosav ellátottsága határoz meg. Amennyiben előbbiek mennyisége nem elégséges (elsősorban az arginin és a leucin mennyisége alacsony) akkor az mTORC1 komplex a RAG fehérjéken keresztül nem kapcsolódik a lizoszómák külső felszínéhez, és ebben az esetben az RHEB fehérje aktiválódása (RHEB-GTP) ellenére sem történik meg az mTOR kináz, illetve az mTORC1 komplex aktivációja [14, 15].

Az mTORC2 komplexben levő mTOR kináz aktivitásának szabályozásáról jóval kevesebb adat áll rendelkezésünkre, az mTORC1-hez hasonlóan, aktivitásának szabályzásában rendkívül fontos szerepet játszanak a különböző növekedési faktor útvonalak. A két komplex nemcsak szabályzásában és alkotó fehérjéinek összetételében, de targetjeiben és a szabályozott folyamatokban is különbözik [16, 17].

Az mTORC1 legjobban ismert célfehérjei: a riboszómális S6 kináz (S6K) illetve a 4E kötő fehérje (4EBP). Ezek aktivitása az S6 fehérje foszforilációján, illetve az elongációs faktor aktivitásának szabályzásán keresztül a riboszóma translációs hatásához, elsősorban a 5' cap-függő mRNS-ek translációjához kapcsolódnak – a „cap”-függő translációs folyamatok olyan onkogének átírását is érintik, mint pl. a c-MYC, ciklinD vagy a VEGF [18, 19]. Fontos más transzkripciós faktorok, amelyek az mTORC1 aktivitás szabályzása alatt állnak pl.: az ATF4 (aktiváló transzkripciós faktor 4), ami az *MTHFD2* gén expressziót indukálja; a Lipin1 fehérje aktivitáson keresztül az SREBP (sterol regulatory element-binding protein 1) transzkripciós faktorok, amelyek a lipidszintézisben játszanak szerepet; illetve a HIF1 α , ami a hipoxiával összefüggő változásokra jellemző [20-22]. Ezek a faktorok befolyásolják a nukleotid, a lipid szintézis és a glükóz metabolizmus folyamatait C1 komplex anyagcsere szabályozó hatásaiban [23]. Más a tumorbiológiai hatásokat tekintve fontos anyagcsere folyamatok, mTORC1 komplex által szabályzott a lizoszómák és a proteaszómák (TFEB; Erk5) összeszerelődése valamint az autofágia is [24]. Az mTORC1 aktivitás bizonyos autofagoszóma alkotó fehérjék foszforilációján (ATG és ULK inaktíválódnak) keresztül gátolja az autofágiát [25].

Az mTORC2 komplex szabályozó szerepéről is egyre több adat ismert. Az mTORC2 egyik legjobban ismert célfehérjéje az AKT kináz, mely 473-as szerinjének (Ser 473) foszforilációja mTORC2 aktivitás függő [26]. Ez a foszforiláció, az AKT teljes mértékű aktivációjának feltétele, így az mTORC2 hiperaktivitása számos AKT függő folyamatot befolyásol. Az AKT aktivitás a sejtek túlélését, anti-apoptotikus hatásait pozitívan befolyásoló szerepe rendkívül jól ismert, daganatbiológiai jelentőségéről számos adat áll rendelkezésre [27].

Az mTORC2 komplex célfehérjéi között a protein kinase C (PKC) és a szérum-, glükokortikoid indukált protein kináz 1 (SGK1) a sejtek túlélését (FoxO1-en keresztül) és citoskeletális átépüléseit befolyásolva érintik a daganatprogressziót, a különböző rezisztencia problémákat és a sejtek migrációs folyamatait (2. ábra) [28].



2. ábra: PI3K/AKT/mTOR jelút [29]

mTORC1 és mTORC2 aktivitásának szabályozásában, hatásában résztvevő folyamatok és fehérjék. Talpas nyíl (—) a gátlást egyszerű nyíl (→) az aktiválást jelzi. A negatív visszacsatolási hurkot piros színű nyíl jelöli.

Az mTOR jelátviteli útvonal egyik legjobban ismert negatív visszacsatoló szabályozó mechanizmusa az S6K aktivitás (negatív „feedback” mechanizmus). Az mTORC1 aktivitás eredményeként aktiválódó S6K foszforilálja az inzulin receptor szubsztrát-1 (IRS-1) fehérjét és így a PI3K folyamatos aktivációja szakad meg. Ez az S6K negatív visszacsatolás közvetetten, más útvonalak pl. az ERK/MAPK útvonal aktivitását is csökkentheti (2. ábra) [30].

1.3 mTOR gátlók

Az mTOR komplexek szabályozó szerepének, aktivitás változásainak megismerése hozzájárult daganatbiológiai és számos betegséget (pl. elhízás, öregedés) érintő hatásainak megértéséhez. Fiziológiai és patofiziológiai szabályozó szerepük jelentőségét megfigyelhetjük a diabetes kialakulásban, a kardiovaszkuláris vagy kiválasztó szervrendszeri, illetve bizonyos idegrendszeri betegségekhez kötődően [31]. Az mTORC1 komplex fokozott aktivitását figyelték meg például β -adrenerg, angiotenzin-II és inzulin növekedés faktor-1 stimulációra bekövetkező szívizom hipertrofia során. Ezekre a hatásokon alapul a szívinfarktus esetében az mTORC1 gátlás alkalmazásának lehetősége (mTORC1 inhibitor sztentek), mely során ischaemia miatt keletkező alacsony tápanyag ellátottságú területeken az mTOR gátló autofágia aktiválásával segíti a szívizomsejtek túlélését [32].

A tanulási folyamatokban és memória kialakításában is alapvető fontossággal bír az mTOR aktivitás megfelelő szabályozása, az agy tápanyag ellátottságának függvényében. A nem megfelelően szabályozott, fokozott mTOR aktivitás a fehérje transzláción és az autofágia gátlásán keresztül vezethet azoknak a fehérjéknek a felhalmozódásához is, amik például az Alzheimer-kór (amiloid prekursor fehérje A β peptidje), a Parkinson-kór (α -szinuklein) és a Huntington-kór (poliglutaminált huntington fehérje) kialakulásában játszanak szerepet [33, 34]. A neurodegeneratív betegségek kialakulása mellett a megváltozott mTOR aktivitás szerepe agydaganatok esetében sem ismeretlen [35].

Az mTORC1 a glükóz homeosztázis szabályozásának is fontos tényezője, a II-es típusú cukorbetegség kialakulását jelentősen befolyásolja, az elhízással is összefüggő, aktivitás zavara (hiperaktivációja). Hasnyálmirigy β -sejtjeiben a fokozott mTOR aktivitás a sejtek aktuális állapotának függvényében kettős hatású: az mTOR fokozott aktivitása a fiatalabb mirigysejtekben az inzulin termelés fokozását eredményezi, ezek a sejtek jó

glükóz toleranciát mutatnak; míg az idősebb sejtek esetében az mTOR aktivitás hiperglikémiát eredményez. A II-es típusú cukorbetegség kialakulása során is ez a kettősség jellemző, a hasnyálmirigy β -sejtek az elhízás mellett fennálló folyamatosan fenálló magas glükóz szint kompenzálására inzulint termelnek egészen addig míg egyfajta „kimerülési” állapot következik be (az mTORC1 aktivitás negatív visszacsatolási útvonalán, az Akt vezérelt túlélési szignálok gátlódnak, a sejtek elpusztulnak) [1].

Az előbbiekkal és a mTOR hiperaktivitás daganatbiológiai szerepével függ össze az mTOR aktivitás öregedési folyamatokban játszott szerepe is. Az mTOR gátlás és a csökkentett tápanyag bevitel élethossz növekedéshez, különböző öregedési folyamatok lassulásához is vezethet. Ezt a jelenséget állatmodelleken (fonálférgeken, ecetmuslicákon és egereken) végzett kísérletek is igazolták, habár a folyamat pontos mechanizmusa még teljesen nem ismert [36-38].

A PI3K/AKT/mTOR hiperaktivációja sok esetben az útvonalban résztvevő vagy szabályozó onkogén fehérjék stimulációjának és/vagy tumorszuppresszor fehérjék hibás működésének következménye [39]. Ezek közül a legfontosabbakat és bizonyos daganatok esetében a mutációk előfordulásának gyakoriságát a dolgozat 1.5.1 Mutációk című részében mutatom be. A rapamycin sejtnövekedést befolyásoló hatásainak megismerése megalapozta a különböző inhibitorok fejlesztésének igényét, így rapamycin mellett több mTOR inhibitor (mTORI) jelent meg az elmúlt évtizedekben.

1.3.1 Klasszikus mTOR inhibitorok

A klasszikus mTORI-ok két nagy csoportba sorolhatóak: rapamycin (sirolimus) és a rapamycin analógok (rapalógok) csoportjába. A rapamycin volt az első izolált mTORI, melyet a *Streptomyces hygroscopicus* baktérium faj gomba ellenes hatóanyagaként fedeztek fel. Nevét a baktérium izolálásának helyszínéről, a Húsvét-szigetről (helyi nyelven Rapa Nui) kapta a hatóanyag. Elsőként, a gombák növekedés gátlása mellett immunszuppresszív tulajdonságait jellemezték és igazolták [3].

A rapamycin és a rapalógok a 12 kDa-os FK506-ot kötő fehérjével (FKBP-12) komplexet alkotva, az mTOR kináz FRB doménjéhez kötve allosztérikusan gátolják a komplex összeszerelődését, ezen keresztül az mTORC1 komplex függő kináz aktivitását [40]. Az mTORC1 illetve C2 komplexek szerkezeti különbségei miatt az mTORC2

esetében a rapamycin-FKBP12-mTOR kináz kötődés és így az mTORC2 gátlása nem jöhet létre. Az mTORC1 gátló rapamycin és a rapalógok indirekt mTORC2 komplex aktivitást befolyásoló hatásai azonban még kevésbé tisztázottak. Hosszútávú és nagyobb dózisú rapamycin kezelést követően csökkent mTORC2 aktivitást figyeltek meg bizonyos vizsgálatokban, az mTORC1 aktivitás mTORC2 komplex összeszerelődésében játszott szerepét, illetve egyéb aktivitás befolyásoló funkcióját feltételezik [41].

Az FDA (USA Élelmiszer- és Gyógyszerellenőrzési Hatósága) 1999-ben hagyta jóvá a rapamycin alkalmazását vesetranszplantáció után az allograft kilökődés gátlásában, ezt követően direkt tumornövekedést gátló hatását először 2002-ben írták le, vesetranszplantációt követő immunszuppresszió mellett kialakult vesedaganat kezelésében. Az immunszuppresszió fentartása érdekében rapamycin konverziót végeztek és ezt követően figyelték meg a tumor méretének csökkenését, jelentős regresszióját. Később igazolták a rapamycin és rapalóg kezeléseket sejtproliferáció gátló, sejtciklus G1 blokkot elidéző hatását *in vitro* és *in vivo* modellekben is [42, 43].

Rapamycin különböző származékainak alkalmazását számos daganat esetében engedélyezték. A vesedaganatok mellett elsőként a köpenysejtes lymphomák (MCL) kezelésében vezették be, mint lehetséges terápiás eszköz. Igazolták az mTORC1 aktivitás szerepét a MCL-ban jellegzetes cyclin D1 fehérje túltermelésében, illetve ennek összefüggését a daganat növekedésével [44]. Jelenleg egyre több rossz prognózisú daganatos betegség esetében van lehetőség rapalógok alkalmazására, például előrehaladott emlőrákban, gyomor-bélrendszeri daganatokban és neuroendokrin tumorokban is. A legkülönbözőbb új generációs inhibitorok klinikai vizsgálata pedig zajlik [45].

A rapalógok a rapamycinhez hasonló szerkezettel rendelkező allosztérikus inhibitorok, oldékonysági és stabilitási tulajdonságaik jobbak. A három jelenleg klinikai alkalmazásban elérhető rapalóg a temsirolimus (CCI-779), everolimus (RAD001) és a ridaforolimus (MK-8669). A temsirolimus intravénás használatát 2007-ben hagyta jóvá az FDA egy veserákos betegeken végzett III. fázisú klinikai vizsgálat után, majd ezt követően kiújuló vagy kezelésre nem reagáló MCL esetében is bevezetésre került (1. táblázat) [45].

Az everolimus kezelés szintén veserákos betegeken végzett klinikai vizsgálatokat követően került bevezetésre elsősorban világossejtes veserákban, pancreas eredetű

neuroendokrin tumorokban és emlőrásokban. Utóbbinál aromatázgátló kezelések után második vonalbeli kezelésként alkalmazható. Az everolimus kezelés terápia rezisztens Hodgkin és non-Hodgkin lymphomás betegeknél is hatékonynak bizonyult, a betegek 47%-ában 7,2, illetve 5,7 hónappal hosszabb túlélést eredményezett (30%-os objektív válaszaránnyal-ORR), de jelenleg csak bizonyos nagyon rossz prognózisú, többszörösen visszaesett HL vagy NHL betegek esetében van lehetőség, többségében egyéni elbírálást követően mTORC1 gátló kezelésre [46]. Előbbiekén túl, az everolimus másod és harmadvonalban kezelési lehetőséget nyújthat a metasztatizált endometrium carcinomák, akut myeloid leukémiák (AML), glioblastomák és szarkómák esetében is.

1.táblázat: Első generációs mTORI-ok fejlesztése és terápiás alkalmazása (<https://clinicaltrials.gov> adatok alapján)

Rapalógok	Jelenlegfutó fázis vizsgálatok	Fejlesztő	Vizsgált daganattípus	Daganattípusok, melynél bevezetésre került
Everolimus	I.-IV.	Novartis	emlőcarcinoma, pancreas eredetű neuroendokrin tumorok, NHL	VEGF-gátló kezelt világossejtes veserákok; pancreas eredetű neuroendokrin tumorok; ER-pozitív, HER2-negatív emlőrások, endometrium carcinoma
Temsirolimus	I.-IV.	Pfizer	NHL, veserákok, emlőcarcinoma és különböző szolid daganatok	nem kezelt súlyos rizikófaktorú veserákok; MCL
Ridaforolimus	I.-II.	Merck	emlőcarcinoma és különböző szolid daganatok	nem került bevezetésre

Az mTORI-okkal eddig végzett monoterápiás klinikai kísérletek eredményei, az előbbi és inkább egyedi sikerektől eltekintve, a várttól elmaradtak. Ennek hátterében több tényező is lehet: 1. a rapamycin kezelés a legtöbb esetben antiproliferatív hatásának bizonyult, de nem volt citosztatikus hatása, lassította ugyan a betegség progresszióját, komplett remissziót azonban csak nagyon ritkán regisztráltak; 2. a rapamycin hatása nem érintette az összes mTOR célfehérje aktivitását (pl: 4E-BP1 foszforilációja megmaradt); 3. a rapamycin rapalóg kezelés az mTORC1-et gátolta, a C2 aktivitást így az AKT fehérje a Ser473-as foszforilációját azonban nem gátolta, a daganatsejtek túlélési folyamatait

nem befolyásolta (pl. azokban a tumorokban ahol a C2 komplex jelenlétét, nagy mennyiségét írták le a rapamycin kezelés kevésbé lehet hatásos); 4. a negatív visszacsatolási útvonalak – amelyek gyakori okai lehetnek az mTORC1 inhibitorokkal szemben kialakuló rezisztenciának – például az S6K tirozin kináz vagy a GRB10-es fehérje (növekedésifaktor receptort kötő fehérje 10) negatív hatásai maradtak el, és így az mTORC1 gátlás esetében az AKT vagy más útvonal (ERK/MAPK) aktivitása fennmaradt (2. ábra) [47, 48].

1.3.2 Új generációs mTOR inhibitorok

Az új generációs mTORI-ok, amelyek komplextől függetlenül gátolják az mTOR kinázt, mindkét mTOR komplex aktivitását egyformán, illetve akár ezzel párhuzamosan más, a jelátviteli hálózatban „upstream” fehérjék – AKT vagy a PI3K – aktivitását is képesek gátolni. Ezek a kis molekulású gátlószerek allosztérikusan az mTOR kinázt és/vagy a PI3K-t blokkolják, a kináz katalitikus doménjéhez kötődve.

A második generációs mTORI-okat a kináz katalitikus aktivitás gátlására fejlesztették, ATP kompetitív hatásuk miatt lehetőség van a C1 és C2 komplex egyidejű gátlására. Az első ilyen gátlószer a PP242 volt, ami hatékonyan gátolta a 4E-BP fehérje foszforilációt is (Thr37/Thr46), ami rapamycin kezelés mellett számos esetben érintetlen maradt [49, 50]. A PP242 hasonlóan hatásosnak bizonyult a rapamycin kezeléssel szemben rezisztens AKT indukált tumorsejtek túlélésének gátlásában is. Ugyanígy a PP242 származékként fejlesztett MLN0128 (INK128), ezt hasonlóan a PP242-höz jelenleg is tesztelik több klinikai fázis vizsgálatban (35 teljesített vagy jelenleg is futó fázis I/II vizsgálat [<https://clinicaltrials.gov>]) szolid és haematológiai daganatokban egyaránt (2. táblázat) [51].

2. táblázat a., b. : Új generációs mTOR inhibitorok és eddig lezárult klinikai vizsgálatok (<https://clinicaltrials.gov> adatok alapján)

a.

mTORI-ok	Gátlószer neve	Klinikai vizsgálatok státusza	Teljesített klinikai vizsgálatok	Fejlesztő	Vizsgált daganattípus
2. generációs	PP242	prekilikai US7585868	nincsenek		Endomerium carcinoma, myeloma multiplex (MM), prosztatarák
2. generációs	AZD8055	fázis I.	NCT00973076, NCT01316809, NCT00999882, NCT00731263	AstraZeneca	Glioma, hepatocelluláris carcinoma (HCC), lymphómák
2. generációs	AZD2014	fázis I./II.	NCT01026402, NCT01793636, NCT02403895	AstraZeneca	Vesedaganatok, tüdődaganatok
2. generációs	MLN0128 (INK128)	fázis I./II.	NCT01118689, NCT01351350	Intellikine	Előrehaladott szolid és haematológiai tumorok, Walderström macroglobulinaemia, prosztatarák
2. generációs	CC-223	fázis I./II.	NCT01611467, NCT01177397, NCT01896323, NCT01545947	Celgene Corporation	MM, DLBCL, glioblasztóma, HCC, neuroendokrin tumorok, emlődaganatok
3. generációs	RapaLink-1	fejlesztés alatt		Rodrik-Outmezuine és mts.[52]	Emlő sejtvonal, glioblastoma xenograft
Duálinhibitor	NVP-BEZ235 (dactolisib)	fázis I./II.	NCT01343498, NCT01453595, NCT01658436	Novartis	Vesedaganatok, emlődaganatok, prosztata daganatok, neuroendokrin daganatok, ALL, CML
Duálinhibitor	GSK2126458	fázis I.	NCT00972686	GlaxoSmithKline	Szolid daganatok
Duálinhibitor	XL765 (SAR245409)	fázis I./II.	NCT01240460, NCT01082068, NCT00777699	Sanofi	Emlődaganatok, kissejtes tüdőrák

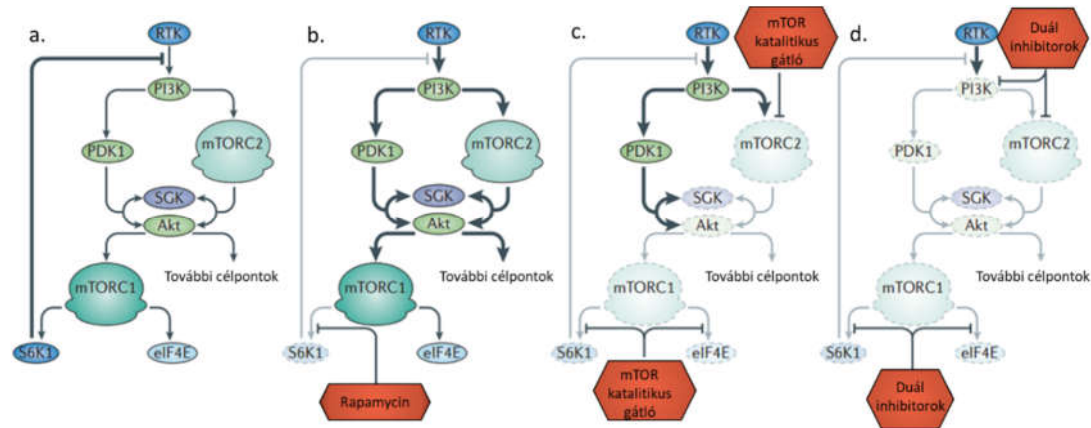
b.

mTORI-ok	Gátlószer neve	Klinikai vizsgálatok státusza	Teljesített klinikai vizsgálatok	Fejlesztő	Vizsgált daganattípus
Duálinhibitor	GDC-0980	fázis I./II.	NCT01442090, NCT01455493, NCT00854126, NCT00854152, NCT01487239, NCT01254526, NCT01332604, NCT01287091, NCT01301716	Genentech, Inc.	Emlőrák, prostatarák, NHL, endometrium carcinoma, szolid daganatok
Duálinhibitor	PF-05212384	fázis I./II.	NCT00940498, NCT00940498, NCT01937715, NCT01925274, NCT01420081, NCT01347866	Pfeizer	Előrehaladott szolid tumorok, endometrium és metasztatikus colorectalis carcinoma
Duálinhibitor	PQR309	fázis I./II.	NCT01940133	PIQUR Therapeutics AG	Előrehaladott szolid tumorok, glioblastoma, lymphoma
Duálinhibitor	SF1126	fázis I./II.	NCT00907205	Semafore Pharmaceuticals	Előrehaladott szolid tumorok, metasztatikus laphám rákok, HCC
Duálinhibitor	vs5584	fázis I.	NCT01991938, NCT02372227	Verastem, Inc	Metasztatikus daganatok, lymphoma, mesothelioma

Ugyanebbe a gátlószerkategóriába sorolható a kinolon eredetű, jelenleg az AstraZeneca fejlesztése alatt álló Torin1 és a Torin2 inhibitor [53]. A sikeres preklinikai vizsgálatok megállapították, hogy elég legfeljebb 10 nM-os dózisban (Torin1 esetében elég 3 nM is) alkalmazni ezeket a gátlókat. Igazolták, hogy a Torin2 nagyon magas specificitással köt az mTOR kinázhoz (százszor szelektívebb az mTOR-ra, mint a PI3K-ra) [54]. Prekilinikai fázisban van két másik orális használatra fejlesztett AstraZeneca C1/2 inhibitor is (AZD8055 és AZD2014) amelyek proliferációgátló hatását több tumor sejtvonalban tesztelték monoterápiában és kombinációban (ibrutinibbel, MEK inhibitorral, paclitaxellel). Számos további mTORC1/2 gátló fejlesztése zajlik: Ku-0063794, Ku-0068650 (KuDOS Pharmaceuticals – AstraZeneca), WAY-001, WAY-600, WYE-687, WYE-354 (Wyeth-Ayerst - Pfizer) [55, 56].

Az mTORC1/2 inhibitorok mellett a duál inhibitorok a negatív „feedback loop” kiküszöbölésére is lehetőséget adnak (pl.: NVP-BEZ 235 PI3K-mTOR gátló). Ebben az

esetben nemcsak az mTOR kináz és az mTOR komplexek aktivitása gátolható, hanem a jelátviteli hálózat más elemeinek aktivitása is pl. a PI3K vagy az AKT (3. ábra) [57]. Az első ilyen inhibitor a PI103 volt, majd ennek származékai is megjelentek (PI450, PI620). A duál inhibitorok közül, a klinikai vizsgálatok alapján a legsikeresebb az NVP-BEZ 235 (Novartis), más ismertebb duál inhibitorok a GSK2126458 (GlaxoSmithKline), a XL765 (Sanof-Aventis and Exelixis), valamint a SF1126 (Semafore) [58, 59].



3. ábra: mTOR inhibitorok hatása az mTOR aktivitásra [16]

Az „a.” ábrán az mTOR útvonal aktivitásának hatásait mutatom be, az mTORC1/2 komplexek aktivitását és az S6K-on keresztüli negatív visszacsatolást is feltüntetve. Rapamycin csak az mTORC1 aktivitás gátlását idézi elő, ennek az is következménye, hogy az S6K negatív visszacsatolása nem működik (b.). Az mTORC1-et és 2-t egyaránt gátló inhibitorok ugyan mind a két komplexet hatékonyan képesek gátolni, de a negatív visszacsatolás hiánya miatt a PI3K aktivitása fennmaradhat (c.). A tirozin kináz receptor felől érkező szignál teljes gátlását a duál inhibitorokkal lehet elérni melyek pl.: PI3K-t és az mTOR-t együttesen gátolják (d.)

A duál inhibitor kezelések jó eredményeket mutatnak emlődaganatok és más szolid illetve haematológiai daganatok klinikai vizsgálataiban (fázis I/II), bár az elsőgenerációs inhibitorokhoz képest sem a második generációs inhibitorok, sem a duál inhibitorok nem mutatnak jelentős hatékonyság növekedést. Ennek hátterében több tényező állhat, úgymint a negatív visszacsatolási mechanizmusok vagy más szignálok aktiválódása, illetve a daganatsejtek túlélését is potenciálisan támogató az mTOR gátlása miatt aktiválódó autofágia [60].

Jelenleg már a harmadik generációs mTORI-ok (pl.: RapaLinks) tesztelése is elkezdődött olyan *in vitro* és *in vivo* modellekben, ahol a korábbi inhibitorok hatástalanok voltak. A RapaLinks-et például olyan esetekre fejlesztették ki, ahol az mTOR kináz FRB kötő doménjében (A2034V és F2108L) és a kináz doménjében (M2327I) mutáció alakul ki és emiatt nem hatásosak a korábban fejlesztett rapalógok, illetve egyéb mTOR kináz gátlószerek [52, 55].

A legnagyobb problémát a különböző új kezelések bevezetése esetén a mellékhatások, toxicitási problémák jelenthetik. Annak ellenére, hogy az mTORI-ok a hagyományos kemoterápiás szerekhez képest enyhébb mellékhatásokat mutatnak, a célzott jellegű hatásokból eredő mellékhatásaik azonban súlyosak, akár a kezelés felfüggesztését eredményezőek is lehetnek, így a mellékhatások klinikai követése, menedzselése nagy odafigyelést igényel [61].

Az mTORI mellékhatások jóval kedvezőbbek, mint más citosztatikumok esetében tapasztaltak. A betegek 10%-ánál észlelt pneumonitis általában tünetmentes vagy enyhe lefolyású, ugyanakkor a betegek rendszeres légzéskontrollja ajánlott. Az mTORI-ok immunszuppresszív hatásuk miatt fokozzák a fertőzésekre való hajlamot, korábbi fertőzések (például: hepatitis B, gombainfekciók) reaktiválódhatnak, ezért az előzetes kórtörténet ismerete is fontos. Egyéb mellékhatásként bőrkiütéseket, hipofoszfatómiát, hiperglikémiát valamint a betegek közel felét érintő stomatitis megjelenését regisztrálták, ami szteroiddal jól kezelhető, enyhíthető.

1.4 mTOR aktivitás haematológiai daganatokban

A hematopoetikus sejtek normális fejlődéséhez és funkciójához a hematopoetikus őssejtek és a csontvelői, valamint a perifériás mikro környezet összehangolt működésére van szükség. A hemopoetikus sejtek aktivációjában és differenciációjában a PI3K/AKT/mTOR szignál a jelátviteli hálózat részeként kapcsolatban áll mind a B-, mind a T-sejt receptor, illetve számos növekedési és citokin útvonallal, fontos szerepet játszik olyan fehérjék aktivitásának szabályozásában, amelyek az őssejtek elköteleződését, fejlődésének irányát határozzák meg. Előbbiek alapján nem meglepő, hogy a PI3K/AKT/mTOR útvonal hibás működése mind a myeloid, mind a lymphoid érési vonalak zavarát okozhatja [62].

Haematológiai daganatok esetében a PI3K/AKT/mTOR jelút szabályozási zavarai ígéretes terápiás célpontok. A PI3K/AKT útvonal aktivációja jellemzi pl. az AML (több mint 60%) és ALL betegek leukémia sejtjeit, és a legkülönbözőbb lymphomák kialakulásával is összefüggésbe hozták az útvonal hiperaktivitását (pl. MCL, Burkitt, Hodgkin lymphomák – HL – és Diffúz nagy B sejt lymphomák – DLBCL – stb.) [63]. Prekliniai vizsgálatok támasztják alá, a PI3K/AKT/mTOR jelút aktivitásának szerepét az myeloid blasztok fejlődésében (PI3K inhibitor és rapalóg proliferáció gátló hatású).

Számos klinikai fázis vizsgálat folyik AML-es betegek esetében különböző kemoterápiás szerek kombinációival is [64].

A *PTEN* funkcióvesztés kitüntetett szerepet tölt be a T-ALL-es sejtek mTOR aktivitás fokozódásában. Irodalmi adatok alapján az ALL-es betegek 8-30%-ánál rezisztencia problémák hátterében a *PTEN* tumorszuppresszor gén mutációját írták le [65]. Hasonlóan az előbbihez rossz prognózisú gyermekkori ALL-es esetekben munkacsoportunk egyértelmű összefüggést mutatott ki az ALL-es sejtek magasabb mTOR aktivitásával [66].

Lymphomákban is leírták a PI3K/AKT/mTOR útvonal szabályozási zavarát. DLBCL esetek 70%-ban az AKT, 10%-ában a PI3K katalitikus alegységét kódoló gén (*PIK3CA*) mutációja a lymphoma sejtek fokozott mTOR aktivitását eredményezheti, a mutáció megjelenése korrelál a rosszabb túlélési adatokkal és a rossz prognózissal [67, 68]. A B-sejtek túlélésének szabályozásában fontos szerepet játszik a BCR receptor útvonal, amely PI3K/AKT/mTOR jelút aktivitásának regulálásában is részt vesz [69]. Az emelkedett mTOR aktivitás és az ezzel összefüggő cyclin D1 emelkedett expressziója jellemzi a MCL sejteket, ami összefügg a magas mTORC1 aktivitással és a 4EBP fehérje foszforilációjával, ennek igazolása adta az evidenciát az mTORC1 gátlók MCL terápiába történő bevezetésének [49].

Az emelkedett mTOR aktivitást, a lymphoma sejtek és a különböző mikroenvironmentális hatások kapcsolatát a B-sejtek érését segítő CD40 ligandot termelő immunsejtek hatásait és a kóros B-sejt receptor stimulációval összefüggő hatásait, valamint ezek szerepét az AKT foszforilációban már korábban leírták [70]. Az emelkedett mTOR aktivitást és ennek prognosztikai szerepét non-Hodgkin lymphomák (pl: DLBCL, MCL) mellett, a Hodgkin lymphomás betegek HL sejteiben saját vizsgálatainkban mi is jellemeztük [71]. A HL-ás esetek több mint 90%-ában magas mTORC1 aktivitást figyeltünk meg, DLBCL-es esetében pedig egyértelmű prognosztikai összefüggéseket találtunk a két komplex aktivitás különbségeivel összefüggésben [68, 72].

1.4.1 Hodgkin-lymphoma

Vizsgálataim nagy részét HL-ákon végeztem, ezért ennek a (nyirokcsomó) daganattípusnak a jellegzetességeit részletezem. A jelenlegi Egészségügyi Világszervezet (WHO) osztályozása alapján a Hodgkin-lymphomák két nagy csoportba sorolhatóak: a

noduláris lymphocytapredomináns és a klasszikus Hodgkin-lymphomákra. A klasszikus HL-ák még további négy altípusra oszthatóak, a kevert sejtes, noduláris sclerosis (leggyakoribb típus, 50-70%-os megjelenés), lymphocyta gazdag és lymphocyta depléciós csoportra [73]. Eredetét tekintve a HL sejtek B-sejtek. A jellegzetes B-sejt transzkripciós faktorok (Oct-2, BOB-1), a BCR receptor és egyéb szignál molekulák (CD19, CD20, CD45; Syk, Lyn, Blk) alul expresszáltak ugyan, de a Pax-5 transzkripciós faktor (B-sejt elköteleződést segítő) és az antigén prezentáló sejtekre jellemző CD40 receptor azonban megfigyelhető a HL sejteken. A DNS vizsgálatok is folliculáris csíracentrum eredetű B-sejteknek azonosították a HL sejteket. A lymphoma sejtek (lymphocyta-/histiocyta-, Hodgkin- és Sternberg Reed-sejtek) a HL lymphoma szövet kis százalékát jelentik, és szinte mindig reaktív, gyulladásos leukocyták (pl.: eozinophil granulocyták, lymphocyták) veszik körbe ezeket [74].

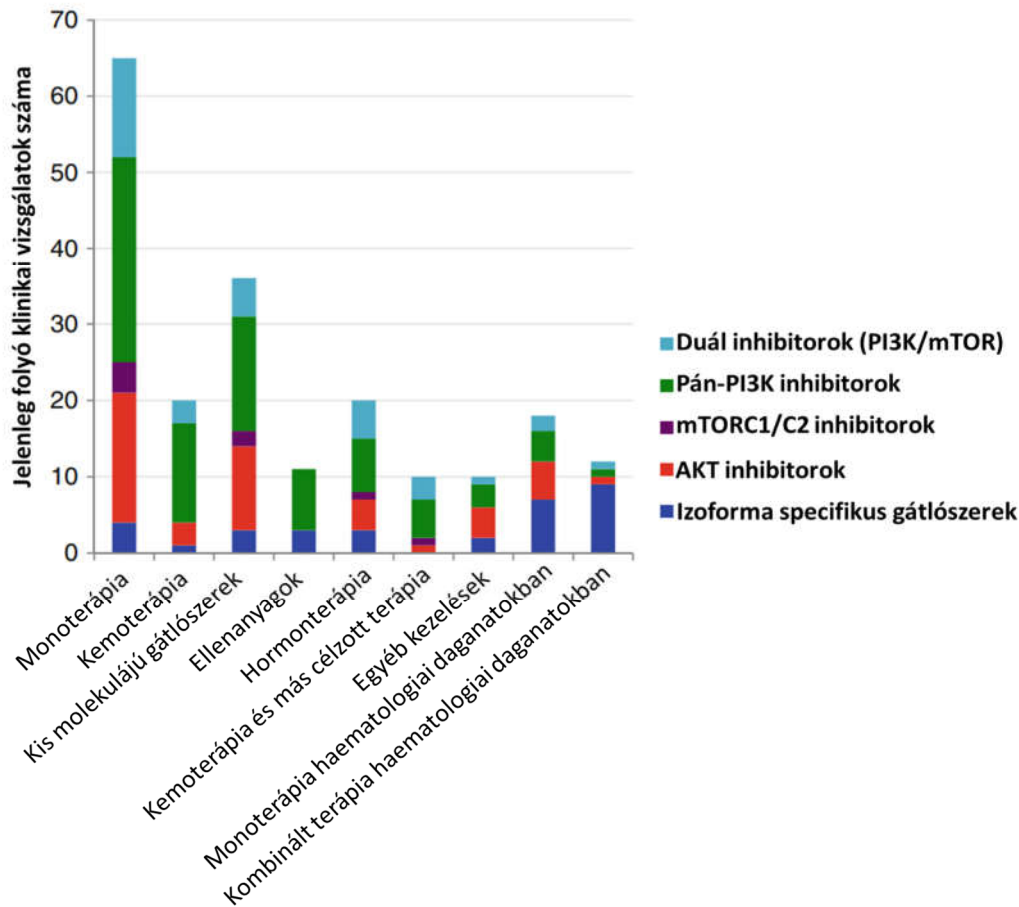
A Hodgkin-lymphomás betegek kezelésének terápiás eredményei igen jók, a betegek több mint 80%-ánál az adatok öt évnél hosszabb túlélést és esetek jelentős részében tünetmentes gyógyulást mutatnak. A kevertsejtes altípus kezelése azonban gyakran rosszabb eredményeket mutat, a betegek nagyobb százaléka progrediál. Az elsővonalbeli kezelések közé különböző kemoterápiás kezelések tartoznak (pl: ABVD – doxorubicin, bleomycin, vinblastine, dacarbazine), melyet adott esetekben a sugárterápiás kezelés is kiegészít. A rossz prognózisú, relapszust mutató betegeknél autológ őssejt transzplantáció javasolt, melyet relapszus rizikó függvényében, 2015 óta az FDA javaslatára, brentuximab (anti-CD30 antitest) megerősítő kezelés követhet. 2016 májusa óta, szintén az FDA engedélyével előtérbe került az immunterápiából ismert, anti-PD-1 ellenanyag, Nivolumab kezelés is. Ugyan a betegek jelentős része jól reagál a standard kezelésekre, a rosszabb prognózisú relabáló eseteknél kevés hatékony terápiás lehetőség ismert, ezért fontos lenne új, lehetőség szerint célzott terápiás kezelések bevezetése [75].

1.4.2 mTOR gátlók lymphomák és leukémiák kezelésében

A rapamycin és származékainak immunszuppresszív hatásai, valamint a haematológiai daganatokra jellemző mTOR hiperaktivitás felhívta a figyelmet az mTORI-ok várható hatásaira a kezelésben [76]. Az mTORC1 inhibitor Temsirolimust MCL-ban alkalmazzák, emellett AML és ALL esetében is folytak/folynak vizsgálatok, illetve más rossz prognózisú, terápia rezisztens, relabált non-Hodgkin (NHL) és Hodgkin lymphomáknál is vannak sikeres fázis vizsgálati eredmények. A legjobb monoterápiás eredményeket az mTOR gátló kezelések más tumorok kezeléséhez képest a NHL betegekben mutatták [77, 78].

Új generációs mTORI-okat jelenleg preklinikai és I/II klinikai fázis vizsgálatokban tesztelik ALL, krónikus lymphoid leukémia (CLL) és rossz prognózisú myeloma multiplexes (MM) betegek esetében.

Annak ellenére, hogy a rapalógok monoterápiában nem hoztak klinikai áttörést, számos daganat, így lymphomák esetében tesztelik hatásukat. Ezekben az esetekben a nem mTORI terápia rezisztenciát áttörő hatását vizsgálják, persze figyelembe véve a várható mellékhatás fokozódásokat is [79]. Fázis I/II vizsgálati eredmények alapján első vonalba került MCL esetében a Torisel kladribinnel és rituximabbal kombinálva (NCT00787969). ALL-es betegeknél fázis I/II vizsgálatban. Az everolimus és Hyper-CVAD (ciklofoszfamid, vinkrisztin, doxorubicin és dexametazon) kombináció 30%-ban komplett remissziót eredményezett, míg a temsirolimus alacsony dózisú clofarabine-nel kombinálva rossz prognózisú AML-es betegeknél 4 hónappal jobb túlélési mediánt mutatott. Előbbi sikerek alapján jelenleg számos fázisvizsgálat folyik HL-ák, NHL-ák és leukémiák esetében (4. ábra) [45, 80].



4. ábra: Jelenleg is folyó klinikai vizsgálatok PI3K/AKT/mTOR jelút gátlókkal[81]

A grafikonon a különböző mTOR inhibitorok monoterápiás vagy kombinált kezelések klinikai vizsgálatait mutatom be, az első hét oszlop szolid daganatos betegek klinikai vizsgálatait mutatja. **forrás:** <http://www.clinicaltrials.gov>

1.5 PI3K/AKT/mTOR jelút szabályozását érintő különböző tényezők

A jelátviteli hálózatban a PI3K/Akt/mTOR jelátviteli tengely számos más jelpályával állhat kapcsolatban a sejtek típusától függően, emellett azonban számos egyéb tényező, így a tumorsejtekben megjelenő különböző mutációk vagy egyéb más szabályozási zavarok is befolyásolhatják az útvonal aktivitását, regulációját.

1.5.1 Mutációk

Az útvonal szabályozási zavarát okozhatják az mTOR kináz aktivitását befolyásoló „upstream” hálózati csomópontokban található fehérjék funkcionális hibái. Számos onkogén fokozott, mutációkkal összefüggő aktivitása ismert ezekben az esetekben, ilyen például a PI3K katalitikus alegységének, az IGFR-nek, és az AKT-nak az aktiváló mutációja. Előbbiek mellett tumorszuppresszorok funkcióvesztéses mutációi a negatív reguláció elvesztésével, mint a PTEN-nek, az LKB1-nek (tápanyag ellátást szabályozó fehérje) vagy a TSC1/2-nek kiesésével járhatnak hozzá az emelkedett mTOR aktivitáshoz. Az alábbi táblázatban (3. táblázat) az útvonalban leírt gyakoribb, jellemző mutációkat és azokat a daganat típusokat foglaltam össze, amelyekben előfordulásuk jelentősebb [82].

3. táblázat: Az mTOR hiperaktivitással összefüggésbe hozható onkogén és tumor szuppresszor gén mutációk és azok előfordulása

Gén	Mutáció jellemzője	Gyakoribb daganat előfordulás
<i>AKT</i>	aktiváló	emlő és ovárium carcinoma
<i>4EBP1</i>	aktiváló	emlő, colon, ovárium és prosztaták
<i>eIF4E</i>	aktiváló	emlő, colorectalis carcinoma, fej - nyaki daganat, CML, AML és NHL
<i>PIK3CA</i>	aktiváló	emlő, ovárium carcinoma, endometriális carcinomoma, gasztrointesztinális tumorok
<i>Rheb</i>	aktiváló	emlő carcinoma, fej - nyaki laphám rák
<i>mTOR</i>	aktiváló	endometrium és vese carcinoma, tüdődaganatok, colorectalis carcinoma
<i>RICTOR</i>	aktiváló	melanoma, tüdődaganatok
<i>S6K1</i>	aktiváló	emlő, ovárium, tüdő, vese és hepatocelluláris carcinoma
<i>PTEN</i>	funkció kiesés	emlő carcinoma, prostata-, veserák, melanóma
<i>LKB1</i>	funkció kiesés	gasztrointesztinális hamartómák
<i>TSC1/TSC2</i>	funkció kiesés	hamartóma, lymphangiomeyomatosis (LAM)
<i>FBXW7</i>	funkció kiesés	T-ALL, colorectalis carcinoma, endometrium carcinoma

A PI3K fehérjék három különböző osztályából az I. osztályba tartozók mutációinak előfordulása a leggyakoribb az mTOR jelátviteli útvonal aktivitás változás szempontjából. A fehérjét érintő szomatikus mutációk lehetnek a kináz katalitikus (p110 α , β γ és δ) és a szabályozó (p85, p87, p101) alegységeiben is. A kináz katalitikus alegysége három mutációs „hotspot” rendelkezik, melyek a fehérje helikális doménjét (E542K és E545K) vagy a kináz doménjét érintik (H1047R). Ezen mutációk eredménye a fehérje hiperaktivása és a PI3K/AKT/mTOR jelút fokozott aktivitása [83]. A COSMIC adatbázisa alapján az emlő carcinomák 27%-ában, endometriális carcinomák 24%-ában, urogenitális daganatok 15%-ában, a colorectalis carcinomák 15%-ában fordul elő ilyen mutáció (más daganatokban ennél alacsonyabb gyakorisággal). Funkcióvesztéssel és -nyeréssel járó mutációk érinthetik a szabályozó alegységeket, ezek következménye aktivitás változás mellett, a fehérje stabilitás változása (leggyakoribb az endometrium és colorectalis carcinomákban).

A PTEN és a TSC1/2 tumorszuppresszor fehérjék mutációi az mTOR kontrollálatlan működését, hiperaktivációját eredményezhetik. Működészavaraikat a különböző doménjeikben bekövetkező mutációkon túl (pontmutációk, deléciók) epigenetikai és transzkripció szintű változások is okozhatják (pl.: *PTEN* promoter régió hipermetilációja). A TSC1/2 funkcióvesztő mutációja a lymphangiomiomatosis egyik karakterisztikus jellemzője [84, 85]. Funkcióvesztéses *PTEN* mutáció előfordulási gyakorisága előbbieken túl az endometrium carcinomákban a legmagasabb (38%), a központi idegrendszeri daganatok 12%-át érinti, de bőr, vastagbél, emlő és hasnyálmirigy daganatokban is gyakrabban (<10%) figyelhető meg és érintheti az urogenitális traktus, a máj és vastagbél daganatait is (COSMIC adatok alapján).

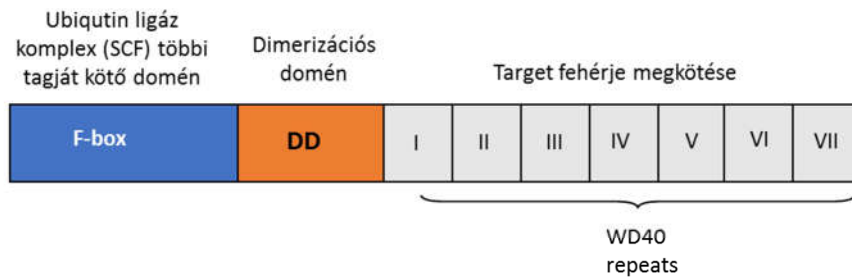
Az AKT fehérje aktiváló mutációi a TSC1/2 funkcióvesztéshez hasonlóan az mTOR emelkedett aktivitását eredményezhetik. Az AKT kináz három, 80%-ban strukturálisan homológ, izoformában fordul elő a sejtekben és többféle jelátviteli útvonal aktivitásával kapcsolatban áll [86, 87]. Az AKT1 aminosav cserével járó mutációja (E17K) a fehérje lipidkötő doménjét érinti, hatására az AKT folyamatosan aktív membránkötött formában marad (pl. emlődaganatok 3%, meningiomák 7%, endometrium carcinomák 2%)

A Rictor fehérje (mTORC2 komplex), amplifikációját tüdő daganatok (8-13%) és melanomák esetében azonosították. Azokban a tüődaganatokban, ahol *RICTOR*

amplifikációt írtak le ott az mTORC1/C2 gátlás hatásosnak bizonyult. Az első vizsgálatok alapján nem-kissejtes tüdőrákos betegek második generációs mTORI kezelésekor 18 hónapig a tumor méret stabilizálódását figyelték meg [88, 89]. Melanómák esetében a Rictor amplifikáció az NRAS mutáció státusztól független volt, továbbá hozzájárulhat az AKT aktivitásán keresztül az NRAS túlműködéséhez, míg a Rictor amplifikáció a BRAF mutáns melanómában egyben a *PTEN* funkcionális kiesésével társult [90].

Előbbiek mellett az mTOR kináz szomatikus mutációi is megfigyelhetők, ezek a kináz hiperaktivitását idézik elő [2]. A COSMIC adatbázisa alapján összesen eddig 96 különböző szomatikus pontmutációt azonosítottak. Ezek érinthetik a fehérje HEAT, FAT, FRB, kináz és a FATC doménjait is. A FAT domén mutációi az mTORC1 aktivációját idézik elő, de az mTORC2 függő AKT Ser473 foszforilálóját is fokozhatják. Kimutatták azt is, hogy az mTOR kináz funkcionális mutációi vese carcinomás betegek esetében szignifikánsan rosszabb túléléssel függenek össze [91]. Az mTORI-okkal szemben rezisztenciát kialakító mutációkat is leírtak már. Az FRB domén (rapamycinkötő FKBP12 kötőhely) A2034V és F2108L mutációja miatt a rapamycin nem képes bekötni, míg az M2327I kináz domén mutáció következtében az ATP kompetítorok is hatástalannak bizonyulnak. Leggyakrabban endometrium carcinómák (6%), bőrdaganatok (8%) valamint tüdődaganatok (3%) esetében fordul elő az FRB régió ilyen jellegű mutációja (COSMIC adatok).

A PI3K/AKT/mTOR jelút több fehérjéjének proteaszóma rendszeren keresztül történő lebontásában a SKP1-CLU1-F-borsz (SCF) E3 ubiquitin ligáz enzim vesz részt. Ennek egyik fontos komponense az FBXW7 (F-box/WD ismétlődéseket tartalmazó protein 7) F-box fehérje családba tartozó fehérje (5. ábra). Előbbi funkcióvesztéssel járó mutációja számos fehérjének például: a c-Myc, NF κ B, CyclinE, HIF1 α , Hes-1 és az mTOR felhalmozódását, eredményezheti, és ezen keresztül is segítheti a tumorgenezist. Az *FBXW7* mutációs „hot spot”-jait az ubiquitin ligáz aktivitást befolyásoló F-box doménben és a target fehérjéket kötő doménben írták le (T-ALL-ek, AML-ek; bizonyos emlő daganatok, gastrointestinális tumorok, és HCC-ák) [92].

FBXW7 (F-box and WD repeat domain-containing 7)**Funkció vesztéssel járó mutációk:**

- 5. Exon: F-box
- 6. Exon: F-box
- 9. Exon: WD III
- 10. Exon: WD IV
- 11. Exon: WDWI

5. ábra Az mTOR és NOTCH szignált is szabályozó E3 ubiquitin ligáz F-box fehérje

Az F-box fehérje génjében bekövetkező mutációk megakadályozhatják az SCF (SKP1-cullin-F-box) komplex felépítésű ubiquitin ligáz működését. A cél fehérjék (ld. szöveg) lebomlása nem következik be. A képen a leggyakrabban mutálódott exonokat és az általuk kódolt doméneket tüntettük fel.

A célzott terápiás szerek kifejlesztésében, a kezelések hatékony tervezésében rendkívül fontos a daganatok mutációinak, mutációs státuszának megállapítása. Számos klinikai és preklinikai vizsgálat igazolta, hogy a *PIK3CA* aktiváló mutációval rendelkező tumorsejtek (fej-nyaki laphámrák, emlőcarcinoma) szignifikánsan jobban reagáltak az mTORC1 inhibitor kezelésre, mint a vad típusú sejtek; illetve az olyan duálinhibitor kezelésre, ahol a PI3K és mTOR kináz párhuzamos gátlása történt meg.

1.5.2 Más szignál útvonalak

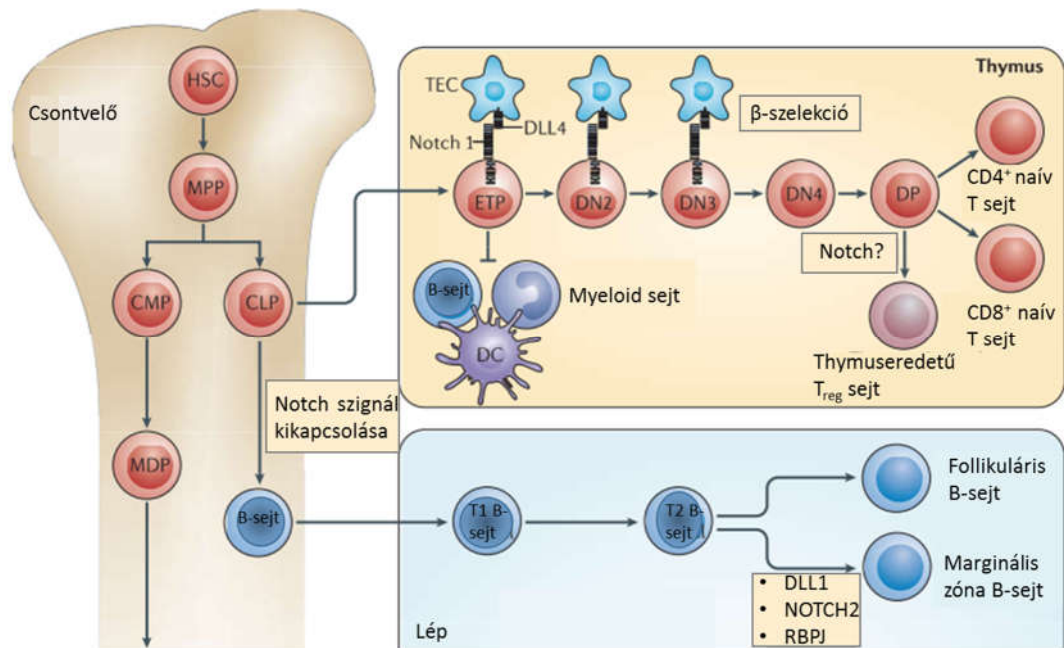
Az mTOR aktivitás a sejt állapotát szenzoráló, monitorozó útvonalakkal áll kapcsolatban, azok hatásainak összehangolásával számos sejtfunkció szabályozásában vesz részt. Munkám egy részében az mTOR és a Notch szignál útvonalak kooperációját, a két szignált gátló kezelések hatásait vizsgáltam így a számos, mTOR aktivitást

befolyásoló szignálútvonal közül a Notch jelútvonal ismertetését és eddig ismert funkcionális és daganatbiológiai szerepét foglaltam össze ebben a fejezetben.

1.5.2.1 Notch szignál

A legkülönbözőbb sejtek túlélését, differenciációját különböző jelátviteli utak aktivitásának egyensúlya határozza meg. A Notch szignál a sejt-sejt közötti kommunikációs kapcsolatokban kitüntetett szerepet játszó útvonal, amely a sejt fejlődése során a differenciációt különböző sejtípusok irányába határozhatja meg. A Notch útvonal legjobban jellemzett funkciói az immunsejtek fejlődésének és működésének szabályozásában ismertek. A lymphoid sejtek differenciációja során a progenitor sejtek fejlődésének irányát számos döntési pont esetében a Notch szignál aktivitása határozza meg. Aktív Notch1 szignál esetében T-sejt differenciációs program valósul meg, amelyben számos ponton a különböző T-sejt populációk érése és funkciói során a Notch repetitoroknak és ligandjaiknak fontos differenciációs és a sejtek túlélési folyamatait támogató hatásait ismerjük. A T-sejtek fejlődéséhez szükséges a NOTCH1 expressziója, hiányában a thymusban is B-sejtek jelennek meg, fokozott vagy konstitutív expresszió következményeként a B-sejtek fejlődése gátolt lehet. A pre-B-sejtek érésekor nem szükséges a NOTCH1 szignál aktivitása, ugyanakkor a NOTCH2 receptor aktiválás a marginális zóna B-sejtté vagy folliculáris B-sejtté való differenciálódást szabályozza. A marginális zóna B-sejtek kifejlődéséhez elengedhetetlen a receptor ligand aktiválása (DLL1- delta like 1 receptor) és az CSL (CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1) transzkripciós faktor megjelenése (6. ábra) [93].

Azt, hogy a Notch útvonalnak a lymphoid sejtek differenciálódásának és funkcióinak szabályozásán túl fontos, az egész szervezet fejlődését érintő szerepe van, melyet a különböző KO egér modellekben kapott eredmények (embrionális vagy perinatális letalitást mutatnak a NOTCH1, NOTCH2 és a legkülönbözőbb ligandok kiütése esetében), és a NOTCH3 és Jagged1 mutációkkal kapcsolatosan ismert öröklött szindrómákban megfigyelhető szervfejlődési rendellenességek is mutatnak (CADASIL és Alagille szindróma) [94, 95].



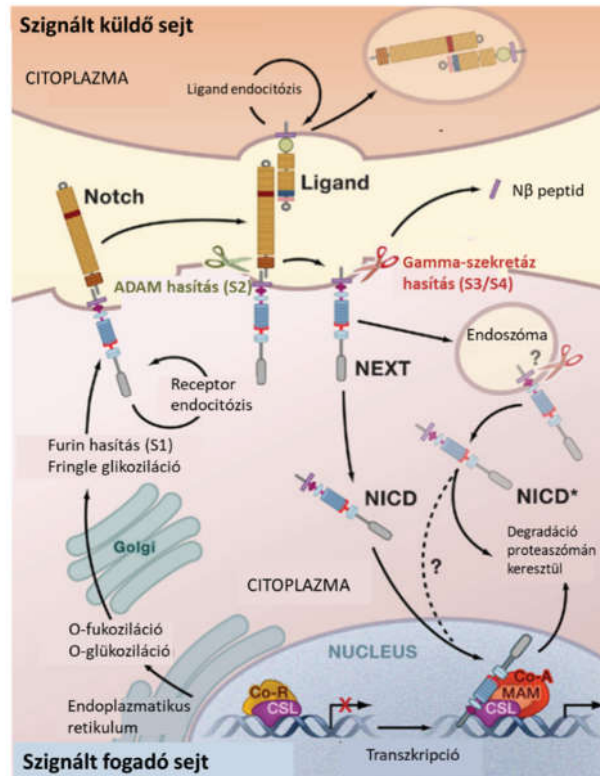
6. ábra A Notch szignál immunsejtek fejlődésében betöltött szerepe [93]

A lymphoid progenitorsejtek a csontvelőből a thymusba vándorolnak, ahol az epithel sejtek által termelt DLL4 ligandok a kanonikus Notch1 szignált aktiválják a korai thymikus progenitor sejtekben és a T-sejtek érési folyamata aktiválódik, mely megakadályozza az egyéb immunsejt formák kialakulását, úgymint a B-sejteket vagy a dendritikus sejteket. A Notch szignál aktivitása a T-sejt szelekció során egyre jobban csökken, az érett formák kialakulásakor már gyenge Notch aktivitás jellemző. B-sejt kialakulás kezdeti fázisaiban, mikor a lymphoid progenitor sejtek a lépbe vándorolnak a Notch szignál inaktivitása szükséges. A lépben viszont ha a környező sejtek által termelt DLL1 ligand hatására a NOTCH2 szignál aktiválódik, az éretlen B-sejtek marginális zóna B-sejté fejlődnek.

Rövidítések: Csontvelői haematopoetikus őssejt (HSC), multipotens progenitorsejt (MPP), myeloid progenitorsejtek (CMPs), lymphoid progenitorsejtek (CLPs), korai thymikus progenitor sejt (ETP), thymus epithel sejtek (TEC), dupla negatív (DN) T1,2 B-sejtek (tranzicionális 1 2 B-sejtek), dendritikus sejtek (DC), regulátor T-sejtek (T_{reg}), Delta-like ligand (DLL)

A Notch receptor aktiválódását kaszkádszerű aktivációs folyamat jellemzi. Az első hasítást a Notch receptorok (NOTCH1-4) és a ligandjaik (Jagged1,2 vagy Delta-like 1, 3 és 4) kapcsolódása indukálja, előbb az ADAM metalloproteáz, majd a gamma-

szekretáz hasítja a receptort. A receptor intracelluláris doménje (NICD) a magba kerül, ahol CSL transzkripciós faktorról és más kofaktorokkal (pl: MAML1 – mastermind-like transzkripciós koaktivátor) együtt különböző gének expresszióját fokozza, pl. a c-MYC és HES1 transzkripciós faktorokét, amik aztán a sejt növekedésének, túlélésének és differenciálódási folyamatainak szabályozásában vesznek részt (7. ábra).



7. ábra Kanonikus Notch szignál útvonal [96]

A transzlálódott Notch receptort, glikozilációját követően a furin fehérje proteolitikusan hasítja (S1) még a membránba helyeződése előtt. A környező szomszédos sejtek felszínén található ligandokkal kapcsolatba lépve aktiválódik a hasítási (proteolitikus) kaszkád, mely membránon kívüli extracelluláris hasítással kezdődik (S2) az ADAM metalloproteáz segítségével, létrehozva a Notch extracellulárisan trunkált (NEXT) formát. További hasítási folyamatokat a gamma-szekretáz végzi (S3/S4), mely során a membrán felszínén vagy endoszóma membránjához kötött trunkált receptor intracelluláris része lehasítódik (NICD). A citoplazmába bekerülve transzkripciós faktorokkal (CSL) és kofaktorokkal (MAM, Co-A) együtt megszünteti az expresszióátlást (Co-R) és a célgének átíródását indukálja.

A Notch receptorok membránba kihelyezését poszttranszlációs módosulások előzik meg, ezek befolyásolják a receptor-ligand kölcsönhatásokat és az útvonal aktivitását is. A receptor EGF-szerű-ismétlődéseit a Fringe glikozil-transzferáz glikozilálhatja, eredményeként a Notch-Jagged kapcsolat gyengül, míg a Notch-Delta receptor kötődés erősödik. Előbbiek is mutatják, hogy a Notch receptor ligand kapcsolatok erőssége, a szignál aktivitása, és a körülmények/mikrokörnyezet jellegzetességei jelentősen befolyásolják az adott útvonal hatásait a legkülönbözőbb celluláris folyamatokban [97]. Nem véletlen, hogy a Notch szignál hibás, nem megfelelően szabályozott működésének következtében nemcsak szerv-, szövetfejlődési, hematopoetikus fejlődési zavarok jelentkezhetnek, hanem daganatok kialakulásával kapcsolatosan is leírták már a Notch szignál elemeinek mutációját, emelkedett expresszióját vagy akár funkcióváltozását, mint a tumornövekedését elősegítő hatásokat [98].

Az előbbi tumorbiológiai hatások, a Notch szignálok aktivitás változásai a legújabb vizsgálatok szerint a leírt kanonikus útvonalon túl más alternatív (nem kanonikus) útvonalakon keresztül is megvalósulhatnak, bizonyos szolid daganatokban CSL transzkripció faktorától függetlenül (pl: emlő daganatokban) vagy más jelátviteli útvonalakkal összekapcsolódva, az NF- κ B jelúton keresztül (pl. leukémiák esetében) [99].

1.5.2.2 Notch szignál aktivitása tumorokban

A Notch szignál útvonal nem megfelelően szabályozott aktivitása, hiperaktivációja befolyásolhatja a haematológiai daganatok kialakulását. Elsőként a NOTCH1 receptort, mint onkogént, T-ALL sejtekben azonosították; leírták a gén C-terminális részének transzlokációját a T-sejt-receptor-béta (TCRB) lókuszához [t (7;9), ALL-es betegek kis százalékában jellemző ez a transzlokáció], majd később kimutatták, hogy a T-ALL-es betegek több mint 50%-át érinti valamilyen jellegű NOTCH1 receptor mutáció [98, 100]. Leggyakrabban a fehérje heterodimerizációs doménjét (HD) és a prolin/glutamin/szerin/treonin-gazdag (PEST) doménjét érintik a mutációk és több B-sejtes lymphoma típusban is kimutatták a Notch1 útvonal fokozott aktivitását (anaplasiás nagy sejtes lymphomákban, diffúz nagy B-sejtes lymphomákban, Hodgkin lymphomákban) is [100].

Hodgkin lymphomák esetében a NOTCH1 fokozott aktivitását detektálták primer Sternberg-Reed sejtekben és HL sejtvonalakban, ezt összefüggésbe hozták a sejtek proliferációjával és túlélésével (anti-apoptotikus hatás). Elképzelhető, hogy az intenzív Notch szignál aktivitásnak - amelyről ismert, hogy a B-sejt érési folyamatokat gátolja - a Hodgkin lymphomák B-sejt specifikus jellegének elvesztésében is szerepe lehet [101].

A Notch szignállal kapcsolatos eddigi eredmények alapján a receptor hasítási kaszkádjában résztvevő fehérjéknek vagy az aktivált receptor működésének gátlása potenciális terápiás célpont. A fejlesztéseknek köszönhetően számos lehetőség van az útvonal gátlására. A kis molekulású inhibitorok közé tartoznak a Notch szignál aktiváló hasításában résztvevő fehérjét a gamma-szekretázt gátló (GSI) szerek. Klinikailag legelterjedtebb GSI a DAPT (N-[N-(3,5-difluorofenilacetil-L-alanil)]-S-fenilglicin t-butilészter), de számos származéka is elérhető, illetve az újabb hatóanyagok fejlesztése folyamatos. Hatékonyabb eredményekről számolnak be azok a preklinikai vizsgálatok, melyekben a NOTCH1 receptor már aktivált, intracelluáris doménjéhez kapcsolódó inhibitorot használtak - SAHM1 (MAML1-ből származtatott, alfa-hélixel kapcsolt molekula). Mivel ez specifikusan csak az aktivált NOTCH1-hez kötődik és annak proteaszómális lebontását indukálja, így hatékonyabb terápiás készítmény lehet és kevesebb káros mellékhatás megjelenését okozhatja [102].

1.5.2.3 Notch és mTOR útvonalak a jelátviteli hálózatban

A Notch és az mTOR jelátviteli útvonalak kapcsolódása és aktivitásuk kölcsönös befolyásolása több ponton és számos funkcióval kapcsolatban megvalósulhat. Kapcsolódási pont lehet az AKT, a PTEN, az FBXW7 vagy a c-MYC fehérjék aktivitásának és mennyiségének változása [103, 104]. T-ALL sejtekben Notch gátlószer kezelésekre hatására a foszforilált S6 fehérje (mTORC1 target) és a foszforilált AKT fehérje (Ser473 és Thr308) mennyiségének csökkenését mutatták ki [105]. Ugyanakkor más adatok szerint bizonyos sejtvonalakban (pl: Jurkat – T-ALL sejtvonal) az előbbi AKT aktivitás gátlás elmaradhat [106]. A Notch szignál target fehérjék – HES1 és c-MYC – expresszió változásai szintén hatással lehetnek az mTOR aktivitásra, befolyásolják a PTEN (mTOR szignál negatív regulátora) fehérje expresszióját. A HES1 expresszió fokozódásának következménye a PTEN expresszió gátlása, ami az mTOR aktivitásának fokozódását okozhatja. Míg a Notch aktivitás függő c-MYC expresszió a PTEN működését segíti, így az mTOR kináz expresszió gátlását okozhatja. T-ALL sejtekben azt is kimutatták, hogy az mTOR aktivitás szabályozásában a HES1 szabályozó szerepe mindig dominánsabb, mint a c-MYC-é, tehát alapvetően a Notch szignál aktivitás fokozódás az mTOR aktivitás fokozódását eredményezi [107].

Mindkét útvonal szabályozásában részt vesz az FBXW7 ubiquitin ligáz. Hibás működése (mutációja) GSI terápiarezisztenciát idézhet elő T-ALL-es betegeknél. Ismert, hogy az FBXW7 számos más fehérje mennyiségének („turnover”-ének) szabályozása mellett mind az mTOR mind a NOTCH1 fehérjék, illetve célfehérjék (c-MYC) lebontásának szabályozásában is részt vesz, melyek nem megfelelő lebontása, mind a Notch, mind az mTOR szignál hiperaktivitásához vezethet.

1.6 mTOR aktivitás anyagcserét szabályozó hatása

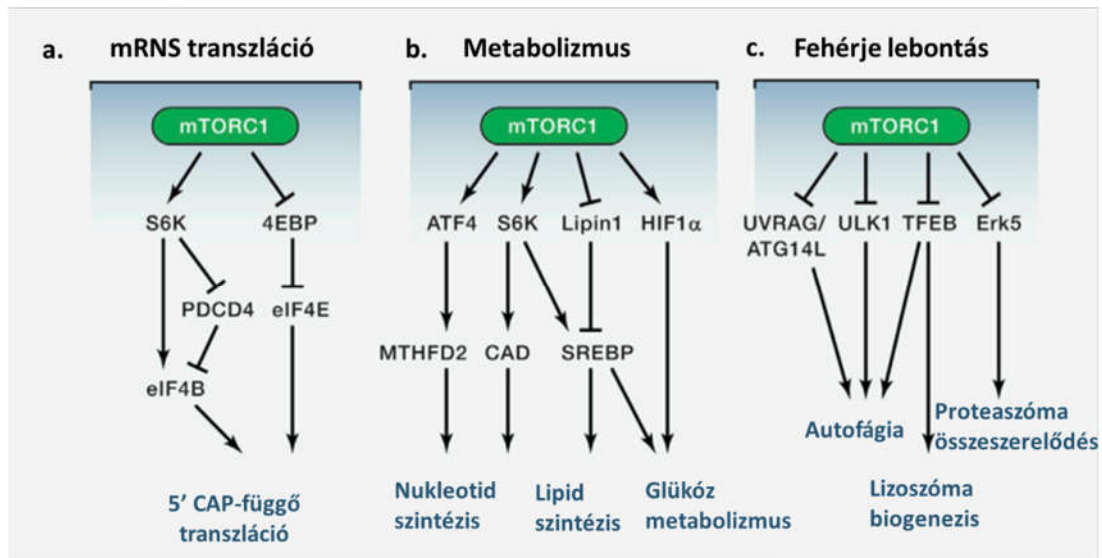
A növekedéshez és a sejt osztódáshoz a sejteknek sok energiára, képződő új fehérjére, lipidre és nukleotidra van szükségük, párhuzamosan pedig a katabolikus folyamatokat (pl: autofágiát) gátolni kell. Az mTORC1, de az elmúlt pár év adatai alapján az mTORC2 komplex is kitüntetett szerepet tölt be az anabolikus és katabolikus folyamatok egyensúlyának szabályozásában.

Anabolikus folyamatok közé tartozik az mTORC1 komplex egyik legjobban ismert funkciója, a fehérje szintézis elősegítése (8. ábra a.) [108]. Az osztódó és növekvő sejteknek megfelelő mennyiségű lipidre is szükségük van membránfelületek kialakításához. Az mTORC1 a SREBP transzkripciós faktor közvetett aktiválásán keresztül (S6K foszforilálása és az SREBP fehérjét gátló Lipin1 gátlása), az alacsony szterol szint esetében olyan gének átírását aktiválja, amelyek a zsírsav és a koleszterol bioszintéziséért felelősek [109, 110]. A DNS replikáció és a riboszóma biogeneziséhez szükséges nukleotid termelés szabályozásában szintén részt vesz az mTORC1. Indukálja a purin szintézisben kulcsszerepet betöltő fehérjék expresszióját (pl.: MTHFD2), valamint az S6K segítségével a *de novo* pirimidin szintézist is. Az mTORC1-nek előbbieken túl a glükóz anyagcsere szabályozásában is jelentős szerepe van. A glikolízis után a piruvátból a mitokondriumban acetyl-coenzim A (acetyl-CoA) képződik, mely a citrát körben redukáló molekulákat generál (NADH, FADH₂). Ezekből az elektrontranszport-láncban résztvevő fehérjék a létrejövő energiakülönbséget felhasználva ATP-t termelnek (oxidatív foszforiláció). Ismert, hogy hipoxiás körülmények között a glükóz lebontás folyamata a fent leírtaktól különbözik, glikolízis során piruvátból laktát keletkezik. Az mTORC1 akár pszeudohipoxiás körülmények között is képes a laktát termelő glikolízis irányába tolni a sejtek anyagcseréjét akár a hipoxia indukálta faktor 1 α transzkripciós faktor (HIF1 α) vagy c-MYC transzlációjának fokozásán keresztül. Mind a fokozott mTORC1 aktivitás, mind a fokozott HIF1 α expresszió számos glikolitikus enzim expresszióját indukálhatja (pl. foszfofruktokináz (PFK)); míg párhuzamosan a piruvát dehidrogenáz kináz (PDK) expresszió fokozásával gátolja a piruvát-dehidrogenáz piruvát oxidációját és ezekkel összefüggésben az oxidatív foszforiláció további folyamatait (8. ábra b.) [109].

A sejtek a glükóz mellett más szubsztrátokat is hasznosíthatnak az előbbi folyamatokban. Ilyen energia szubsztrát lehet a glutamin, melyet glutaminolízis

segítségével képes a sejt nitrogén és energia forrásként felhasználni; a zsírsavak, amikhez béta-oxidáció révén jut hozzá; vagy bizonyos aminosavak, amelyek a különböző fehérjék lebontásából származhatnak [111].

Amíg megfelelő tápanyagellátottság és a növekedési faktor útvonalak aktivitása mellett az mTOR aktivitás fontos funkciója a proliferáció és a glikozis támogatása, addig tápanyaghiányos környezetben az mTOR aktivitása csökken. Utóbbi esetben az mTOR útvonal autofágiát gátló hatásának megszűnése a sejtek lebontó folyamataiban, az autofágián keresztül támogatják a sejtek túlélését. Ebből adódóan az mTOR gátlása szöveti szinten akár kétélű fegyver is lehet. Az autofágia folyamata több lépcsős mechanizmus, melyet az mTORC1 több ponton is képes gátolni (pl.: autofagoszóma kialakulási lépését az ULK1 fehérje gátlásán keresztül) (8. ábra c.). Ugyanakkor éhezés és energia hiányos állapotban, az alacsony ATP és magas AMP mennyiség miatt, ez a gátló mechanizmus megszűnik. Ekkor az AMP aktiválta protein kináz (AMPK) az mTORC1 aktivitását gátolja és képes az autofágiát indukálni a sejtekben [11].



8. ábra: Sejtes folyamatok, melyet az mTORC1 aktivitás befolyásol [1]

Az mRNS-ek translációját az S6K-on és a 4EBP fehérjén keresztül regulálja az mTORC1 (a.) továbbá a legfontosabb anyagcsere útvonalakat (b.) és a fehérje újrahasonítási folyamatokat (c.) is képes befolyásolni.

1.6.1 Lymphoid sejtek anyagcseréje

Az immunrendszerünket számos szerv és ezekhez kapcsolódva heterogén sejtpopulációk együttes működése alkotja. Az immunsejtek közös jellemzője, hogy jelentős részük ugyan nyugvó állapotban van, azonban fertőzések vagy külső stressz hatására gyors válaszreakciókra, aktiválódásra képesek. Az ehhez szükséges energiához és építőmolekulákhoz, a nyugvó-aktivált állapot átmenethez anyagcsere folyamataik átprogramozására is szüksége van a sejteknek [112].

A nyugvó immunsejtek (pl.: T-sejtek, B-sejtek) alacsony alapanyagcseréje – jellemzően általában autofágiás mechanizmusok – aktiválódásukat követően intenzív glükóz felvétel és a fokozódó aerob glikolízis, az oxidatív foszforiláció visszaszorulása váltja fel. A glikolízis irányába az eltolódást a hipoxia indukálta faktor 1 (HIF1) transzkripciós faktor segíti, más transzkripciós faktorokkal és onkogénnel együttműködve (pl: c-Myc, p53 vagy Oct1) a glikolitikus gének (GLUT1, HK2, LDHA) és a citrát kört gátló PDK expresszióját fokozza. Jól ismert, hogy előbbi változások az mTOR kináz aktivitással összefüggésben jelennek meg [113, 114].

Az elmúlt években egyre nyilvánvalóbbá vált, hogy a megváltozott anyagcsere nem a sejtaktiválódás „mellékterméke”, hanem szigorúan szabályozott folyamatok összessége, amelyek a sejt fejlődésének egyes állapotaitól, sejt funkcióitól és még sok más folyamattól, úgymint metabolikus stressz, autofágia vagy reaktív oxigén termeléstől is függhetnek. A különböző T-sejt populációk anyagcseréjéről számos irodalmi adat áll rendelkezésünkre. A CD4⁺ effektor T-sejtek és a regulátor T-sejtek például intenzívebben glikolizálnak a naív T-sejtekénél, de anyagcsere útvonalak arányát és más folyamatokat is figyelembe véve már különbségeket tapasztalhatunk. A T-reg sejtek nem csak glikolizálnak, hanem jellemzőjük az intenzív zsírsav lebontás és oxidatív foszforiláció is. Metabolikus átrendeződésen mennek keresztül a helper T-sejtek is memória sejté alakulás közben, ilyenkor katabolikus folyamatok aktiválódnak, ezzel is felkészítve a sejtet a hosszan tartó nyugvó állapotra [115].

A B-sejtek fejlődése közben a populációkat jellemző metabolikus folyamatokról az előbbieknél lényegesen kevesebbet tudunk. Az mTOR aktivitás változásokról és azok a B-sejt fejlődésben, valamint leukémia és lymphoma sejtekben megfigyelhető aktivitás változásairól viszont már számos adat elérhető. *In vitro* vizsgálatokból ismerjük azonban, hogy a naív B-sejtekben IL-4 (interleukin 4), BAFF (B-sejt aktiváló faktor), anti-CD40,

lipopoliszacharid vagy anti-BCR (B-sejt receptor) aktiváló kezelés fokozza a glükóz felvételt, a glükóz metabolizmus tehát eltérő stimulusok hatására hasonlóan aktiválódik a B-sejtekben [116]. Nem ismert azonban, hogy a glükóz nélkülözhetetlen-e a sejtek túléléséhez és proliferációjához, vagy szükség esetén képesek-e átváltani az aktivált B-sejtek más tápanyag szubsztrátokra, más metabolikus útvonalakra. Az aktivált B-sejtek *in vivo* energiaigényeiről, valamint magáról a differenciálódást szabályzó metabolikus folyamatokról még kevés adat áll rendelkezésünkre [117]. A B-sejt receptor útvonal glükóz anyagcserét befolyásoló hatásairól is csak kevés adat ismert, leírták azonban, hogy a glükóz transzporter 1 fehérje (Glut1) expresszió, bizonyos glikolitikus enzim funkciók szabályozása vagy a pentóz-foszfát út aktivitásának szabályozása BAFF indukált B-sejtek túlélésében PI3K/Akt/mTOR aktivitás függően szabályozott [118].

Az mTOR komplexek a jelátviteli hálózat részeként a legkülönbözőbb receptorok felől érkező szignálok és a sejt aktuális állapotát monitorozó útvonalak alapján befolyásolják, kapcsolják össze az anyagcsere folyamatok aktivitását a B-sejt fejlődési és differenciálódási folyamatok metabolikus igényeivel [70]. A különböző B-sejt szubpopulációk metabolikus profilját még kevésbé ismerjük, ezért számos kérdés az mTOR kináz szabályozó mechanizmusaival kapcsolatban még megválaszolatlan.

1.6.2 Lymphoid tumorok anyagcsere változásai

A normál lymphoid sejtek anyagcséréje aktivitástól függően elsősorban a glikolízis és az autofágia változásaihoz köthető, hasonló ehhez a lymphoid daganatsejtek egyik fő jellemzője, az aktivált normál B-sejtekhez hasonlóan az aerob glikolízis (Warburg-effektus) fokozódása, mely intenzív glükóz felvétellel társul. Agresszív lymphomák esetében, hasonlóan más daganatokhoz, a tumorsejtek ezen tulajdonságát használják fel fluoro-deoxiglükóz pozitron emissziós tomográfia (FDG-PET) diagnosztika során, de jól ismert a PET CT diagnosztikában, az értékelésben a gyulladásszerű sejtek glükóz halmozása miatti nehézség is. A Burkitt, folliculáris és diffúz nagy B-sejtes lymphoma sejteket fokozott glikolitikus aktivitás jellemzi, ezt *in vitro* vizsgálatokkal is igazolták [119].

Hartmann és munkatársai vizsgálták a HL-ák metabolikus aktivitását, a betegek közel felében fokozott Glut1 aktivitást figyeltek meg, mely leginkább a nodulár szklerozis szubtypusú betegeket érintette, továbbá a Hodgkin- és a Sternberg Reed sejtekben intenzív

laktát dehidrogenáz (LDHA) enzim expresszióját detektálták, mely eredmények a glikolízis intenzív jelenlétére utalnak [120]. Ugyanakkor Birkenmeier és munkatársai HL sejtvonalakon végzett kísérleteik alapján azt írták, hogy a vizsgált sejtvonalakban, más NHL-ákkal ellentétben, nem a Warburg effektus dominál *in vitro*, hanem a sejtek ATP szükségletük nagy részét az oxidatív foszforilációból fedezik. Az ebben a vizsgálatban tanulmányozott lymphoma sejteket, tehát ugyan intenzív glikolízis jellemzi, de ez nem szükségszerűen jelenti mitokondriumok funkcionális károsodását, ami adott esetben az oxidatív foszforiláció irányú eltolódásokat tesz lehetővé a sejtek anyagcseréjében [121]. Hasonló eredményekről számoltak be AML sejtekben is, amely szerint fő energiaforrásuk nem glükóz eredetű, hanem zsírsav is lehet [122, 123].

A tumorsejtek anyagcsere folyamatainak változékonysága, a sejtek metabolikus plaszticitása egyben a környezethez való gyorsabb, könnyebb alkalmazkodást is jelentheti. A daganatsejtek proliferációs aktivitását, túlélési kapacitását jelentősen befolyásolhatják a glikolízis vagy más metabolikus folyamatok egyensúlyi viszonyai [70]. A metabolikus útvonalak szabályozási zavarainak megismerése, ebben a különböző jelátviteli folyamatoknak a hatásai, mint pl. az mTOR komplex aktivitás változások szerepe, még kevésbé tanulmányozott, pedig segítségükkel újabb terápiás célpontok azonosítása és a terápia rezisztencia okainak megértése is lehetővé válhat.

2 Célkitűzések

1. A korábbi eredményeink és irodalmi adatok alapján, a Hodgkin lymphoma sejteket szöveti környezetben fokozott mTOR aktivitás jellemzi, ennek molekuláris háttere azonban nem tisztázott. A lymphoid sejtek differenciálódásában szabályozó szerepet betöltő Notch jelátviteli út vonal működés zavarára számos haematológiai malignitás és daganat esetében ismert. Munkánk során célunk az emelkedett mTOR aktivitás és a Notch szignálaktivitás összefüggésének vizsgálata Hodgkin lymphoma sejtekben.
 - a. A Notch jelút elemek jelenlétének és a szignál aktivitásának vizsgálata Hodgkin lymphoma sejtekben és humán szövetekben.
 - b. mTOR komplexek aktivitásának (két komplex jelenlétének, arányának) jellemzése HL sejt vonalakban *in vitro*.
 - c. A HL sejtek mTOR inhibitor érzékenységének, a különböző inhibitorok hatásainak (tumornövekedés és fehérje expresszió) tanulmányozása *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokban.
2. A lymphoid sejtek érését és aktivitás változásait funkcionális, genetikai és fehérje expressziós változások mellett metabolikus változások is jellemzik. Az mTOR aktivitás metabolikus szabályozó szerepe egyre nagyobb érdeklődésre tart számot. A lymphoma, így a Hodgkin lymphoma sejteket jellemző anyagcsere változásokról azonban még kevés adat áll rendelkezésre. Vizsgálatainkban HL sejt vonalak *in vitro* és *in vivo* modelljeinek segítségével az mTOR komplex aktivitással és az mTOR gátló kezelések hatásaival összefüggő bioenergetikai változások jellemzését (metabolikus karakterizálását) tűztük ki célul.

3 Módszerek

3.1 *In vitro* vizsgálatok

In vitro vizsgálatainkban három klasszikus Hodgkin lymphoma (HL) sejtvonallal dolgoztunk (DEV – noduláris sclerosis, KMH2 és L1236 – kevertsejtes altípus; forrás: Dr. Klein Éva - Karolinska Intézet). A NOTCH1 receptor expresszió és különböző *in vitro* hatás vizsgálatainkban pozitív kontrollként precursor T-sejtes lymphoblastos leukémia sejtvonalakat (MOLT4; Jurkat - American Type Tissue Culture-ATCC) használtunk.

A sejteket 37°C-on, 5%-os CO₂ koncentráció mellett 20% (DEV) vagy 10% (összes többi sejtvonal) főtális borjúsavó (Heat inactivated FBS, HyClone, Thermo) és 0,5% gentamycin (Sandoz) tartalmú RPMI 1640 médiumban (HyClone, Thermo) tenyésztettük. Az adott vizsgálatoknak és tenyésztő edénynek (25 vagy 75 mm²) vagy plate-eknek (6, 24, 48 és 96 lyukú) megfelelően (kísérlet/tenyésztés ideje, azt követő feldolgozási technika sejtszám igénye és a sejtkultúra növekedési tulajdonságai alapján meghatározott) 5-300 ezer/ml sejtszámmal indítottuk a kísérleteket.

3.1.1 Kezelések, biológiai hatások vizsgálata

Kezelések előtt a sejtek médiumát frissítettük, ügyelve arra, hogy a további vizsgálatoknak megfelelő sejtszám legyen (a kezelési időnek megfelelően 5×10^4 - 3×10^5 db sejt/ml). Különböző mTORI-okat használtunk: rapamycin (50 ng/ml, Sigma); PP242 C1/C2 inhibitor (1 µM, Tocris, R&D Systems); NVP-BEZ 235 - kettős PI3K és mTOR inhibitor (1 µM, Cayman Chemical Co.). A Notch útvonal aktivitását gamma-szekretáz inhibitorokkal GSI-IX-cel (1 µM, Cayman Chemical Co.) és GSI-XII-vel (4 µM, Calbiochem), valamint SAHM1 aktivált NOTCH1 inhibitorral (5 µM, Calbiochem) gátoltuk *in vitro*. A kezeléshez alkalmazott koncentrációkat az irodalmi adatok és korábbiakban végzett vizsgálataink alapján határoztuk meg [124, 125]. A NOTCH1 receptor aktiválása korábbi kísérletek alapján Jagged1 liganddal (1 µg/ml, R&D Systems) beborított felületű (37°C-on 2,5 órás inkubációval) plateken történt [126]. A kontroll kezelésekhez, szükség szerint az adott kezelések során a tenyészetekbe kerülő maximális oldószer (pl. DMSO 5%) koncentrációkat alkalmaztuk. A rapamycint gyors bomlása miatt naponta pótoltuk. A kezelések 0-96 órák, illetve rapamycinnel 144 órás hosszabbtávú

in vitro kezelést is végeztünk (médiumot a kezelés 72. órájában frissítettük ezekben a vizsgálatokban). A morfológiai változásokat citospin-preparátumokon (5 perc, 500 rpm) végzett hematoxilin-eozin festéssel követtük nyomon.

3.1.1.1 Apoptózis mérés

Az apoptotikus sejtek százalékos arányát áramlási citometriával (FACS) határoztuk meg [127]. A méréshez a sejteket -20°C -os 70% etanolban fixáltuk, majd alkalikus extrakció (500 μl , 200 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4) után RNáz A (1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$; Sigma) emésztést és propidium-jodid festést (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sigma) végeztünk. A módszerrel a csökkent DNS tartamú, subG1-apoptotikus sejtpopuláció százalékos aránya jól meghatározható és sejtciklus analízis is végezhető. Mintánként 10-20000 eseményt mértünk FL2, FSC tartományban áramlási citométerrel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Az eredményeket Winlist (Verity Software House) programmal értékeltük ki, melynek során az apoptotikus sejtek százalékos arányát határoztuk meg.

3.1.1.2 Proliferáció vizsgálat

15000 db sejt/100 μl kezdeti sejtszámmal rendelkező lymphoma sejt kultúrák esetében 96 lyukú plate-n 24-144 órás tenyésztést/kezelést követően 10 μl (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ végkoncentrációjú) AlamarBlue® (resazurin, ThermoFisher) oldatot adtunk és 37°C -os, 5%-os CO_2 tartalmú termosztátban 4 órán keresztül inkubáltuk a sejteket. A proliferáló, metabolikusan aktív sejtek a kék színű resazurint fluoreszcens rózsaszínű resorufinná redukálták, melyet spektrofotométerrel 570 és 590 nm közötti abszorbancia tartományban detektáltunk (Ascent szoftver, Fluoroskan Ascent FL, Labsystems), majd az proliferáció mértékét a kezeletlen kontrol százalékában adtuk meg.

3.2 *In vivo* kísérletek

Az általunk vizsgált HL sejtvonalakból SCID egerekben xenograftot hoztunk létre subcután oltással (3 x 10^7 db sejtet extracelluláris mátrixsal 1:1 arányban oldva (Sigma)). Az így kinőtt tumorokat feldaraboltuk és továbboltottuk, majd amint a tumorok tapinthatóvá váltak (sejtvonal függően 3 hét-2 hónap) megkezdjük az egerek heti kétszeri kezelését a következő szerekkel illetve ezek kombinációival: mTORC1 inhibitorok, Rapamune (3 mg/kg, per os.) (Wyeth Europa Ltd.); Torisel (10 mg/kg, i.p.) (Pfizer);

mTORC1/2 inhibitor, PP242 (10 mg/kg, PEG300-ban oldva per os.) (Cayman Chemical Comp.); NVP-BEZ 235 mTORC1/2 és PI3K inhibitor (30 mg/kg, 1:9 N-metil-2-pirrolidon: PEG300-ban oldva, per os.) (Tocris); gamma-szekretáz inhibitor, GSI-XII (4 mg/kg, DMSO-ban oldva, i.p.) (Calbiochem). A kontroll csoportba tartozó egereket fiziológiás só oldattal, DMSO-val (Sigma), illetve NMP és PEG300 (Sigma) 1:9 arányú elegyével kezeltük az aktuális szereknek megfelelően. Az egerek súlyát és a tumor méretét (tolómérővel) minden kezelés előtt mértük. A tumortérfogatokat $\pi/6 \cdot ((2 \cdot \text{tumor szélesség} + \text{tumor hossz})/3)^3$ képlettel számoltuk ki [128]. A terminálást követően a tumortömegét mértük majd az I vizsgálatokhoz a tumorokat formalinban fixáltuk és paraffinba ágyaztuk. A metabolit vizsgálatokhoz tumordarabokat azonnal folyékony nitrogénbe tettük és a vizsgálatig -80°C -on tároltuk. Az *in vivo* vizsgálatokhoz intézetünk állatháza a PEI/001/2457-6/2015 és PEI/001/1733-2/2015 számú állategészségügyi engedélyekkel rendelkezik.

3.3 Humán szöveti minták

A Hodgkin lymphoma beteganyagokon végzett vizsgálatokhoz az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet archivált formalinban fixált, paraffinba ágyazott biopsziás mintáit használtuk. Korábban Márk Ágnes által összegyűjtött 83 HL beteg mintáiból készült tissue micro array (TMA) blokkokat használtuk a NOTCH1 szignál aktivációs vizsgálatokhoz [72].

3.4 DNS szekvencia vizsgálatok

A mutációs analízishez 3×10^6 db sejtől DNSMini Kittel (Geneaid) izoláltunk DNS-t. Az *FBXW7* leggyakrabban mutált exonjaira (exon 5, 9, 10 és 11-re) primereket terveztünk a Primer 3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/>) ingyenes szoftver segítségével (4. táblázat a.). Az exon szekvencia amplifikálását (Ready Mix, Thermo Scientific) követően BigDye Sequencing Kit (Applied Biosystems) segítségével szekvenáltunk (95°C 30 másodperc, 51°C -on 15 másodperc, 60°C -on 4 perc 25-ös ciklusszámmal). A mintákat NucleoSEQ (Macherey-Nagel) oszloppal tisztítottuk és kapilláris gélelektroforézis Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems) segítségével analizáltuk

A *PIK3CA* gén legjellemzőbb mutációit tartalmazó 9-es exon és a 20-as exon piroszekvenálását Katsuhiko Noshó és munkatársai protokolja alapján végeztük el, melyet AmpliTaqGold360 Master Mix-szel (Applied Biosystems) történő amplifikálás előzött meg, 40 ciklusos (95°C 30 másodperc, 52°C 30 másodperc, 72°C 30 másodperc) PCR protokollal (4. táblázat b.) [129].

A HL sejtvonalakban 50 onkogén mutációs forrópontjainak vizsgálatát új generációs szekvenálással is elvégeztettük az Oncompass Medicine – Molekuláris diagnosztika segítségével. A szekvenciákat hg 19 humán referencia genomhoz illesztettük (Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2, Life Technologies).

4. táblázat: Szekvenálások során használt primerek

FBXW7 mutációs „hotspot”-jait tartalmazó exonokra tervezett primer szekvenciák (a.)
PIK3CA 9. és 20. exon mutációs vizsgálatához (piroszekvenálás) használt primer szekvenciák (b.)

a.

<i>FBXW7</i> 5.ex	sense	5'-TGTGAGTTTTTCCTTTATAAGCCTGT
	antisense	5'-CAAATAACACCCAATGAAGAATG
<i>FBXW7</i> 6 .ex	sense	5'-TCAGAGTGCAGAATTATATTTATCAAG
	antisense	5'-TTTCAGAATCACTCTGCTTTTCA
<i>FBXW7</i> 9 .ex	sense	5'-TTTAAATCACTTTTCCTTTCTACCC
	antisense	5'-AGGGCCCAAATTCACCAATA
<i>FBXW7</i> 10 .ex	sense	5'-TTGAAAATGGTTGTTGCTGTG
	antisense	5'-TGGATCAGCAATTTGACAGTG
<i>FBXW7</i> 11.ex	sense	5'-TCCTCTTCCCCCTTTCCTAC
	antisense	5'-GAGGTTGACTCTTTTTGTGATGC

b.

<i>PIK3CA</i> 9.ex	sense	5'-biotin-AACAGCTCAAAGCAATTTCTACACG
	antisense	5'-ACCTGTGACTCCATAGAAAATCTTT
	piroszekvenáláshoz	5'-GTTGTCCAGCCACCA
<i>PIK3CA</i> 20.ex	sense	5'-biotin-CAAGAGGCTTTGGAGTATTTCA
	antisense	5'-CAATCCATTTTTGTTGTCCA
	piroszekvenáláshoz	5'-TAGAAAATCTTCTCCTGCT

3.5 RNS expresszió változások vizsgálata

3.5.1 mRNS expresszió vizsgálatok

Mintánként $1,5 \times 10^6$ db lymphoma sejtet homogenizáltunk (QIAshredder, Qiagen), majd RNS-t izoláltunk a PureLink™ Micro-to-Midi kit (Invitrogene) segítségével. A megtisztított RNS koncentrációját NanoDrop (ND-1000 v.3.3) segítségével mértük le. Reverz PCR reakcióval vizsgáltuk a különböző Notch receptorok és ligandok mRNS expressziójának jelenlétét a különböző sejtekben. 1 µg RNS-ről, random hexamer nukleotidok és MMLV reverz transzkriptáz (Invitrogene) felhasználásával cDNS-t készítettünk (PCR paraméterek: 42°C 1 óra, 95°C 10 perc). Notch receptor és ligandok expresszió vizsgálatokor 25 ng cDNS-t használtunk egy-egy PCR reakcióban a 5. táblázatban felsorolt primerekkel (denaturáció: 94°C 10 perc, [94°C 1 perc, anellálási hőmérséklet (57-65°C) 30 másodperc, 72°C 45 másodperc] x 26-32 ciklus). Korábbi vizsgálatok alapján határoztuk meg adott primerekhez milyen PCR puffer, enzim és „annealing” hőmérséklet szükséges (ehhez FailiSafe™ (Epicentre) és RedTaq polimerase (Sigma) reagenseket használtunk). A keletkező PCR termékeket 2%-os, etidium bromidos agaróz (Sigma) gélben, 50 V feszültségen futtattuk és a Kodak Image Station 4000 MM (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) készüléken detektáltuk a DNS fragmenteket.

5. táblázat: PCR reakcióhoz használt primer szekvenciák, reagensek és PCR paramétereket tartalmazzák.

Vizsgált mRNS	Primer szekvencia		Reagens	PCR paraméter
<i>NOTCH1</i>	sense	5' ACT TCC ACT GCG AGT GCC	FaliSafe, K premix (Epicentre)	57°C, 28 ciklus
	antisense	5' AGG CAA CGG TAG AAG GGG		
<i>NOTCH2</i>	sense	5' CTG GAT GCA GGT GCA GAT GCC AAT GC	RedTaq (Sigma)	65°C, 30 ciklus
	antisense	5' GCA GAA GTC AAC ACG GTG CCT GGA GG		
<i>NOTCH3</i>	sense	5' TGT GGA CGA GTG CTC TAT CG	FaliSafe, D premix (Epicentre)	57°C, 32 ciklus
	antisense	5' TGA CTC GGT CCT TGC AGA C		
<i>NOTCH4</i>	sense	5' TCA GCT CCC TGC CTG AAC	RedTaq (Sigma)	57°C, 32 ciklus
	antisense	5' GTC CTT ACA TAT CTG CTT GGG		
<i>JAGGED1</i>	sense	5' TCG CTG TAT CTG TCC ACC TG	RedTaq (Sigma)	57°C, 32 ciklus
	antisense	5' AGT CAC TGG CAC GGT TGT AG		
<i>JAGGED2</i>	sense	5' GAT TGG CGG CTA TTA CTG TG	RedTaq (Sigma)	57°C, 28 ciklus
	antisense	5' AGG CAG TCG TCA ATG TTC TC		
<i>DELTA1</i>	sense	5' AGA CGG AGA CCA TGA ACA AC	RedTaq (Sigma)	57°C, 32 ciklus
	antisense	5' TCC TCG GAT ATG ACG TAC AC		
<i>AKTIN</i>	sense	5' GTG GGG CGC CCC AGG CAC CAC CA	RedTaq (Sigma)	57°C, 26 ciklus
	antisense	5' CTC CTT ATT GTC ACG CAC GAT TTC		

Valós idejű PCR-rel vizsgáltuk adott kezelések esetében bekövetkező mRNS szintű expressziós változásokat a NOTCH1 target transzkripció faktorok esetében. *HESI* (Hs00172878_m1) és *c-MYC* (Hs00153408_m1) TaqMan Assay-On-Demand Gene Expression terméket használtuk (Applied Biosystems) az Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System készüléken, 40 ciklusos: 2 perc 50 °C-on, 25 perc 95 °C-on és 1 perc 60 °C-on paraméterekkel. A kiértékelés során normál humán B-sejtek expressziójához viszonyítottuk az expressziót és a normalizálást *GAPDH* (Applied Biosystems) belső standard segítségével végeztük el

3.6 Fehérjeszintű expressziós vizsgálatok

3.6.1 Immuncito- és hisztokémiai festés

A citospin preparátumokat -20°C-os 80%-os metanolban 10 percet fixáltuk; majd hasonlóan a deparaffinált szöveti metszetekhez endogén peroxidáz blokkolást (2,3 mg/ml perjódsvavas oldat 10 perc, 0,1 mg/ml Nátrium-borohidrid-oldat 10 perc, és 30%-os hidrogén peroxid és metanol 1:9 arányú keveréke 20') végeztünk. Ezt követően a deparaffinált metszeteken 27 percig pH 6-os citrát pufferben magas nyomáson és hőmérsékleten antigén feltárást végeztünk. Az antitestek aspecifikus bekötődésének gátlásához 3%-os 30 perces lószérumos blokkolást alkalmaztunk a különböző típusú lemezekken (citospin és szöveti metszeteken is). Majd 4°C-on éjszakán át vagy szobahőmérsékleten 2-3 óráig (ellenanyagoktól függően) inkubáltuk a lemezeket különböző elsődleges ellenanyagokkal (az elsődleges ellenanyagok hígítását a 6. táblázat tartalmazza). Az elsődleges ellenanyagok specifikus kötődését a mosólépéseket követően polimer HRP konjugált másodlagos ellenanyag kittel detektáltuk (Novolink polymer-Dako és Postprimary detektáló-Leica). Az enzimreakciót DAB (3,3'-diaminobenzidin, Dako) kromogén segítségével (barna színreakció), a sejtmagokat hematoxylin festéssel tettük láthatóvá.

6. táblázat: Immunhisztó- és citokémiai festéshez használt ellenanyagok és a kísérletek során alkalmazott hígításaik.

Ellenanyag neve	Gyártó	Hígítás
anti-foszforilált-S6 (Ser235/236)	Cell Signaling	1:100
anti-Rictor	Bethyl lab.	1:1000
anti- Raptor	Abcam	1:50
anti-hasított-kaspáz3	Cell Signaling	1:500
anti-foszforilált-Hisztón H3 (Ser10)	Cell Signaling	1:200
anti-hasított-NOTCH1	Cell Signaling	1:50
anti-Glükóz transzporter 1	Abcam	1:400
anti-Glutamináz	Abcam	1:400

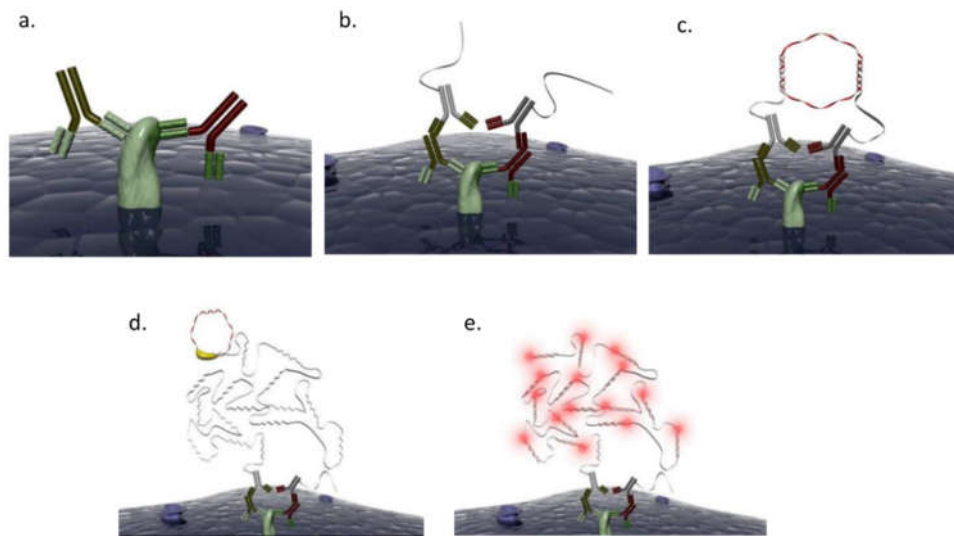
3.6.2 Western blot

A fehérjék mennyiségének összehasonlító vizsgálatához Western blot technikát alkalmaztunk, mely során a sejteket SDS mintapufferben (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 0,5 mM nátrium-vanadát, 10 mM proteináz koktél (Sigma) és 10% glicerol (Sigma)) lizáltuk, 10 percig jégen tartottuk majd centrifugálással (2000 rpm, 15 percig) a fehérje extraktumot a sejtörmeléktől mentesítettük. A kapott felülúszó fehérje tartalmát lemértük (Qubit® Protein Assay kit, ThermoFisher). Adott vizsgálatok során egyenlő mennyiségű - 15-150 µg - fehérjét 2-mercaptoethanol Laemlipuffer (BioRad) 1:20 elegyvel felforraltuk, úgy hogy mintánként 15 µl térfogatú minta kerüljön a 8-12,5%-os SDS géltre. A fehérjéket elektroforézissel 200 V feszültségen elválasztottuk, majd 0,22 µm pórusú PVDF membránra (BioRad) blottoltuk. 5%-os tejpor (BioRad) blokkolást követően a membránt 4°C-on egész éjszaka inkubáltuk az elsődleges ellenanyagokkal (anti-pS6 (1:1000, Cell Signaling), anti-Rictor (1:500, Cell Signaling), anti-Raptor (1:500, BioLegend), anti-hasított-NOTCH1 (Gly1753 és Val1754 hasítási helyet felismerő, 1:1000, Cell Signaling), anti-NOTCH1 (a receptor 2300–2556 aminosavhoz kötő, 1:1000, Novus NBP1-78292). Vectastain Elite ABC másodlagos előhívó kittet (Vector) és kemilumineszcens (ECL, Advansta) előhívó rendszert használtunk, KODAK Image Station 4000 MM (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) készülék segítségével. A minták összehasonlíthatóságának igazolásához anti-β-aktin monoklonális egér (1:5000, Sigma) és HRP konjugált anti-egér IgG (1:2000 Cell Signaling) másodlagos ellenanyaggal is előhívtuk a membránokat.

3.6.3 Duolink®

Komplexek fehérje illetve fehérje módosulások (foszforiláció, metiláció stb.) in situ kvantitatív kimutatására alkalmas módszer. A módszer kivitelezésének feltétele, hogy két különböző eredetű (faj) elsődleges ellenanyagot használjunk a két különböző, de meghatározott térbeli távolságon (<30-40 nm) belüli fehérje epitóp együttes jelenlétének kimutatására (10. ábra). A vizsgálatainkhoz készített cytospin preparátumokat 10 percig 4%-os pufferolt paraformaldehidben fixáltuk, majd 0,4%-os Triton-X-szel permeabilizáltuk. Blokkolást követően a cytospin lemezeket a megfelelő

elsődleges ellenanyag párokkal (nyúl anti-pS6, 1:100 és egér anti-S6, 1:100 – Cell Signaling; nyúl anti-mTOR, 1:500 és egér anti-Rictor, 1:500 – Bethyl Lab.) szobahőn 30 percet inkubáltuk. Az oligonukleotiddal kapcsolt másodlagos ellenanyagokkal 37°C-on 2 órát inkubáltuk a sejteket, majd a ligációs és hibridizációs lépés eredményeként a nukleotid próbák hibridizáltak a másodlagos ellenanyagpárok oligonukleotidjaihoz (37°C-on kétszer 15 perces lépés). Ha a két ellenanyag pár a megfelelő távolságon belül kötődött, akkor a ligáláskor létrejött gyűrű templátként szolgált az amplifikációs lépésben, mely során a polimeráz „rolling circle” amplifikációt tett lehetővé, megsokszorozva a templát szekvenciát (37°C-on, 90 perces lépés). Utolsó lépésként 37°C-on 60 percig fluoreszcensen jelölt próbákat hibridizáltunk az amplifikált szekvenciákhoz, mely a vizsgált fehérje komplexeket illetve foszforilált fehérjéket (Rictor-mTOR, pS6) pontszerű jelként jelenítette meg (9. ábra). A sejtmagokat DAPI tartalmú fedőfolyadékkal tettük láthatóvá, majd a fluoreszcens felvételeken a sejtenkénti reakciók számát BlobFinder program segítségével határoztuk meg.



9. ábra: Duolink módszer lépésenként

A két különböző faj eredetű elsődleges ellenanyag a fehérjén/komplexen belüli két külön epitópot felismeri (a.); oligonukleotiddal kapcsolt másodlagos ellenanyagok bekötődése (b.); ha az ellenanyagok megfelelő közelségbe kerültek a mintához adott komplementer szekvenciák hibridizálnak és gyűrűt alkotnak (c.); „rolling circle” amplifikáció (d.); fluoreszcensen jelölt próbák bekötődése - detektálás (e.) **forrás:** OLINK Bioscience [130]

3.7 Metabolit koncentráció meghatározása

A metabolit koncentráció vizsgálatokban a médium eltávolítása után a sejtekből ($2-3 \times 10^6$ sejt) 4°C -on metabolit extraktumot készítettünk több lépésben (1. folyékony nitrogénes fagyasztás, majd 2. 400-700 μl metanol-chloroform-víz (9:1:1) elegyben lizálás és 3. centrifugálás (10 perc, $15000\times g$)), az extraktumot (felülúszó) a folyadék kromatográfiás tömegspektrometriai (LC-MS) mérésig -80°C -on tároltuk. A sejtek metabolit koncentráció viszonyait 48 órás mTORI kezelések után is meghatároztuk, illetve bizonyos esetekben ^{13}C izotóp jelölt glükóz-, acetát- és glutamin hozzáadásával vizsgáltuk a sejtek szubsztrát hasznosítását. A jelölés előtt glükóz-, acetát és glutaminmentes D-030-as médiumba (Sigma) tettük a sejteket, majd a médiumhoz ^{13}C izotóppal jelölt szubsztrátokat adtunk (10 mM [$U-^{13}\text{C}$] glükóz vagy 10mM [$U-^{13}\text{C}$] glutamin) (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) és egy óráig inkubáltuk a sejteket. A szöveti minták előkészítéséhez a korábban folyékony nitrogénben lefagyasztott szövetdarabokat használtuk. A tumor darabok súlyát megmértük, majd mozsárban folyékony nitrogén mellett porlasztottuk és 1500 μl metanol-kloroform eleggyel a sejt extraktum készítési folyamatokhoz hasonlóan lizáltuk.

Az LC-MS mérést Szoboszlai Norbert és munkatársai által beállított módszer alapján vizsgáltuk [131, 132]. A származékképzés során 3-nitrobenzil alkohol (NOBA) és trimetilklórszilán (TMS) elegyet használtunk, a reakciót ammonium-hidrogénkarbonát oldattal állítottuk le. A fordított fázisú kromatográfiás elválasztáshoz acetonitril, víz elegyét használtuk eluensként majd Waters Micromass Quattro Micro triple quadrupole készülékkel (Waters Corporation, Milford MA, USA) elvégeztük a metabolitok tömegszerinti szétválasztását. A minták metabolit mennyiségét $\text{ng}/10^6$ db sejtre illetve $\text{ng}/10$ mg szövetre vonatkoztattuk ismert koncentrációjú metabolit standardokhoz (L-laktát, L-malát, szukcinát, citrát, izocitrát, fumarát) viszonyítva.

3.8 Statisztika

Az adatok átlagát, szórását és mediánját legalább három független mérés alapján számoltuk ki. Szignifikancia meghatározás Past 3.05 ingyenes statisztika programmal és IBM, SPSS v.22 (SPSS Inc., Chicago, IL, US) szoftverrel történt. A *in vitro* és *in vivo* kezelések során t^2 próbával és egyszempontos variancia-analízissel számoltuk ki a szignifikancia értékeket, melyhez Tukey-féle poszt hoc próbát használtunk. Szignifikánsnak $p < 0,05$ értéket vettük.

4 Eredmények

4.1 mTOR és Notch útvonalak aktivitásának összefüggése

A munkacsoportban korábban végzett vizsgálataiban általánosan jellemző a magas mTORC1 komplex aktivitással jellemeztük a szöveti humán Hodgkin lymphoma sejteket *in situ* [72]. A HL-ák szövettani jellegzetessége, hogy a B-sejt eredetű, klasszikus HL- és Sternberg-Reed sejtek csak kis százalékban figyelhetők meg. A HL sejtek magas mTOR aktivitásnak háttere ismeretlen. Korábbi közlemények alapján a B- és T- sejtek differenciációjának szabályozásában ismert Notch útvonal, mTOR aktivitásban illetve a HL sejtek szabályozási zavaraiiban játszott szerepe merült fel.

4.1.1 HL sejtek konstitutív Notch-1 aktivitása

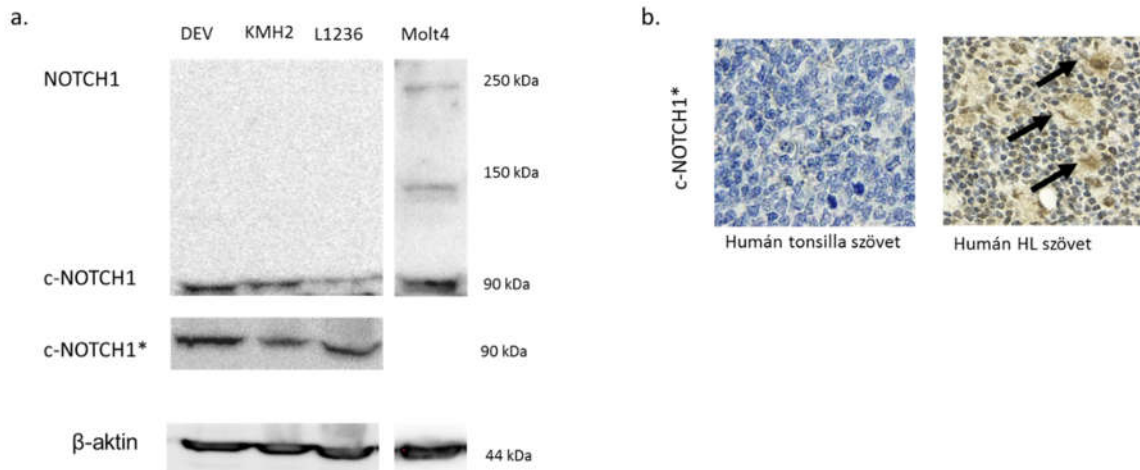
Rendelkezésünkre álló három különböző HL lymphoma sejtvonal – KMH2, DEV, L1236 esetében RT-PCR segítségével igazoltuk a *NOTCH1* és *2* receptor és *JAGGED 1,2* és *DLL1* (delta-like ligand) ligand mRNS-ek jelenlétét. *NOTCH4* receptor mRNS-t egyik sejtvonalban sem, míg a *NOTCH3* receptor expressziót a KMH2 sejtekben nem tudtuk kimutatni. (10. ábra).



10. ábra: Hodgkin lymphoma sejtek Notch receptor (*NOTCH1-NOTCH4*) és ligand (*JAG1* és *2*, *DLL1*) mRNS-ek expressziója (RT-PCR eredmények).

A három HL sejtvonalban hasonló Notch receptor és ligand expressziós mintázatot figyeltünk meg mRNS szinten (a *NOTCH1* és *2* receptorok és *JAGGED1*, *2* illetve *DELTA1* ligandok expressziója jellemzi a HL lymphoma sejteket).

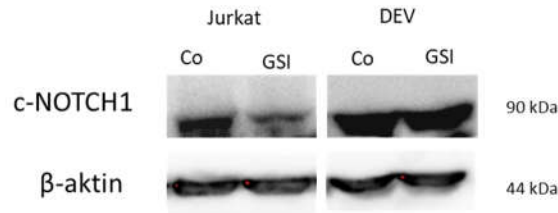
A NOTCH1 receptor expresszióját és a szignál aktivitását fehérje szinten is vizsgáltuk. Kétféle ellenanyagot használtunk Western-blot vizsgálatainkban. Az egyik antitest (Abcam) a NOTCH1 receptor intracelluláris doménjét ismeri fel, így függetlenül a szignál aktivitásától a nem hasított (inaktív) és hasított (aktív) formát is kimutatja, míg a másik ellenanyag (Cell Signaling) csak a szignál aktivitásának következtében létrejövő hasított NOTCH1 receptor fragment ellen specifikus. Western blot eredményeink alapján mindhárom sejtvonalat konstitutívan aktív Notch1 szignál jellemezte *in vitro* tenyésztési körülmények között, a hasítatlan, intakt receptor formára jellemző, nagy molekulásúlyú fehérjét nem detektáltunk a megfelelő (Abcam) ellenanyaggal (11. ábra, a.). Mindkét ellenanyag esetében a szignál aktivitását jelző hasított NOTCH1 receptor (c-NOTCH1) fragment expresszióját figyeltük meg. A legkülönbözőbb Western blot lízis pufferek és lizáló eljárások használatával sem tudtuk kimutatni a teljes, intakt receptort a HL sejtekben. Míg más pl. a MOLT-4 vagy Jurkat T-ALL sejtekben (korábbi vizsgálatok alapján NOTCH1 receptor aktivitás és fokozott Notch1 szignál aktivitás jellemzi ezeket a sejteket is) a hasított fragment mellett a teljes receptor formát is ki tudtuk mutatni párhuzamos minták esetében (pozitív kontroll). Az aktivált Notch1 szignálra jellemző hasított NOTCH1 fragmentek jelenlétét a már korábban mTOR aktivitás szempontjából jellemzett HL-ás betegek szöveti mintáiban is ki tudtuk mutatni immunhisztokémiai festéssel. A tumor sejtekben (Hodgkin és Strenberg-Reed sejteket) a hasított NOTCH1 festést perinukleárisan és nukleárisan is megfigyeltük (11. ábra, b)



11. ábra: NOTCH1 receptor és hasított NOTCH1 fragment kimutatása Hodgkin lymphoma sejtvonalakban illetve szöveti Hodgkin és Sternberg-Reed sejtekben

Az intakt (nem aktivált) NOTCH1 receptor expresszióját a vizsgált HL sejtekben nem, csak a pozitív kontrollnak használt T-ALL sejtvonalban (Molt4) tudtuk kimutatni (Mw=272 kDa, várható méretartomány ~250 kDa), míg a hasított fragmentet valamennyi sejtlizátumban detektáltuk (várható méret ~ 90-110 kDa) (a.). Humán szöveti mintákban a lymphoma sejtekben is igazoltuk a hasított NOTCH1 receptor fragmentek (c-NOTCH1*) jelenlétét, IHC festéssel. A nyilak Hodgkin és Sternberg Reed sejtek pozitív festődését mutatják; a kontrollként használt humán tonsilla szövetekben hasonló festődést nem figyeltünk meg (nagyítás 200x) (b.).

A HL sejtvonalakban kimutatott magas Notch1 szignál aktivitást és ebben a tényleges ligand függő aktiváció, receptor hasítás szerepét 72 órás *in vitro* gamma-szekretáz inhibitor kezeléssel (GSI) is vizsgáltuk. Jurkat sejtekben igazoltuk a gamma szekretáz Notch1 szignál aktivitásban játszott szerepét (GSI mellett a hasított fragment mennyisége jelentősen csökkent), míg a vizsgált HL sejtvonalak egyikében sem tudtunk kimutatni hasonló hatást, nem csökkent a Hodgkin lymphoma sejtekben a hasított NOTCH1 fragmentek mennyisége (Western blot eredmény) (12. ábra).



12. ábra: Gamma-szekretáz inhibitor (GSI) kezelés hatása Jurkat (ALL) és DEV (HL) sejtekben

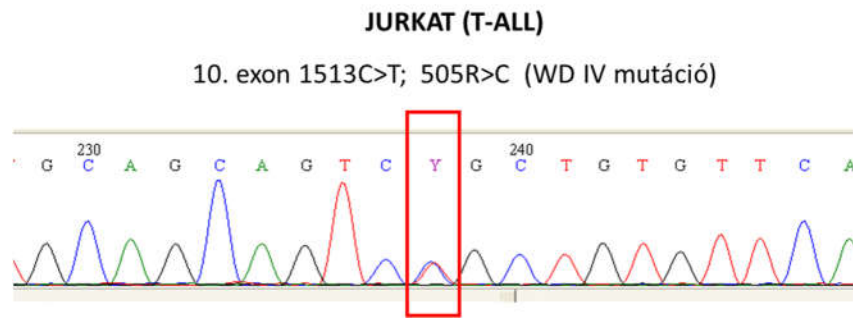
72 órás gamma-szekretáz inhibitor (GSI, 4 μ M) kezelés hatására csak T-ALL sejtvonal (Jurkat) esetében tapasztaltuk a hasított NOTCH1 (c-NOTCH1) mennyiségének csökkenését, a HL sejtvonalban (DEV) a hasított NOTCH1 mennyisége változatlanul magas maradt (Western blot vizsgálat).

4.1.2 Konstitutív NOTCH1 aktivitás hátterének vizsgálata

A konstitutív Notch útvonal aktivációjának hátterében számos jelátviteli szabályozó elem, onkogén illetve tumor szupresszor gén mutációja állhat, ezek között jól ismertek bizonyos NOTCH1 aktiváló mutációk is. A tapasztalt NOTCH1 és mTORC1 hiperaktivitás genetikai hátterének tisztázása érdekében a vizsgált HL sejtvonalak esetében NGS szekvenálással elvégeztettük (Peták István és Brauswetter Diana segítségével) számos onkogén és tumor szupresszor gén analízisét (Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2, Life Technologies), evvel a vizsgálattal nem tudtunk igazolni a vizsgált génekben mutációkat. Az alábbi vizsgált gének vad típusúnak bizonyultak (vastagon jelöltek a két útvonal működésével szorosabb összefüggésbe hozható gének):

ABL1, ***EGFR***, *GNAS*, *KRAS*, *PTPN11*, ***AKT1***, *ERBB2*, *GNAQ*, *MET*, *RB1*, *ALK*, *ERBB4*, *HNFI1A*, *MLH1*, *RET*, *APC*, *EZH2*, *HRAS*, *MPL*, *SMAD4*, *ATM*, ***FBXW7***, *IDH1*, ***NOTCH1***, *SMARCB1*, *BRAF*, *FGFR1*, *JAK2*, *NPM1*, *SMO*, *CDH1*, *FGFR2*, *JAK3*, *NRAS*, *SRC*, *CDKN2A*, *FGFR3*, *IDH2*, *PDGFRA*, *STK11*, *CSF1R*, *FLT3*, *KDR*, ***PIK3CA***, ***TP53***, *CTNNB1*, *GNA11*, *KIT*, ***PTEN***, *VHL*.

A *PIK3Ca* esetében piroszekvenálással, az *FBXW7* (ubiquitin ligáz) esetében pedig Sanger szekvenálással is ellenőriztük ezeket az eredményeket, amik vad típusú *PIK3CA* és *FBXW7* génszekvenciákat mutattak a HL sejtvonalakban. A vizsgálatban párhuzamosan használt Jurkat T-ALL sejtvonalban az *FBXW7* gén heterozigóta mutációját igazoltuk (13. ábra).

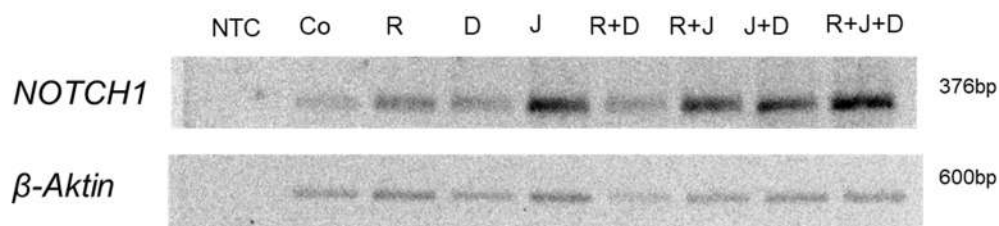


13. ábra: Detektált heterozigóta mutáció Jurkat sejtekben

Az *FBXW7* mutációs vizsgálata alapján Jurkat (T-ALL) sejtvonalba találtunk funkcióvesztéssel járó heterozigóta pontmutációt (Y), mely a fehérje WD IV. doménjét érintette. A HL sejtvonalaink mind vad típusúak voltak.

4.1.3 mTOR és Notch1 szignál aktivitást befolyásoló kezelések hatása

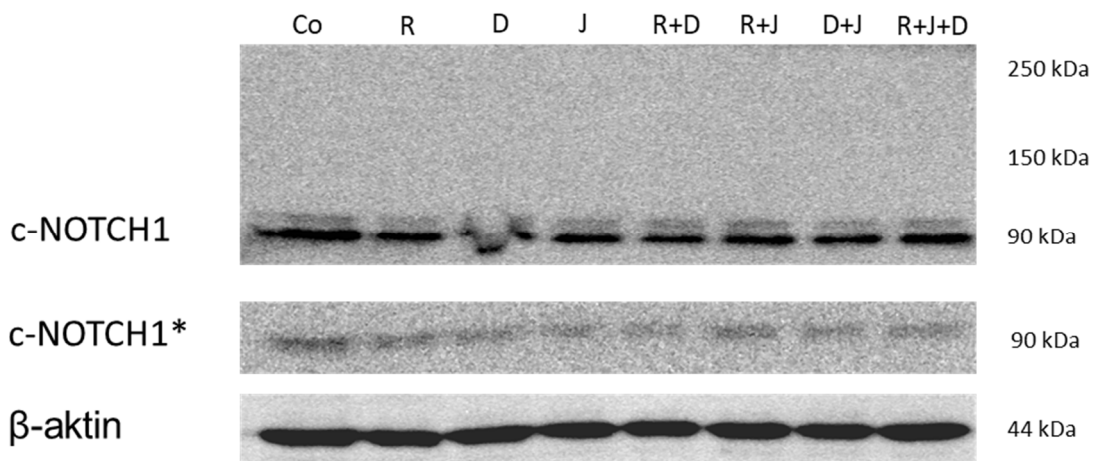
Különböző kezelések – Notch-receptor ligand (Jagged1), gamma szekretáz inhibitor (DAPT), ill. a magas mTORC1 aktivitást gátló rapamycin kezelések – után vizsgáltuk előbbieket hatásukat a *NOTCH1* mRNS expressziójában (RT-PCR segítségével). A vizsgálatainkban alapvetően az adott mRNS-ek expressziógátlására számítottunk, de mono- és kombinált kezelések jelentősen nem befolyásolták, a detektálási szint alá nem csökkentették a *NOTCH1* receptor mRNS expresszióját 72 órás kezelés után (14. ábra)



14. ábra: mTORC1 gátló rapamycin, DAPT - gamma szekretáz inhibitor és Jagged1 Notch ligand kezelések nem befolyásolták, nem csökkentették a NOTCH1 mRNS expressziót *in vitro* (RT-PCR)

L1236 sejtvonala 72 órás mTOR gátló (rapamycin – R; 50 ng/ml), gamma- szekretáz inhibitor (DAPT – D; 1 μ M) és NOTCH1 aktivátor (Jagged1 – J; 1 μ g/ml), (NTC- PCR negatív kontrol – „no template control”)

A Notch1 szignál aktivitás vizsgálatainkban (Western blot), az előbbi inhibitorokkal és azok kombinációival hasonló eredményeket kaptunk. rapamycin (mTORC1 inhibitor), DAPT (gamma-szekretáz inhibitor) és Notch ligand Jagged1 72 órás kezelések sem monoterápiában, sem kombinációban nem befolyásolták az aktív Notch1 szignál következményeként kimutatható hasított (cleaved-NOTCH1) mennyiségét (Western blot eredmények). Még gamma-szekretáz inhibitor kezelés mellett sem jelent meg az intakt receptor forma a sejtekben (15. ábra).



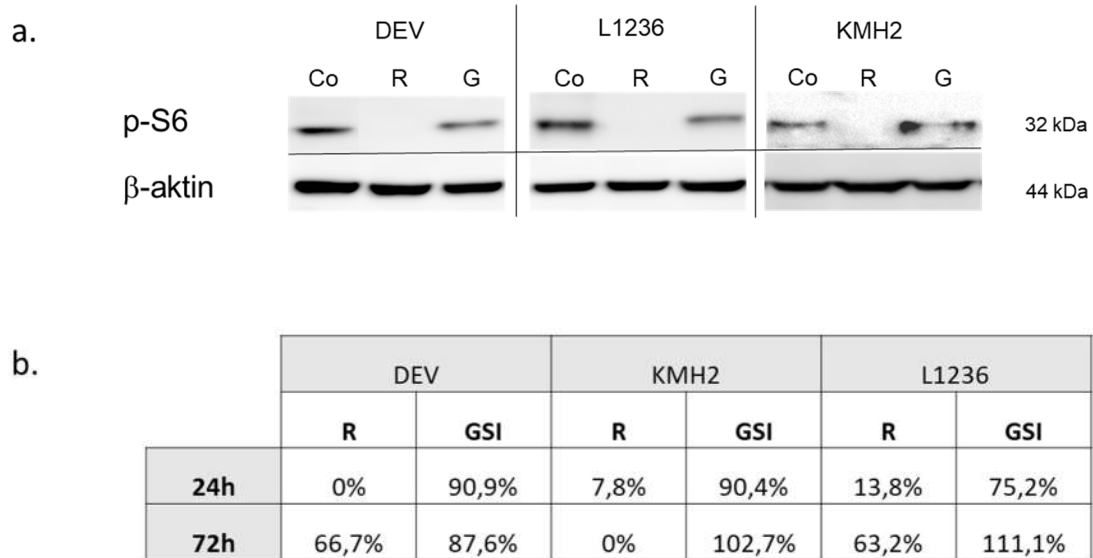
15. ábra: mTOR és Notch1 szignál aktivitást befolyásoló kezelések (rapamycin, DAPT, Jagged-1) hasított Notch1 expressziót érintő hatásának vizsgálata Western blottal L1236 sejtekben

A hasított Notch1 (c-NOTCH1) mennyisége sem a szignált fiziológias körülmények között aktiváló, sem gátló kezelések után nem változott különböző 72 órás *in vitro* kezeléseket követően. (Co-kontroll; R-rapamycin (50 ng/ml); D-DAPT (1 μ M); J-Jagged1 (1 μ g/ml)).

c-NOTCH1* = csak a hasított NOTCH1-et detektáló ellenanyaggal detektált jel; c-NOTCH1 = hasított és intakt NOTCH1 receptort felismerő ellenanyaggal detektál jel.

Az előbbi gátlószerek mTORC1 aktivitást befolyásoló időfüggő (2, 24 és 72 órás) hatásait vizsgálva igazoltuk a rapamycin kezelés mTOR aktivitás gátló hatásait. A p-S6 szintje minimálisra csökkent már a kezelést követő második órában mindhárom sejtvonal esetében és bár szignifikánsan alacsonyabb is maradt, de csak a KMH2 esetében bizonyult ez a korai hatás tartósnak. A másik két sejtvonal esetében a 72. órára a p-S6 fehérje mennyisége emelkedett a kezelés 2. órájához képest és csak ~40%-al volt alacsonyabb a

kezeletlen kontroll mintákhoz viszonyítva. A gamma-szekretáz inhibitor kezelés pedig szignifikánsan nem, csak kis mértékben csökkentette az mTOR aktivitást a HL sejtekben (16. ábra).

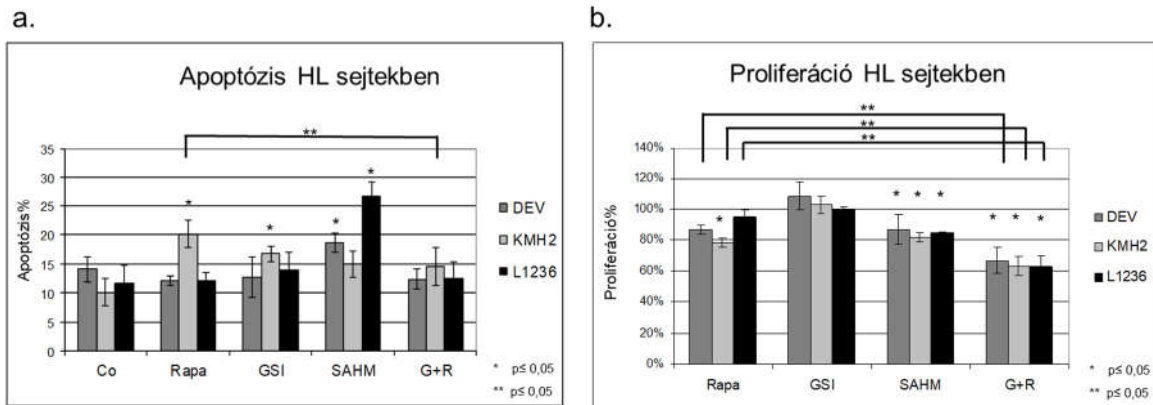


16. ábra: NOTCH1 és mTOR szignál aktivitást gátló kezelések mTOR aktivitást érintő hatásai HL sejtvonalakban (p-S6 Western blot)

2 órás rapamycin (R, 50 ng/ml) kezelés teljes mértékben gátolta, míg a gamma-szekretáz inhibitor (GSI, 4 μ M) kisebb mértékben gátolta p-S6 expressziót (mTOR aktivitás) a különböző HL sejtekben (a.) 24 és 72 óra inkubációs idő mellett a KMH2 sejteknél tapasztaltunk tartós p-S6 expresszió csökkenést. A táblázatban a p-S6 Western blotról meghatározott optikai denzitások kontrollhoz viszonyított százalékos értékét adtuk meg (b.). Normalizáláshoz egyenlő összfehérje mennyiség futtatása mellett a β -aktin fehérje mennyiségét is ellenőriztük

4.1.4 mTOR és NOTCH1 inhibitorok tumornövekedésre gyakorolt hatásai

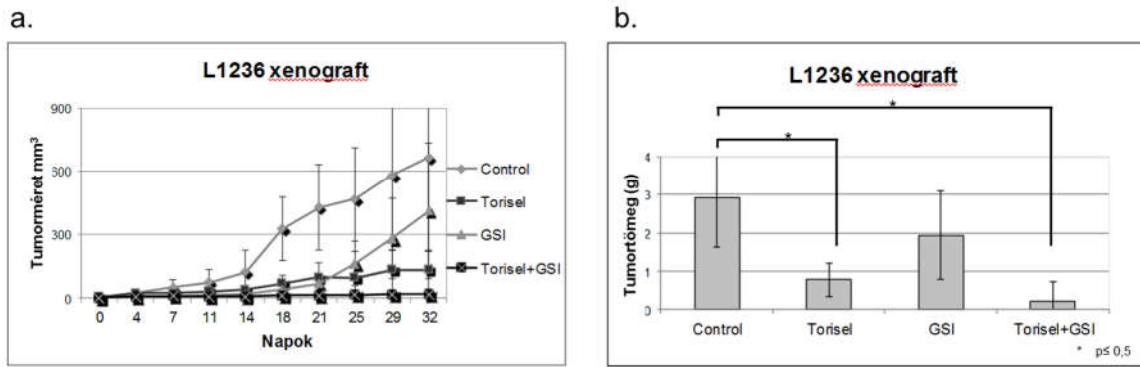
Az előbbi kísérletekkel párhuzamosan többször vizsgáltuk a 72 órás rapamycin és különböző hatás mechanizmusú Notch szignál gátló kezelések – gamma-szekretáz inhibitor (DAPT, GSIXII) és aktivált NOTCH1 gátló (SAHM1) – *in vitro* apoptózis indukáló és proliferáció gátló hatását a három vizsgált HL sejtvonalban. A monoterápiás kezeléseket követően a rapamycinnél és a SAHM1 kezelőszernél tapasztaltunk szignifikáns biológiaihatást. A rapamycin kezelés esetében a legérzékenyebb sejtvonal a KMH2 volt, melyben nem csak proliferációgátlást, hanem áramlás citometriával az apoptotikus sejtek mennyiségének szignifikáns emelkedését is ki tudtuk mutatni (17. ábra a.). A gamma-szekretáz inhibitor önmagában nem bizonyult hatékony gátlószernek, egyik sejtvonal esetében sem gátolta a proliferációt. Az aktivált NOTCH1 inhibitor, SAHM1 kezelés viszont a rapamycinhez hasonlóan mind a három sejtvonal esetében szignifikánsan gátolta a sejtek proliferációját és a DEV, illetve a L1236 sejtek esetében a spontán apoptózis mértékénél nagyobb mértékben apoptózist indukált. Érdekes eredmény, hogy jelentős proliferáció gátló hatást figyeltünk meg gamma szekretáz inhibitor + rapamycin kombinált kezelés után, ami szignifikánsan nagyobb mértékben gátolta a proliferációt a rapamycinnel szemben kevésbé érzékeny DEV és L1236 sejtvonalak esetében is (17. ábra b.).



17. ábra: 72 órás NOTCH1 és mTOR inhibitorok *in vitro* tumornövekedés gátló hatásának vizsgálata az általunk vizsgált HL sejtvonalakon

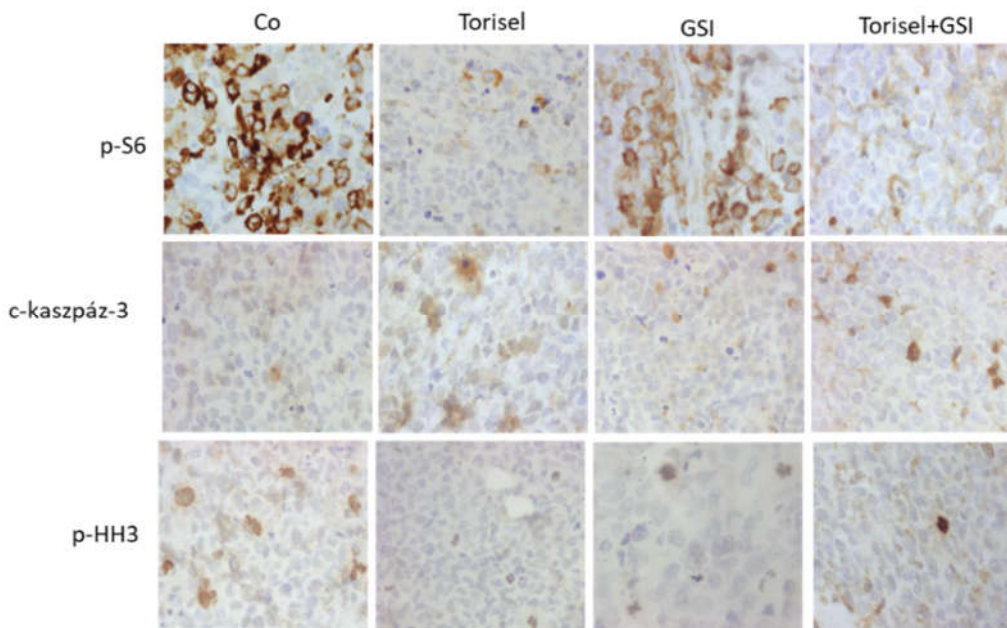
Rapamycin (Rapa; 50 ng/ml), gamma-szekretáz inhibitor (GSI; 4 μ M) és aktivált NOTCH1 inhibitor (SAHM, 5 μ M) kezelés indukált apoptózist és proliferációgátló hatásokat vizsgáltuk áramlás citométerrel (a.) és Alamar Blue teszttel (b.). A proliferációs értékeket a kezeletlen kontroll százalékában adtuk meg. A szimpla csillagok (*) a kontrollhoz viszonyított szignifikáns különbségeket a dupla csillagok (**) az adott kezelések közötti szignifikáns különbségeket jelzik.

L1236 xenograft vizsgálatainkban megerősítettük a konstitutív Notch1 és mTOR szignál aktivitás tumornövekedést támogató hatásait *in vivo*. A csak gamma-szekretáz inhibitorral (DAPT + GSIXII) kezelt állatok tumornövekedésében enyhe, nem szignifikáns tumor növekedésgátlást tapasztaltunk, míg a Torisel (rapamycin származék) kezelés önmagában és gamma-szekretáz inhibitor kezeléssel kombinációban alkalmazva is szignifikánsan gátolta a tumornövekedést a kontroll csoporthoz képest. Kombinált kezelés esetében a kezelt egerek tumormérete és a tumorok súlya csökkent a Torisel monoterápiával kezelt állatokéhoz képest, bár ez a Torisel hatásához képest szignifikáns különbséget nem mutatott (18. ábra). Immunhisztokémiai festéssel a xenograft tumorokban a Torisel kezelés mTORC1 aktivitást csökkentő hatásával (p-S6 pozitivitás csökkenés, mind intenzitásban, mind a sejtek számát tekintve) párhuzamosan a tumornövekedés intenzitásának csökkenésével összefüggésben, mind az osztódások számának csökkenését (p-HH3 - proliferáció gátló hatás), mind az apoptózissal elpusztuló lymphoma sejtek számának emelkedését (apoptózis indukció, aktivált kaszpáz-3) ki tudtuk mutatni (19. ábra).



18. ábra: mTOR és Notch szignál inhibitorok tumornövekedés gátló hatása L1236 xenograft modellben.

mTORC1 inhibitor (Torisel; 10 mg/Kg), gamma-szekretáz inhibitor (GSI; 4 mg/kg) és kombinált kezelés hatására tumorméret (a.) és végleges tumortömeg (b.) csökkenést figyeltünk meg. * - a szignifikáns különbségeket jelöli.



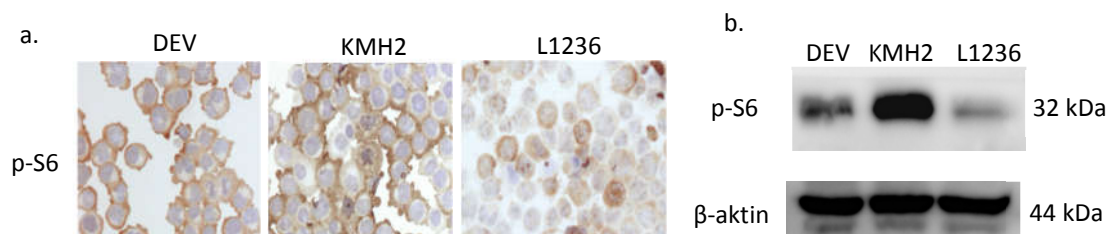
19. ábra: L1236 xenograft tumorokban az mTOR és Notch szignál inhibitor kezelésekre bekövetkező fehérje szintű változások

Immunhisztokémiai festéssel vizsgáltuk az mTORC1 inhibitor (Torisel) és gamma-szekretáz inhibitor (GSI) kezelésekre hatást az mTORC1 aktivitásban (p-S6), valamint a tumorsejtek osztódási kapacitásában (foszforilált hiszton H3, p-HH3) és az indukált apoptózis mértékében (hasított kaszpáz 3, c-kaspáz-3). (400 x)

4.2 Hodgkin lymphoma sejtek mTORC1 és C2 komplex aktivitás vizsgálata

4.2.1 mTOR aktivitási különbségek karakterizálása *in vitro*

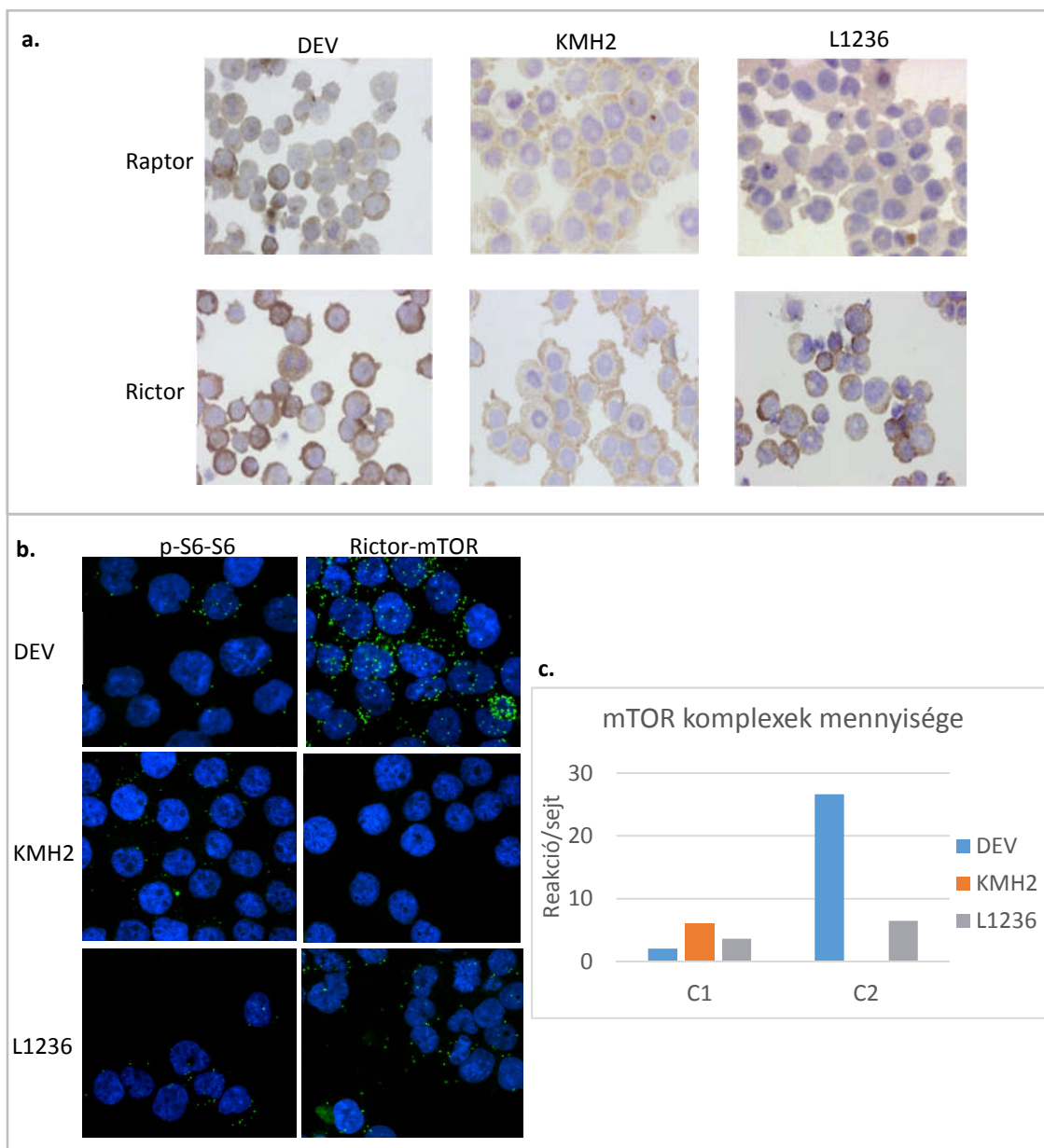
A három Hodgkin lymphoma sejtvonal mTOR aktivitásának különbségeit olyan fehérjék mennyiségi vizsgálatával hasonlítottam össze, amelyek a két különböző komplex, az mTORC1 és mTORC2 komplex aktivitásához kapcsolhatóak. Az S6 foszforilációját a sejtek többségében elsősorban az mTORC1 komplex aktivitásával hozzák összefüggésbe, bár más, az mTORC1 komplex aktivitástól független mechanizmusokat is leírtak már az előbbiben. *In vitro* körülmények között az eddig vizsgált különböző tumorsejtvonalakban igazolták, hogy az mTORC1 specifikus gátlója a rapamycin már 1-2 órás kezelést követően a kimutathatósági szint alá csökkenti a p-S6 mennyiségét a sejtekben (Western blot és áramlási citometriai adatok is). A p-S6 fehérje mennyisége az összehasonlító vizsgálatunk alapján a vizsgált három sejtvonalban jelentős mennyiségi különbségeket mutatott. Összehasonlítva, a KMH2 sejtvonalban mutattuk ki a p-S6 fehérje legnagyobb mennyiségét, ami arra utal, hogy ezeknek a Hodgkin lymphoma sejteknek a legmagasabb mTORC1 aktivitása. Az L1236 sejtvonalban szignifikánsan alacsonyabb mennyiségű p-S6 fehérjét detektáltunk, adataink alapján ez a sejt alacsonyabb mTORC1 aktivitással jellemezhető (20. ábra).



20. ábra: Hodgkin lymphoma sejtvonalak mTORC1 aktivitását jellemző p-S6 fehérje összehasonlító mennyiségi vizsgálata (Immuncitokémiai vizsgálattal; és Western blottal)

Az immuncitokémiai festéssel (a.) és Western blot technikával (b.) is igazoltuk a vizsgált HL sejtvonalak eltérő mTORC1 aktivitását jellemző p-S6 mennyiségi különbségeket. Az immuncitokémia festés esetében DAB kromogént (barna) és hematoxinin háttérfestést használtunk (nagyítás 400x).

Az mTORC1 és C2 komplexek mennyiségi és aktivitás különbségének vizsgálatához többféle módszert is használtunk. Raptor (az mTORC1 komplexre jellemző fehérje) és Rictor (az mTORC2 komplexre jellemző) fehérjék mennyiségét immuncitokémiai festéssel vizsgáltuk. A módszer szemikvantitatív elemzést tett lehetővé, összehasonlítva ugyanazon sejtek Rictor illetve Raptor festődését a három sejtvonalban az mTOR aktivitás háttérében a két fehérje komplex eltérő mennyiségét mutattuk ki (21. ábra a). A két komplex mennyiségi és aktivitási arányának kvantitatív vizsgálatát Duolink technika segítségével végeztük el. Az eljárással a sejtekben külön-külön értékelhető az mTORC1 komplex aktivitását jellemző p-S6 és S6 fehérjéhez, illetve az mTORC2 komplex mennyiségét jellemző mTOR és Rictor fehérjéhez specifikusan kötődő ellenanyagok egy 30-40 nm-es távolságon belüli bekötődése, így az mTORC1 komplex aktivitását és az mTORC2 komplex mennyiségét jellemző szignálok sejtenkénti mennyisége *in situ* meghatározható. A Duolink festések és értékelések alapján mTORC2 komplex fehérjék túlsúlyát (domináns megjelenését) detektáltunk DEV sejtvonalban, mTORC1 komplex aktivitásának túlsúlyát a KMH2 sejtvonalban, míg jelentős mTORC1 aktivitás mellett nagy mennyiségű mTORC2 komplexre utaló jellegzetes expressziós mintázatot tapasztaltunk az L1236 sejtekben (21. ábra b-c.).



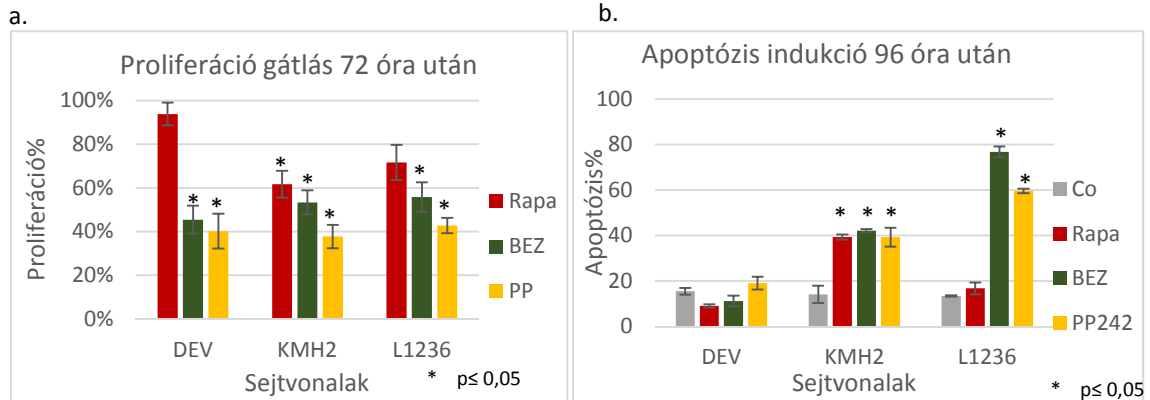
21. ábra: mTOR komplexek mennyiségének és aktivitásának karakterizálásához felhasznált festések reprezentatív fotói a három különböző HL sejtvonalban.

Az immuncitokémiai festés **(a.)**. (400x nagyítás, DAB kromogén-barna színreakció és hematoxilin háttérfestés); A C1 és C2 komplex mennyiségének, aktivitásának arányát Duolink technika segítségével karakterizáltuk - a zöld-pontszerű jelek p-S6 - S6 ellenanyagok vagy a Rictor-mTOR ellenanyagok együttes bekötődését jelzik. A p-S6 - S6 jelölés a C1-es komplex aktivitására, a Rictor-mTOR jelölés pedig a C2-es komplex mennyiségére utal **(b.)**. A Duolink reakciók software-es értékelésével meghatározható az egyes sejtek mTORC1 aktivitását jellemző érték/sejt és C2 mennyiségét jellemző érték/sejt a különböző sejtvonalakban **(c.)** (nagyítás: 400x; kék magfestés: DAPI).

4.2.2 mTOR inhibitorok tumornövekedés gátló hatása HL sejtekben

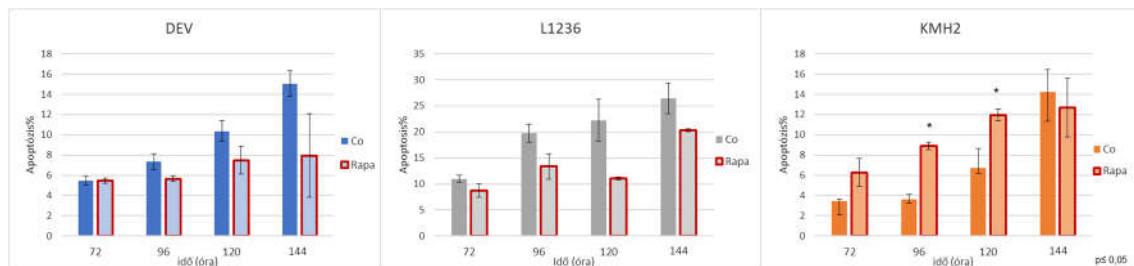
A sejtvonalak esetében tapasztalt mTOR aktivitási és mTOR komplex mennyiségi különbségek, a kimutatott mTORC2 komplexek befolyásolhatják az mTORI érzékenységet: a magas mTORC2 komplex expressziót mutató sejtvonalakban a rapamycin (mTORC1 specifikus gátlószer) kevésbé hatékony, ill. a sejtvonalak más mTORI-okkal szembeni érzékenysége is eltérő lehet.

In vitro eredményeink igazolták, az mTORI érzékenység különbségeket; az mTORC1 és C2 komplexet is gátló (PP242), illetve a kettős (duál-) inhibitor (NVP-BEZ 235, mTORC1/2 és PI3K gátló) kezelés hatékonyabb proliferáció gátló és apoptózis indukáló hatású, mint az mTORC1-gátló rapamycin kezelés. A 72 órás NVP-BEZ 235 és PP242 (mTORC1/2 gátló) kezelés mind a három sejtvonal proliferációját szignifikánsan csökkentette, míg a rapamycin a DEV és L1236 esetében ugyan csökkentette a proliferációt, de ez a hatása csak a KMH2 sejtvonal esetében volt szignifikáns (22. ábra a.). A KMH2 rapamycin kezeléssel szembeni nagyobb érzékenységet mutatja az is, hogy ezekben a sejtekben nemcsak proliferáció gátló, hanem apoptózis indukáló hatást is kimutattunk már 72h-s inkubációs időt követően (23. ábra). Érdekes, hogy a DEV és L1236 kezeletlen kontroll tenyészetekben a spontán apoptózis mértéke magasabb, mint a rapamycin kezelt tenyészetekben aminek hátterében a tenyészetek növekedési kapacitásában tapasztalt különbségek lehetnek (a DEV és L1236 sejtek alap proliferációs aktivitása magasabb, így gyorsabban öregednek, válnak tápanyaghiányossá a tenyészetek). Az adott kezelések hosszabb távú hatásainak vizsgálatokor a DEV és az L1236 sejtek esetében rapamycin kezelés hatására a proliferáció csökkenése és a spontán apoptózis emelkedése még 120 óra után sem volt szignifikáns (22-23. ábra). Hosszabb távú szignifikáns apoptotikus hatásokat a PP242 és NVP-BEZ 235 esetében a KMH2 sejtenyészetek mellett a rapamycinre kevésbé érzékeny, L1236 sejtvonalban is ki tudtunk mutatni (23. ábra b.).



22. ábra: mTOR inhibitorok biológiai hatásai HL sejtvonalakban.

Az mTORC1 gátló rapamycin (Rapa; 50 ng/ml), PI3K és mTOR gátló NVP-BEZ 235 (BEZ; 1 μ M) és C1/C2-t gátló PP242 (PP; 1 μ M) hatása; a sejtek kezeletlen kontrollhoz viszonyított proliferáció változását AlamarBlue teszttel **(a.)** az apoptózis %-os arányának változását áramlási citometriával határoztuk meg a tenyészetekben **(b.)**.

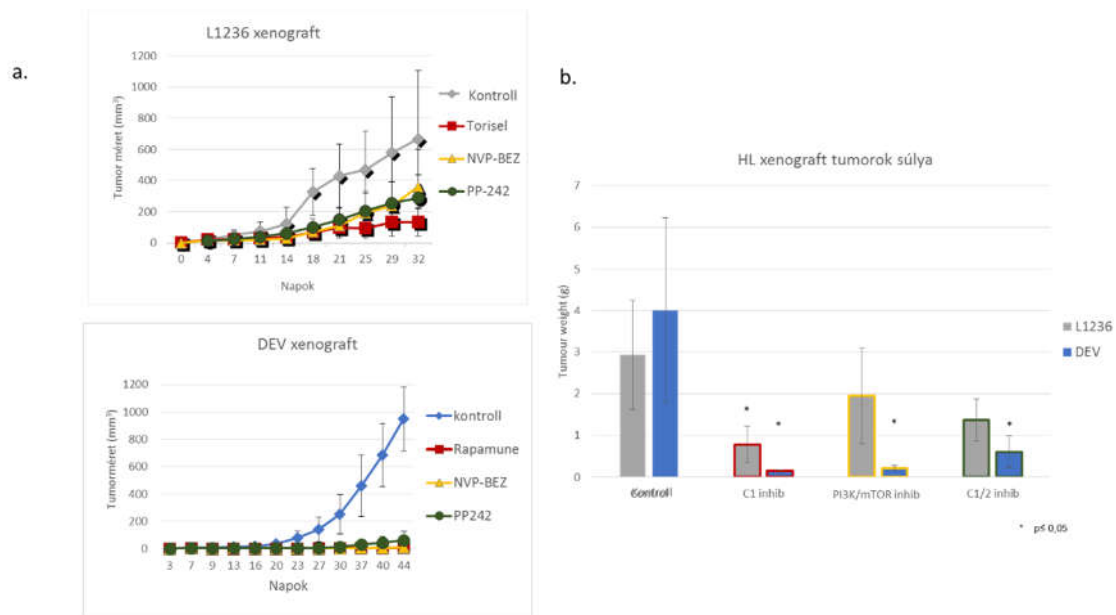


23. ábra: A rapamycin apoptózist indukáló hatásának vizsgálata hosszútávú kezelés után HL sejtvonalakon.

Áramlási citométerrel mért apoptózis százalék a rapamycin (Rapa, 50 ng/ml) kezeléssel szemben rezisztensebb (DEV, L1236) és érzékeny (KMH2) HL sejtvonalakon.

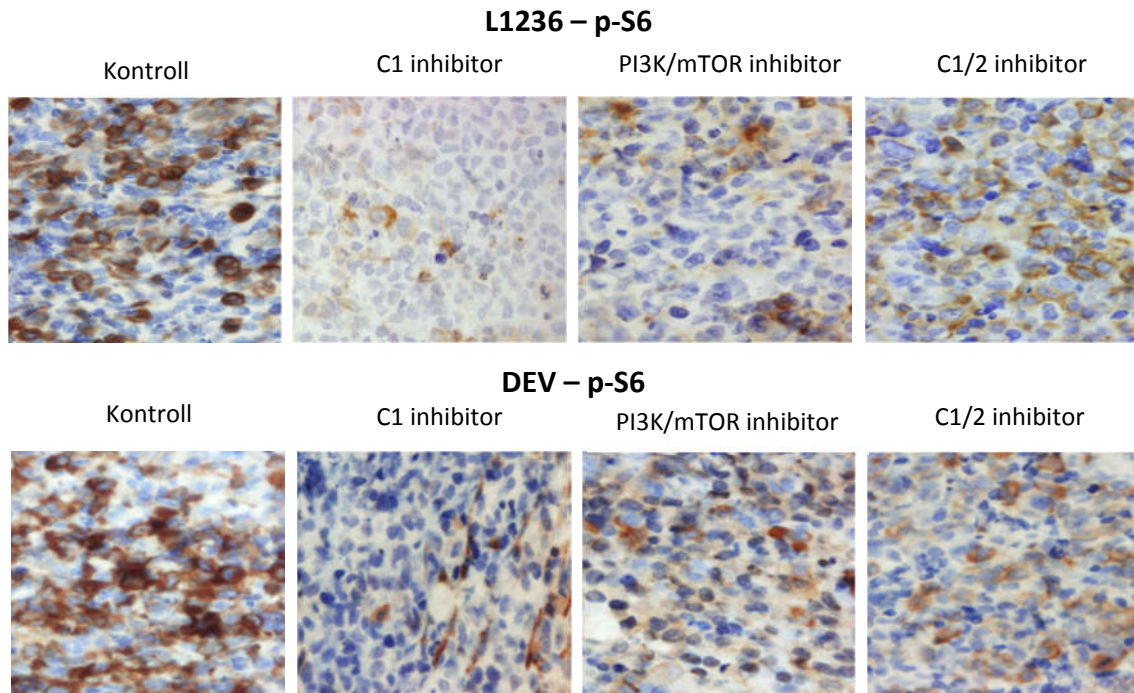
Az előbbi kezelések tumornövekedést gátló hatásait *in vivo* is igazoltuk. Korábban már jellemeztük legérzékenyebb sejtvonal, a KMH2 sejtek xenograft modelljében a Rapamune kezelés szignifikáns tumorméret csökkenést eredményező hatásait (Márk Ágnes). Az *in vitro* tapasztalt különbségek ellenére a KMH2 xenograftok esetében tapasztalt hasonló szignifikáns tumornövekedés gátlást tapasztaltunk a másik két sejtvonal, a DEV és L12136 xenograft modellek esetében is mTORC1 gátló Torisel, illetve Rapamune kezelésekkel.

Az L1236 és DEV xenograftokban a háromféle mTOR inhibitor hatásait összehasonlítva *in vivo*, azt tapasztaltuk, hogy a rapamycinhez hasonlóan csökkent a tumorok növekedése, a tumorok mérete. Igaz szignifikáns tumorméret csökkenést mindhárom inhibitor csak a DEV xenograftok esetében mutatott (24. ábra). Az állatokból eltávolított tumorszövetekben az mTORC1 komplex aktivitás gátló hatásokat minden xenograft esetében igazoltuk, p-S6 immunhisztokémiai festés segítségével (25. ábra).



24. ábra: különböző mTOR inhibitor kezelések tumornövekedést gátló hatása DEV és L1236 *in vitro* rapamycin rezisztens HL sejtek xenograft modelljeiben.

Az mTOR inhibitorok szignifikánsan gátolták a tumornövekedést, melyet a tumortérfogat **(a)** és tumortömeg **(b)** adatok mutatnak. (mTORC1 inhibitor – Rapamune (3 mg/kg, per os.), Torisel (10 mg/kg, i.p.); PI3K és mTOR gátló NVP-BEZ 235 (30 mg/kg per os); C1/C2-t gátló PP242 (10 mg/kg, per os.)



25. ábra: Az mTOR inhibitor kezelések *in vivo* mTORC1 aktivitást gátló hatásának *in situ* igazolása DEV és L1236 xenograftokban.

Az mTORC1 aktivitást jelző p-S6 fehérje jelenlétét IHC festés segítségével vizsgáltuk az mTOR inhibitorokkal kezelt xenograftokban. (mTORC1 inhibitor – Rapamune (3 mg/kg, per os.), Torisel (10 mg/kg, i.p.); PI3K és mTOR gátló NVP-BEZ 235 (30 mg/kg per os); C1/C2-t gátló PP242 (10 mg/kg, per os.) (nagyítás: x400; DAB – barna színreakció)

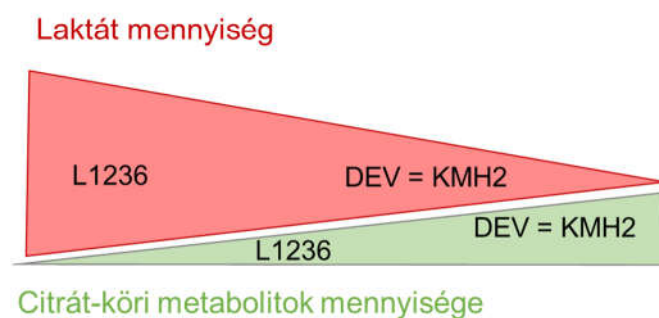
4.3 HL sejtvonalak anyagcsere folyamatai az mTOR aktivitás függvényében

Az mTOR gátlószerekkel szembeni érzékenység különbségek háttérének vizsgálatához, az mTOR metabolikus szabályozó szerepének jelentőségét figyelembe véve a sejtvonalak anyagcsere folyamatainak vizsgálatát is megkezdtük. A sejtek intracelluláris metabolit koncentráció viszonyainak jellemzését, illetve a kezelések után bekövetkező koncentráció változások vizsgálatát végeztük el.

4.3.1 HL sejtvonalak alap metabolikus aktivitása és összehasonlítása

Az intracelluláris metabolitok koncentrációját folyadék kromatográfiás tömeg spektrometriai (LC-MS) mérés segítségével határoztuk meg. A lymphoid sejtekre aktivált állapotban jellemző magas glikolitikus kapacitásnak megfelelően általánosan jellemző magas intracelluláris laktát mennyiségeket mértünk mindhárom sejtvonalban, a laktát mennyisége az L1236 sejtek esetében volt a legmagasabb. A labor korábbi vizsgálatai alapján a metabolikus jellemzéshez meghatározott metabolitok koncentrációjának arányait választottuk. A glikolitikus és oxidatív foszforilációs energetikai folyamatok egyensúlyát jellemezve, a glikolitikus folyamatok intenzitását jellemző laktát mennyiségének és a detektálható citrátköri intermedierek mennyiségének arányát adtuk meg. Előbbiekből képzett hányadosok alapján a glikolitikus folyamatok legnagyobb mértékű túlsúlyát az L1236 sejtvonalban mutattuk ki, míg a másik két HL sejtvonal esetében az L1236-hoz képest alacsonyabb, de jelentős mértékű glikolitikus alap aktivitást figyeltünk meg (26. ábra).

Sejtvonal	Laktát (nM/10 ⁶ db sejt)	Citrát kör (nM/10 ⁶ db sejt)	Laktát/Citrát kör
L1236	~40	~2,2	18
DEV	~24	~2,5	9,6
KMH2	~23	~2,4	9,6



26. ábra: HL sejtvonalak glikolitikus és oxidatív foszforilációs energetikai folyamatainak karakterizálása LC-MS módszerrel

LC-MS mérések laktát és citrátköri metabolit koncentráció (szukcinát, malát, citrát, izocitrát, fumarát) eredményei, a metabolit koncentrációk aránya a különböző HL sejtekben **(a.)**. Az előbbi metabolikus különbségek a glikolitikus folyamatok aránybeli eltolódásának ábrázolása grafikusán **(b.)**.

4.3.2 Az mTOR inhibitorok metabolikus hatásai HL sejtekben

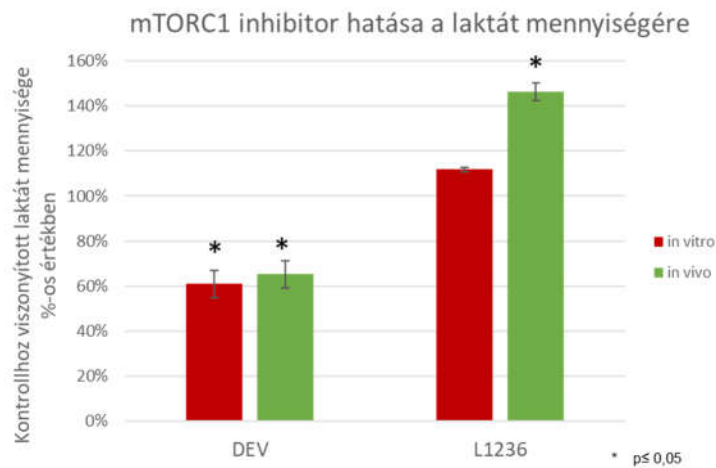
A metabolikus változások vizsgálatakor *in vitro* 48 órás mTORI kezelés után vizsgáltuk a sejtek metabolit koncentráció viszonyainak változását LC-MS segítségével. Ennél az időpontnál a rapamycin kezelés enyhe proliferáció gátló hatása már megfigyelhető a KMH2 sejtekben (míg a másik két vonalban nem), és legalább 20%-os proliferáció csökkenést okoz a PP242 és NVP-BEZ 235 minden vizsgált sejtvonalban. Hasonló érzékenység különbség a 48 órás apoptotikus hatásokban is megfigyelhető, a KMH2 érzékenységének megfelelően, a PP242 és NVP-BEZ 235 esetében a KMH2 sejtekben már 48 óra elteltével is kimutatható az apoptózis indukció, a többi sejtvonalban azonban nem. Az mTORC1 gátló kezelés metabolit koncentráció viszonyokat módosító hatásait mindhárom sejtvonalban megfigyeltük, a sejtek bioenergetikai folyamatainak intenzitása csökkent a kezelések hatására. A glikolitikus laktátszint csökkenése jellemezte a KMH2 és DEV sejteket. Érdekes azonban, hogy az eleve nagyobb glikolitikus kapacitással jellemezhető L1236 esetében a laktát mennyisége nem csökkent a rapamycin kezelés hatására, hanem inkább emelkedett, és az NVP-BEZ duál inhibitor kezeléseket esetében sem általános glikolízis gátló hatás jeleit figyeltük meg. Az új generációs mTORI-ok esetében általában jelentősebb mértékű anyagcsereváltozásra utaló metabolit koncentráció változásokat figyeltünk meg. Az mTOR C1/C2 gátló PP242, például az összes vizsgált sejtvonal esetében legalább a felére csökkentette az intracelluláris laktát mennyiségét és ez a kezelés csökkentette legjelentősebben a citrát köri intermedierek mennyiségét is (7. táblázat).

7. táblázat: mTOR inhibitor kezelés hatására bekövetkező proliferációs, apoptotikus és metabolit mennyiségi változások összefoglalása a vizsgálat HL sejtvonalakban

48 órás *in vitro* rapamycin (50 ng/ml) és duálinhibitor kezelések (NVP-BEZ 235, 1 μ M; PP242, 1 μ M) hatását ábrázoltuk a sejt kultúra növekedési ütemét befolyásoló változásokban (proliferáció, apoptózis) illetve a glikolitikus (laktát) és a citrát köri (szukcinát, malát, citrát, izocitrát, fumarát) metabolitok mennyiségi változásainak feltüntetésével (Alamar Blue és áramlási citometriai valamint folyadék kromatográfias tömeg spektrometriai (LC-MS) mérési eredményeink alapján). A kezeletlen kontrollhoz viszonyított változásokat nyilakkal jelöltük. A nyilak a mennyiségváltozás irányát (nő= \uparrow , csökken= \downarrow) és mértékét mutatják (\emptyset <10% változás; szimpla nyíl = 10-40% változás; dupla nyíl = 40-60% változás; tripla nyíl >60% változás).

48h-ás kezelés	RAPAMYCIN (mTORC1 inhib.)			NVP-BEZ 235 (mTORC1/2 és PI3K inhib.)			PP-242 (mTORC1/2 inhib.)		
	DEV	KMH2	L1236	DEV	KMH2	L1236	DEV	KMH2	L1236
Proliferáció	\emptyset	\downarrow	\emptyset	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	$\downarrow\downarrow$	\downarrow
Apoptózis	\emptyset	\emptyset	\downarrow	\emptyset	\uparrow	\downarrow	\emptyset	\uparrow	\downarrow
Laktát	\downarrow	$\downarrow\downarrow$	\uparrow	$\downarrow\downarrow\downarrow$	\emptyset	\emptyset	$\downarrow\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow\downarrow$
Szukcinát	$\downarrow\downarrow$	\downarrow	\uparrow	$\downarrow\downarrow\downarrow$	\downarrow	\emptyset	$\downarrow\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow\downarrow$
Malát	$\downarrow\downarrow$	\emptyset	\uparrow	$\downarrow\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	\downarrow	$\downarrow\downarrow\downarrow$	\downarrow	\uparrow
Citrát	\downarrow	$\downarrow\downarrow$	$\uparrow\uparrow$	$\downarrow\downarrow\downarrow$	\downarrow	\emptyset	$\downarrow\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow\downarrow$	\downarrow
Izocitrát	$\downarrow\downarrow$	\emptyset	\uparrow	$\downarrow\downarrow\downarrow$	\downarrow	\downarrow	$\downarrow\downarrow\downarrow$	\emptyset	\emptyset
Fumarát	$\downarrow\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	\downarrow	$\downarrow\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow\downarrow$

In vivo xenograft tumorok (DEV és L1236) szöveti mintáinak vizsgálatát is elvégeztük LC-MS-el. A rapamycin kezelés a glikolitikus aktivitást hasonlóan befolyásolta *in vivo* és *in vitro* a két modellben. A tumorokban meghatározott szöveti laktát mennyiségek alapján a Rapamune kezelés laktát termelést csökkentő hatását igazoltuk a DEV xenograftokban és az *in vitro* eredményekkel összhangban a Rapamune kezelés hatására *in vivo* is emelkedett szöveti laktát szintet mértünk az L1236 xenograftban (27. ábra).



27. ábra: mTORC1 inhibitor kezelés szöveti laktát szintet befolyásoló hatása *in vitro* és *in vivo* a DEV és L1236 HL sejtekben.

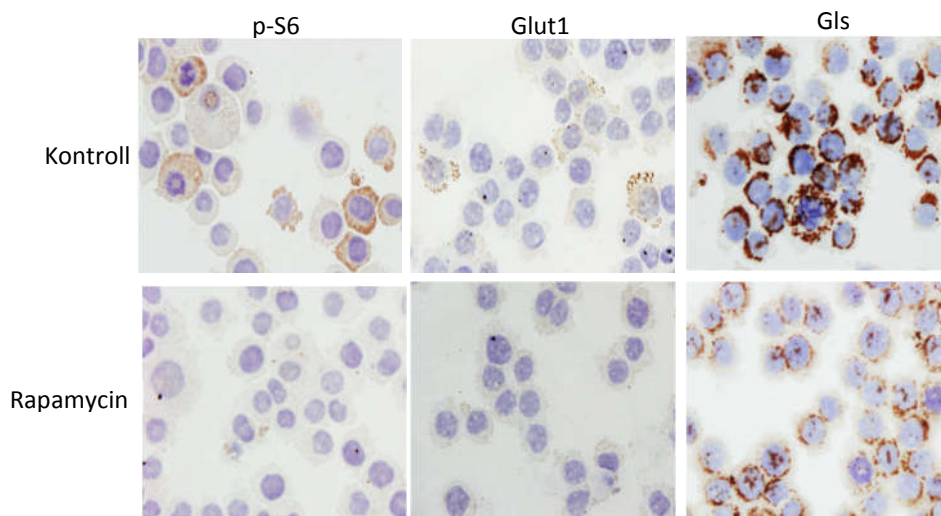
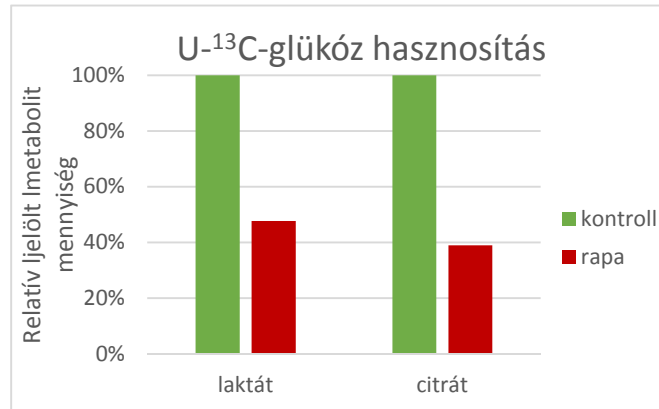
Az mTORC1 inhibitor (Rapamycin (72 h; 50 ng/ml), ill. Rapamune (3 hét; 3x3 mg/kg/hét)) kezelés laktát intracelluláris, illetve szöveti laktát szintet módosító hatása (a kezeletlen kontroll %-ában ábrázoltuk az LC-MS mérési eredményeket).

4.3.3 HL sejtek tápanyag-, energia-hasznosítási folyamatai

A sejtek glükóz felhasználását vizsgálva D5030 médiumban, U-¹³C jelölt glükózt (tápanyagforrást) adtunk 1 órán keresztül a tenyészetekhez. A három sejtvonalban közel azonos mértékben hasznosult a jelzett glükóz. 1 óra alatt a laktát 15-23%-ában jelent meg a ¹³C izotóp jelölés, amit LC-MS méréseinkben a laktát 3-as tömegszám növekedésével mutattunk ki. Ez alátámasztja a sejtek magas glikolitikus aktivitását mutató más típusú vizsgálataink eredményét. A sejtek, különösen a daganatsejtek esetében igaz azonban, hogy más tápanyagszubsztrátokat is jól hasznosíthatnak, az *in vitro* tenyésztett lymphoma sejtek glutamin függősége például jól ismert.

Az mTOR aktivitás szerepe a glikolízis folyamatában is igazolódott a KMH2 sejtekben. *In vitro* rapamycin kezelés mellett 48 óra kezelés után a sejtek glükóz hasznosítását jellemző LC-MS eredmények és a sejtek Glut1 expressziós változásai is alátámasztották az előbbieket (p-S6 expresszió csökkenéssel párhuzamosan a Glut1 expresszió csökkenést tapasztaltunk). A KMH2 sejtek metabolikus aktivitása jelentősen csökkent, a glükóz jelölést követően jelölt laktát és citrát mennyisége legalább a felére esett vissza a rapamycin kezelt sejtekben (28. ábra a.).

Glutamin hasznosítást, az előbbihez hasonló módon, jelölt glutamin ¹³C atomjainak beépülését nyomonkövetve a szukcinátba vagy egyéb a zsírsav szintézis és fehérje szintézis szempontjából fontos metabolitokba, is ki tudtuk mutatni KMH2 sejtekben. Továbbá megfigyeltük a glutamin hasznosításban fontos szerepet játszó glutamináz enzim mennyiségének mTORC1 inhibitor függő szabályozását is; a rapamycin kezelés proliferáció, tumornövekedést gátló hatása mellett a glutamináz enzim mennyiségét is csökkentette a kezelt lymphoma sejtekben (28. ábra b.).



28. ábra: A rapamycin különböző tápanyagforrások felhasználását befolyásoló hatása a KMH2 sejtvonalban

A 48 órás rapamycin (50 ng/ml) kezelés a kezeletlen kontrollhoz képest az U-¹³C-glükóz laktátba és citrátba épülését csökkentette **(a.)**. A rapamycin kezelés hatására az mTORC1 aktivitása (foszforilált riboszomális S6 – p-S6), a glükóz felvétel (glükóz transzporter1 – Glut1) és a glutamin hasznosítás (glutamináz – Gls) lecsökkent a sejtekben **(b.)**. (Nagyítás: x400, a fehérjék jelenlétét barna (DAB) színreakció jelzi)

5 Megbeszélés

A PI3K/AKT/mTOR útvonal központi szabályozó és ezen keresztül daganatbiológiai szerepét mutatják saját vizsgálataim eredményei. Több, különböző daganattípus esetében leírták már az mTOR kináz fokozott aktivitását, így diagnosztikai és terápiás jelentősége van annak, hogy ezeket a szabályozási zavarokat pontosan megismerjük adott daganattípusok esetében [8, 22]. Eddigi kutatási eredményeim az mTOR kináz aktivitásával kapcsolatos ismeretek bővítését, a folyamatok jobb megértését segítik elsősorban humán Hodgkin lymphomák, és colorectalis carcinomák esetében, és reményeink szerint terápiás, diagnosztikai fejlesztések alapjául is szolgálhatnak a jövőben.

5.1 A Notch és az mTOR szignál aktivitásának kapcsolata HL-ban

A Hodgkin lymphomás betegek terápiás válaszai és öt éves túlélési eredményei igen jók, ugyanakkor a rosszabb prognózisú betegek kezelési eredményei az utóbbi időben nem sokat javultak, még a különböző drasztikus kezelések és az őssejt transzplantációs kezelések ellenére sem. Korábbi vizsgálatainkban jellemeztük a HL-ás betegek HL sejtjeinek mTORC1 komplexhez köthető, fokozott mTOR aktivitását és bizonyos HL sejtvonali modellek (KMH2, DEV, L1236) szintén jelentős mTOR aktivitását [72]. A hiperaktivitást előidéző folyamatok között elsősorban a PI3K/AKT/mTOR szignált érintő tumorszuppresszor vagy onkogén fehérjék génjeinek mutációi merülnek fel, pl. a *PIK3CA*, mely mutációja a DLBCL-ák 10%-át érinti, vagy a *PTEN* és az *AKT* gének mutációi, melyeket számos daganat (pl: emlő, vastagbél, endometrium carcinoma és haematológiai tumorok) esetében már leírtak [67, 133-137]. Ezek a mutációk azonban a HL lymphomákat kevéssé jellemzik [138]. Saját eredményeink az általunk vizsgált három HL sejtvonalon megerősítették ezeket az adatokat, a vizsgált onkogének és tumorszuppresszor gének (*Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot* panelben 50 gén szerepel) vad típusúak a DEV, KMH2 és L1238 sejtekben. Ezért a lymphomák nagy százalékában szintén nagy jelentőségű, különböző jelátviteli események, mint például B-sejt receptor útvonal függő túlélési mechanizmusok vagy egyéb jelátviteli aktivitás zavarok közül a Notch jelátviteli út aktivitásának lehetséges

zavara és ennek az mTOR aktivitással összefüggése került kutatásunk érdeklődésének középpontjába.

A klasszikus Hodgkin lymphomás szöveti minták jelentős mennyiségű gyulladásozó sejttel és kevés, szétszórva elhelyezkedő malignus sejttel jellemezhetőek. Ebben a környezetben a tumorsejtek a nem daganatos T- és B-sejtekkel, eozinofil granulocitákkal, makrofágokkal és hízósejtekkel szoros kölcsönhatásban vannak, citokinek és kemokinek (pl: IL-5, CCL5) valamint sejt-sejt között létrejövő közvetlen receptor-ligand kapcsolatok, pl. CD40 – CD40L vagy a NOTCH1 és Jagged1 biztosítják a sejtek túléléséhez és proliferációs aktivitásának megfelelő mikrokozonyezetet [139].

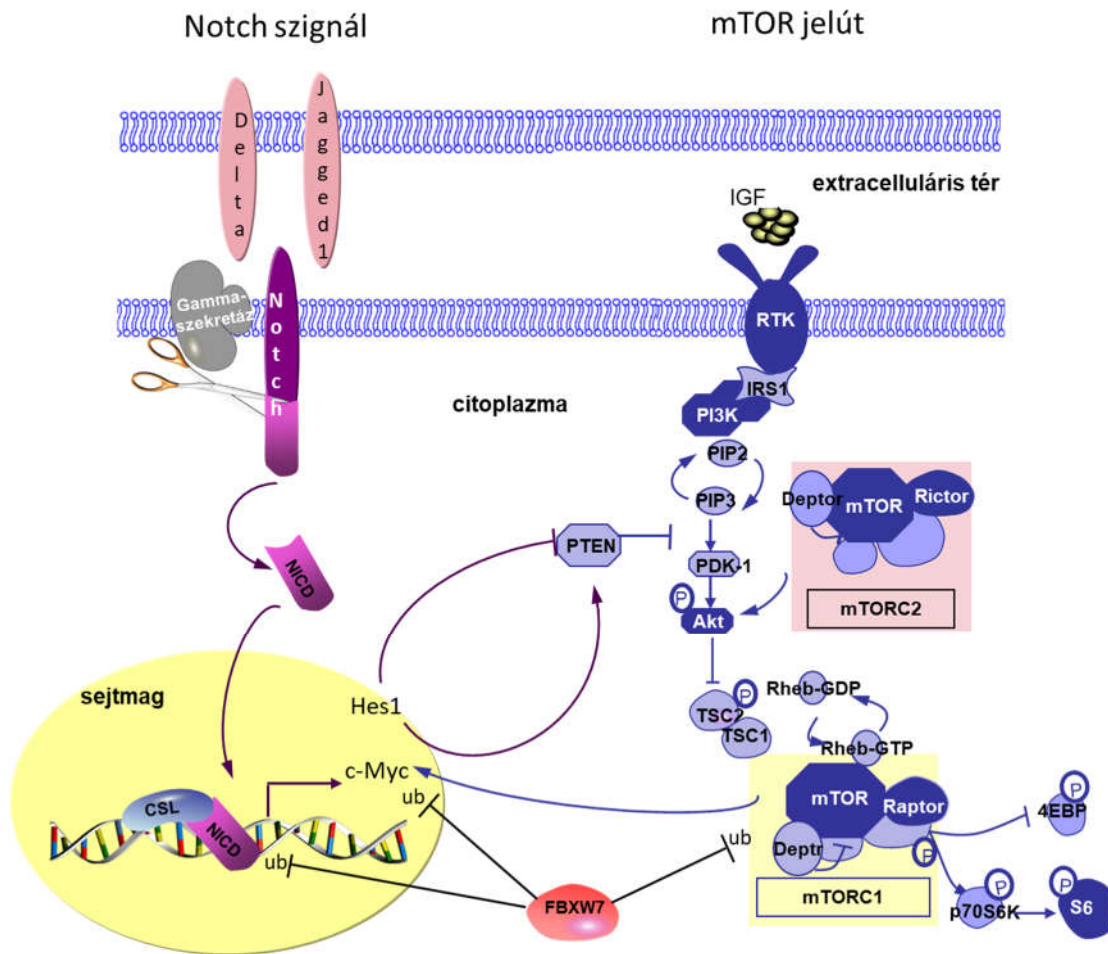
A Notch szignál a haematopoezis egyik kulcs szabályozó útvonala, az érési folyamatok több fázisában is fontos szerepet tölt be. Fokozott aktivitása intenzív proliferációhoz és a differenciálódási folyamatok megállításához vezethet, gének átírásának fokozásával (pl: *c-Myc*, *Hes1*) vagy további jelviteli folyamatok aktiválásával (pl: NFkB, PI3K/AKT/mTOR, WNT), melyek haematológiai daganatok kialakulását igen gyakran okozhatják [140-143]. Jundt és munkatársai a NOTCH1 receptor fokozott expresszióját írták le a Hodgkin és Sternberg Reed sejtekben, valamint ezzel párhuzamosan a NOTCH1 ligand, Jagged1-nek emelkedett expresszióját figyelték meg a környező sejtekben és a tumorsejtekben is [144].

HL sejtvonalakon végzett vizsgálataim eredményeit, mely során a NOTCH1-3 és Jagged1,2 expressziót igazoltunk, ezek a megfigyelések is alátámasztják. Előbbieket megerősítette, hogy az aktivált, hasított NOTCH1 fehérje konstitutív, ligand aktivációtól független jelenlétét mutattuk ki a vizsgált HL sejtvonalakban, illetve hasított NOTCH1 fehérjét mutattunk ki a humán szöveti mintákban is. A konstitutív Notch1 szignál aktivitását, a hasított NOTCH1 mennyiségét a NOTCH1 hasítását végző gamma-szekretáz gátlása nem befolyásolta *in vitro*, csak a legérzékenyebb sejtvonalonban (KMH2) figyeltünk meg kis mértékben apoptózis indukciót, mint biológiai hatást. A gamma-szekretáz inhibitor hatásaival szembeni rezisztencia hátterében leggyakrabban a NOTCH1 receptor, PTEN fehérje vagy FBXW7, ubiquitin ligáz mutációja állhat, ami azonban egyik vizsgált sejtvonalat sem jellemezte [100, 145].

A hagyományos receptor-ligand kötés mellett, a nem-kanonikus Notch jelút aktiválódás is bekövetkezhet a tumorsejtekben. Ekkor ligandtól függetlenül figyelhető meg a konstitutív NOTCH1 aktiválódás, melyet a β -catenin indukálhat és a Wnt szignálon

keresztül fejtheti ki a hatását. Ilyen esetekben a hagyományos gátlószerke, úgy mint a gamma-szekretáz inhibitorok hatástalanok lehetnek, ezért újabb inhibitorok alkalmazása vagy új fehérje célpontok azonosítása elengedhetetlen a hatékony NOTCH-függő tumornövekedés gátláshoz [146]. A Wnt szignál aktiválódása több szolid tumort is jellemez, továbbá lymphomák, úgy mint MCL, DLBCL és HL esetében is leírták már mutációk és/vagy a mikrokörnyezet hatására bekövetkező fokozott aktivitását [147-149]. Más preklinikai vizsgálatok és jelen kísérleteink is alátámasztják, hogy az aktivált NOTCH1 transzkripciót aktiváló hatását gátló új inhibitor, a SAHM1 hatékonyabb a gamma-szekretáz inhibitoroknál; mind a három HL sejtvonalban szignifikáns biológiai változást eredményezett (proliferáció gátló és apoptózis indukáló volt), habár a célgénnek átírásában (*c-MYC* és *HES1*) nem tapasztaltunk szignifikáns változást [150].

A NOTCH1 célgénnek különböző módon szabályozhatnak más, a jelút aktivitását szabályozó fehérjéket, és így akár egész útvonal aktivitását is. Ilyen fehérje pl. a PTEN tumorszuppresszor is, mely expresszióját a HES1 és a c-MYC ellentétesen szabályozhatja (HES1 gátolja, c-MYC indukálja PTEN expressziót). A megfelelő hatások érvényesülése sejttípustól és -állapottól függő folyamat (29. ábra) [103, 107].



29. ábra: A Notch és az mTOR jelátviteli útvonalak kapcsolatai

„P” a foszforilálódásokat, az „ub” rövidítés az ubiquitinilálódásokat jelöli.

Saját eredményeink is felhívják a figyelmet arra, hogy új célpont lehet a különböző magas NOTCH-1 aktivitást mutató tumorok, így a HL-ák kezelésében az mTORC1 komplex aktivitás is [151]. Az mTORC1 specifikus gátlója a rapamycin, ami a gamma-szekretáz inhibitorral szembeni rezisztencia esetében is szignifikáns tumornövekedés gátlónak bizonyult *in vitro* és *in vivo*, már monoterápiában is és gamma-szekretáz inhibitorral kombinálva is. Kombinált kezelés esetében a tapasztalt tumornövekedés gátlás a rapamycin mTOR jelút gátló hatásához kötődik (sem a gamma-szekretáz inhibitor nem gátolta az mTORC1 aktivitást sem a rapamycin nem változtatta meg a NOTCH1 aktivitását), ami eredményeink szerint felülírhatja a folyamatosan aktivált NOTCH1 receptor hatásait. A vizsgált HL sejtek rapamycin érzékenysége sejtvonalanként eltérőnek bizonyult *in vitro*, és gamma-szekretáz inhibitor kombinált

kezelés fokozta a rapamycin hatását *in vitro* és *in vivo* is. Ez a gamma-szekretáz, illetve gamma-szekretáz inhibitor kezelés mikorkörnyezet módosító hatásából is következhet. Ismert ugyanis, hogy a Notch szignál gátlása mellett a gamma-szekretáz inhibitor képes a kemokin szignált (CXCR4/SDF-1) is befolyásolni, bár a kombinált kezelés *in vivo* nem mutatott szignifikáns különbséget a C1 inhibitor monoterápiához képest a vizsgált HL xenograft modellekben, ami az mTOR gátlók hasonló, *in vivo* komplexebb hatásának is egyik következménye lehet [152, 153].

Eredményeink alapján a konstitutív NOTCH1 aktivitás, mely a HL sejteket jellemzi, olyan potenciális terápiás célpont lehet, amelynek hatásait a hagyományos gamma szekretáz inhibitorok hatásának elmaradása esetében más, a NOTCH1 aktiváció következményeit befolyásoló kezelések, például az mTORI kezelés is gátolni képes.

5.2 mTOR komplexek aktivitása HL sejtekben

Korábbi DLBCL-es betegek biopsziás mintáinak segítségével végzett vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy azok az esetek, amelyekben a fokozott mTOR aktivitást párhuzamosan emelkedett Rictor (C2 komplex) expresszió jellemezte, rosszabb prognózisúak, túlélési adataik rosszabbak [68]. A dolgozatban vizsgált HL sejtvonalak rapamycin érzékenysége *in vitro* vizsgálataink szerint az mTORC2 jelenlétével összefüggést mutatott: az mTORC1 komplex dominanciát mutató KMH2 sejtek voltak a legérzékenyebbek a rapamycin proliferáció gátló és apoptotikus hatásaival szemben, míg az emelkedett Rictor, mTORC2 expressziót mutató L1236 és DEV sejtvonalakban a rapamycin biológiai hatása *in vitro* még 72 óránál hosszabb kezelések esetében is elmaradt. Más rapamycin rezisztens hematológiai és egyéb daganatokon végzett preklinikai vizsgálatokkal összhangban ezekben a sejtvonalakban, csak az új generációs, két komplexet együttesen gátló PP242-nek vagy a duál inhibitornak, NVP-BEZ 235-nek volt tumornövekedés gátló hatása [154, 155]. Az új generációs inhibitorok *in vitro* jóval jelentősebb hatása ellenére azonban a C1 inhibitor (Rapamune/Torisel) *in vivo* a kombinált inhibitorokéhoz hasonló mértékben gátolta HL xenograft tumorok növekedését, ami magyarázható egyrészt a hosszabb kezelési idővel (*in vivo* több mint egy hónap); illetve azzal, hogy a rapalogok klinikailag alkalmazható készítmények, gyógyszerek (humán felhasználás), míg az újabb mTOR inhibitorok fejlesztése jelenleg

még zajlik (felhasználásuk preklinikai vagy fázis vizsgálatokban engedélyezett csak, így a dózisok és a készítmények egyéb tulajdonságai még nem véglegesek). Egyebek mellett az mTORC1 gátlók *in vivo* magasabb hatékonyságát egyéb tényezők, például munkacsoportunk korábbi eredménye is magyarázhatja, amely szerint az mTORC1 gátló rapamycin kezelés a tumornövekedést gátló mikrokörnyezeti faktorok (pl: TGF β) hatását képes helyreállítani lymphoma sejtekben *in vitro*, aminek *in vivo* jelentősége nemcsak a szöveti TGF β , hanem más szöveti faktorok tumorelles hatásainak az aktiválását is jelentheti [156].

Az mTOR aktivitás sejtek anyagcseréjének szabályozását érintő hatásai egyre ismertebbeké váltak az elmúlt időben. A HL sejtek magas mTOR aktivitása és az mTORI-ok általunk és egyes fázis vizsgálatokban is kimutatott jelentős HL sejtek növekedését érintő hatásai indokolták azokat a vizsgálatokat, amelyeket a HL sejtek mTOR aktivitásának és metabolikus profiljának összefüggéseivel kapcsolatban kezdtünk meg [77].

Ismert, hogy a normál lymphoid sejtekre aktivációjukat követően fokozott glukóz felvétel és hasznosítás, magas glikolitikus aktivitás jellemző. Ez a legtöbb lymphomára és HL sejtekre is igaz [120]. A vizsgált három HL sejtvonalban az intracelluláris metabolitok koncentrációjának meghatározásával ennek megfelelően szintén magas laktát mennyiségeket, magas glikolitikus aktivitást, jelentős glukóz transzporter1 expressziót figyeltünk meg, ezek az eredményeink alapvetően Hartmann eredményeit erősítették meg. Érdekes volt azonban, hogy glikolitikus aktivitásban jelentős eltéréseket tapasztaltunk sejtvonalanként. HL sejtek esetében a jelentős glikolitikus aktivitás mellett azonban az intenzív mitokondriális funkciók, oxidatív foszforilációs folyamatok párhuzamos működésének jelenlétét is ki tudtuk azonban mutatni, amire egy másik vizsgálat is felhívta a figyelmet [121]. Mindezek az adatok, a HL sejtek jelentős bioenergetikai igényeinek kielégítéséhez intenzív metabolikus aktivitást igazoltak a sejtekben.

Az mTORC1 gátlás hatására egyes anyagcsere és bioenergetikai folyamatok aktivitása megváltozhat, a felépítő és lebontó folyamatok egyensúlya átrendeződhet [157-159]. Az mTORI-ok, elsősorban az új generációs inhibitorok (kettős ill. dual inhibitorok) általános intracelluláris metabolit koncentráció csökkentő hatását figyeltük meg a különböző sejtvonalakban, lymphoma és más sejtvonalakban is. Ez alól a C1/2

aktivitással is rendelkező, legintenzívebben glikolizáló L1236 sejtvonal bizonyult kivételnek. Ebben a sejtben a rapamycin kezelés – amely általános glikolízis gátló hatású – fokozta a laktát termelését *in vitro* és *in vivo* is. A rapamycin glikolízis gátló hatását bizonyos lymphoma és leukémia sejtek esetében már megfigyelték, melyet a rapamycin szenzitív KMH2 sejtvonal glükózfelvétel és hasznosítás gátlásán keresztül a mi vizsgálatainkban is igazolni tudtunk [160]. Azt azonban, hogy a rapamycin lymphomasejtekben ellentétes metabolikus hatásokat is mutathat elsőként figyeltük meg ezekben a HL sejtekben.

Előbbire magyarázat lehet, hogy bizonyos tumor sejtek (pl: emlő carcinoma), hipoxiás vagy éhezéssel állapot létrejöttékor – mely folyamatok szorosan összekapcsolódnak az mTOR aktivitással – más alternatív energia forrással, szubsztrát hasznosítással (pl. az acetát hasznosítás, zsírsav oxidáció, aminosavak oxidációja) pótolhatják energia szükségleteiket és ezek segíthetik túlélésüket [161]. Ismert, hogy a glutamin – lymphoid sejtek egyik fontos alternatív energia forrása - felvétele és hasznosítása összefügghet a sejtek emelkedett mTORC1 és C2 aktivitásával, ez párhuzamosan pedig olyan sejtes folyamatokat támogathat (pl. proliferációs aktivitással összefüggő laktát felszaporodás), amely kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztencia kialakulását eredményezheti. Eredményeink szerint a vizsgált HL sejtek jól hasznosítják a glutamint. Nem lymphoma, hanem más tumor sejtek esetében igazoltuk, hogy a rapamycin kezelés gátolhatja a glutaminszintáz expresszióját (ennek mechanizmusát is vizsgáltuk [158]) és igazoltuk, hogy expressziója fehérje szinten a rapamycin érzékeny KMH2 sejtvonalban csökkent. Eredményeink alapján az mTOR aktivitás a sejtek túlélését és proliferációját metabolikus hatásain keresztül is segítheti HL-ák esetében. Ennek praktikus következménye lehet a betegek kezelésében: a jól karakterizált mTOR aktivitás terápiás target lehet és újabb metabolikus targetek lehetőségére is felhívja figyelmet a rossz prognózisú, visszatérő HL-ákban.

6 Következtetések

Notch-1 és mTOR szignál aktivitás vizsgálatokkal kapcsolatos új megállapításaim:

- Elsőként írtuk le Hodgkin-lymphoma sejtek NOTCH1 aktivitásának jellemzése közben a sejtek konstitutív, ligand és gamma-szekretáz inhibitor független szignál aktivitását
- Megállapítottuk, hogy a Notch és mTOR jelátviteli útvonal hiperaktivitásában más daganatok esetében korábban már leírt, a két útvonal szabályozását érintő mutációk (*EGFR*, *AKT*, *FBXW7*, *NOTCH1*, *PIK3CA*, *PTEN* vagy *TP53*) nem játszanak szerepet.
- Igazoltuk a rapamycin kezelés (már a 2 óras is) mTORC1 aktivitás gátló hatását HL sejtekben, és ezzel párhuzamosan kimutattuk, hogy gamma-szekretáz inhibitorral tovább fokozható tumornövekedés gátló és apoptózis indukáló hatás *in vitro* és *in vivo* is.
- HL sejtvonala modellek mTOR komplex aktivitásának karakterizálása során megállapítottuk, hogy a sejtvonalak mTORC1/C2 aktivitás különbségei korrelálnak a sejtvonalak mTORC1 gátló érzékenységgel, illetve, hogy a magas C2 komplex aktivitású HL sejtvonala esetében a kettős C1 és C2 gátló vagy duál inhibitorok hatékony tumornövekedés gátló szerek lehetnek.

HL sejtek mTOR aktivitás változásaival és azok metabolikus hatásaival kapcsolatos vizsgálataim megállapításai:

- HL sejtvonala metabolikus aktivitásának vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy az *in vitro* HL sejtvonalaikat intenzív glikolízis és jól működő mitokondrium jellemzi, ugyanakkor glikolitikus aktivitás mértékében egyedi különbségeket figyeltünk meg. Párhuzamosan megfigyeltük a rapamycin és duál inhibitor kezeléseket, a sejtek érzékenységétől függő anyagcsere változást okozó hatásait a sejtek intracelluláris metabolit koncentrációjának vizsgálata segítségével.

7 Összefoglalás

A daganatbiológiai kutatásokban egyre nagyobb jelentőséget kapnak a sejtes jelátviteli hálózatok szabályozási zavarai. A PI3K/AKT/mTOR jelút hiperaktivitását, már korábban leírtuk humán Hodgkin lymphoma (HL) biopsziás minták immunhisztokémiai (IHC) vizsgálata segítségével, a kimutatott fokozott mTOR aktivitás háttere – mely akár különböző szabályozási szinten (gén és fehérje expresszió vagy sejten belüli és mikrokörnyezeti változások) is bekövetkezhet – ebben a haematológiai daganattípusban még kevésbé ismert.

Munkámban a haematológiai sejtek differenciációja és így daganatbiológiai jelentősége szempontjából is fontos Notch szignál aktivitását és az mTOR aktivitás változás kapcsolatát vizsgáltuk HL sejtekben. mTORC1/C2 komplex arányait, Notch szignál és anyagcsere aktivitását karakterizáltuk és vizsgáltuk a két útvonalat gátló szerek biológiai hatását.

Vizsgálataink szerint a HL sejtekre a fokozott mTOR aktivitás mellett, a NOTCH1 szignál konstitutív aktivitása is jellemző. Kimutattuk, hogy az mTOR és a Notch szignál hiperaktivitása, valamint a gamma-szekretáz inhibitor rezisztencia hátterében nem az útvonal aktivitását befolyásoló mutációk (*PIK3CA*, *PTEN*, *AKT*, *NOTCH1*, *FBXW7* stb.) állnak. Azt tapasztaltuk, hogy az aktivált NOTCH1 transzkripciót aktiváló hatását gátló, SAHM1 kezelés, valamint az mTORC1 gátló, rapamycin proliferációgátló és/vagy apoptózist indukáló hatású a vizsgált HL sejtekben. Eredményeink felhívják a figyelmet arra, hogy az mTOR gátlószereknek potenciális szerepe lehet a rossz prognózisú HL-ák és olyan daganatok esetében is, ahol a Notch szignál aktivitás magas, de a hagyományos Notch aktivitás gátlók nem hatnak. A különböző mTOR komplexaránya és az mTOR inhibitor kezelések hatásvizsgálata alapján kimutattuk, hogy meghatározásuk fontos lesz a különböző gátlószer kezelések előtt. Eredményeink szerint a HL sejtek mTORI érzékenysége függ a C2 komplex jelenlététől.

A HL sejtek anyagcsere változással kapcsolatos eredmények alapján a sejtek mTOR aktivitás változása, az anyagcsere változásokhoz is hozzájárulnak. A HL sejteket az intenzív glikolitikus aktivitás mellett jelentős mitokondriális aktivitása is jellemzi, és mTORI-ok hatására a glikolízis és a glutaminolízis intenzitása is csökken. Ezeknek a változásoknak, és a sejtek metabolikus alkalmazkodó képességének megismerése segíthet olyan, az mTOR-hoz hasonló metabolikus terápiás célpontok azonosításában, amelyek a

jövőben felhasználhatóak lehetnek akár a kialakuló rezisztencia mechanizmusok megelőzésében is.

Vizsgálataim segíthetik a PI3K/AKT/mTOR jelút szabályozási zavarok hátterének megértését, a jelenlegi mTOR és Notch gátlószerekkel zajló fázis vizsgálatok eredményeinek értékelését, illetve támpotokat adhatnak a célzott terápiás kezelések fejlesztéséhez, a rezisztencia mechanizmusok megértéséhez és új alternatív kezelési megoldások kialakításához.

8 Summary

Data about dysregulated signalling network and genetic dysfunction of different proteins have great interest in tumour biology. The hyperactivity of PI3K/AKT/mTOR pathway in HL biopsy samples was described in our previous study by immunohistochemistry staining, however, the background of increased mTOR activity at different regulatory levels (gene and protein expression levels or extra- and intracellular changes) has been less understood in the studied haematological malignance.

In this work, the Notch and mTOR signal activity and their crosstalk were investigated in HL cell lines, which are important in case of haematological cell differentiation and could promote tumour biology research. We characterised the ratio of mTORC1/C2 complexes, the activity of both Notch signal and altered metabolism; moreover, we studied the biological effects of inhibitors in these two pathways. Based on our results, the HL cells have characteristic constitutive NOTCH1 signal activity beside their high mTOR activity. Our results suggest that mutations, which influence Notch and mTOR signals (*PIK3CA*, *PTEN*, *AKT*, *NOTCH1*, *FBXW7* etc.), are not found in the background of gamma-secretase inhibitor resistance and hyperactivity of Notch and mTOR signals. We found that SAHM1 (the inhibitor of NOTCH1 transcription activity) and rapamycin (mTORC1 inhibitor) could reduce proliferation and induce apoptosis in HL cell lines. Our *in vitro* and *in vivo* results draw attention to the potential role of mTOR inhibitors not only in HL patients with poor prognosis, but in other tumours, as well in cases where the conventional Notch therapy has no effects. We determined the importance of mTORC1/C2 ratio before applying different inhibitor treatments. According to our results, the mTOR inhibitor sensitivity of HL cells depends on the expression of mTORC2.

Our experiments on HL cell metabolism show that the alteration of mTOR activity can induce metabolic changes. We observed that beside the intensive glycolysis, significant mitochondrial activity is characteristic for the studied HL cells. Moreover, the intensity of glycolysis and glutaminolysis were decreased by mTOR inhibitor. Understanding these metabolic changes or the cellular adaptability can help to identify other metabolic targets, similar to mTOR inhibitors in different tumour types in the future.

The presented results can help to understand certain aspects of dysregulation of PI3K/AKT/mTOR pathway. Moreover, it could help to evaluate the results of the ongoing

clinical mTOR and Notch inhibitor trials and to understand resistance mechanism in different tumour tissues and could promote targeted therapy and new alternative treatment developments, as well.

9 Irodalomjegyzék

1. Saxton, R.A.D.M. Sabatini. (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 1692: p. 361-371.
2. Wagle, N., B.C. Grabiner, E.M. Van Allen, E. Hodis, S. Jacobus, J.G. Supko, M. Stewart, T.K. Choueiri, L. Gandhi, J.M. Cleary, A.A. Elfiky, M.E. Taplin, E.C. Stack, S. Signoretti, M. Loda, G.I. Shapiro, D.M. Sabatini, E.S. Lander, S.B. Gabriel, P.W. Kantoff, L.A. GarrawayJ.E. Rosenberg. (2014) Activating mTOR mutations in a patient with an extraordinary response on a phase I trial of everolimus and pazopanib. *Cancer Discov*, 45: p. 546-553.
3. Vezina, C., A. KudelskiS.N. Sehgal. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*, 2810: p. 721-726.
4. Yip, C.K., K. Murata, T. Walz, D.M. SabatiniS.A. Kang. (2010) Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Mol Cell*, 385: p. 768-774.
5. Laplante, M.D.M. Sabatini. (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 1492: p. 274-293.
6. Sabatini, D.M. (2006) mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer*, 69: p. 729-734.
7. Pearce, L.R., X. Huang, J. Boudeau, R. Pawlowski, S. Wullschleger, M. Deak, A.F. Ibrahim, R. Gourlay, M.A. MagnusonD.R. Alessi. (2007) Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J*, 4053: p. 513-522.
8. Polivka, J., Jr.F. Janku. (2014) Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacol Ther*, 1422: p. 164-175.
9. Lee, D.F., H.P. Kuo, C.T. Chen, J.M. Hsu, C.K. Chou, Y. Wei, H.L. Sun, L.Y. Li, B. Ping, W.C. Huang, X. He, J.Y. Hung, C.C. Lai, Q. Ding, J.L. Su, J.Y. Yang, A.A. Sahin, G.N. Hortobagyi, F.J. Tsai, C.H. TsaiM.C. Hung. (2007) IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell*, 1303: p. 440-455.

10. DeYoung, M.P., P. Horak, A. Sofer, D. Sgroi, L.W. Ellisen. (2008) Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev*, 22: p. 239-251.
11. Kim, J., M. Kundu, B. Viollet, K.L. Guan. (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13: p. 132-141.
12. Inoki, K., H. Ouyang, T. Zhu, C. Lindvall, Y. Wang, X. Zhang, Q. Yang, C. Bennett, Y. Harada, K. Stankunas, C.Y. Wang, X. He, O.A. MacDougald, M. You, B.O. Williams, K.L. Guan. (2006) TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell*, 126: p. 955-968.
13. Lesma, E., V. Grande, S. Ancona, S. Carelli, A.M. Di Giulio, A. Gorio. (2008) Anti-EGFR antibody efficiently and specifically inhibits human TSC2-/- smooth muscle cell proliferation. Possible treatment options for TSC and LAM. *PLoS One*, 3: p. e3558.
14. Panchaud, N., M.P. Peli, G. De Virgilio. (2013) Amino acid deprivation inhibits TORC1 through a GTPase-activating protein complex for the Rag family GTPase Gtr1. *Sci Signal*, 6: p. ra42.
15. Puertollano, R. (2014) mTOR and lysosome regulation. *F1000Prime Rep*, 6: p. 52.
16. Zoncu, R., A. Efeyan, D.M. Sabatini. (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12: p. 21-35.
17. Zinzalla, V., D. Stracka, W. Oppliger, M.N. Hall. (2011) Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell*, 144: p. 757-768.
18. Ma, X.M.J. Blenis. (2009) Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: p. 307-318.
19. Pardo, O.E.M.J. Seckl. (2013) S6K2: The Neglected S6 Kinase Family Member. *Front Oncol*, 3: p. 191.
20. Bruning, A., M. Rahmeh, K. Friese. (2013) Nelfinavir and bortezomib inhibit mTOR activity via ATF4-mediated sestrin-2 regulation. *Mol Oncol*, 6: p. 1012-1018.

21. Shiratsuki, S., T. Hara, Y. Munakata, K. Shirasuna, T. Kuwayama, H. Iwata. (2016) Low oxygen level increases proliferation and metabolic changes in bovine granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*, 437: p. 75-85.
22. Aoki, M.T. Fujishita. (2017) Oncogenic Roles of the PI3K/AKT/mTOR Axis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 407: p. 153-189.
23. Cornu, M., V. Albert, M.N. Hall. (2013) mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 231: p. 53-62.
24. Martina, J.A., Y. Chen, M. Gucek, R. Puertollano. (2012) MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy*, 86: p. 903-914.
25. Zhao, J., B. Zhai, S.P. Gygi, A.L. Goldberg. (2015) mTOR inhibition activates overall protein degradation by the ubiquitin proteasome system as well as by autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 11252: p. 15790-15797.
26. Yang, G., D.S. Murashige, S.J. Humphrey, D.E. James. (2015) A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Rep*, 126: p. 937-943.
27. Sarbassov, D.D., D.A. Guertin, S.M. Ali, D.M. Sabatini. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 3075712: p. 1098-1101.
28. Jacinto, E., R. Loewith, A. Schmidt, S. Lin, M.A. Ruegg, A. Hall, M.N. Hall. (2004) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*, 611: p. 1122-1128.
29. Liko, D.M.N. Hall. (2015) mTOR in health and in sickness. *J Mol Med (Berl)*, 9310: p. 1061-1073.
30. Um, S.H., F. Frigerio, M. Watanabe, F. Picard, M. Joaquin, M. Sticker, S. Fumagalli, P.R. Allegrini, S.C. Kozma, J. Auwerx, G. Thomas. (2004) Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*, 4317005: p. 200-205.
31. Johnson, S.C., P.S. Rabinovitch, M. Kaeberlein. (2013) mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature*, 4937432: p. 338-345.

32. Das, A., F.N. Salloum, D. Durrant, R. OckailiR.C. Kukreja. (2012) Rapamycin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through JAK2-STAT3 signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol*, 536: p. 858-869.
33. Oddo, S. (2012) The role of mTOR signaling in Alzheimer disease. *Front Biosci (Schol Ed)*, 4: p. 941-952.
34. Floto, R.A., S. Sarkar, E.O. Perlstein, B. Kampmann, S.L. SchreiberD.C. Rubinsztein. (2007) Small molecule enhancers of rapamycin-induced TOR inhibition promote autophagy, reduce toxicity in Huntington's disease models and enhance killing of mycobacteria by macrophages. *Autophagy*, 36: p. 620-622.
35. Menzies, F.M., A. FlemingD.C. Rubinsztein. (2015) Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, 166: p. 345-357.
36. Vellai, T., K. Takacs-Vellai, Y. Zhang, A.L. Kovacs, L. OroszF. Muller. (2003) Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature*, 4266967: p. 620.
37. Kapahi, P., B.M. Zid, T. Harper, D. Koslover, V. SapinS. Benzer. (2004) Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr Biol*, 1410: p. 885-890.
38. Wu, J.J., J. Liu, E.B. Chen, J.J. Wang, L. Cao, N. Narayan, M.M. Fergusson, Rovira, II, M. Allen, D.A. Springer, C.U. Lago, S. Zhang, W. DuBois, T. Ward, R. deCabo, O. Gavrilova, B. MockT. Finkel. (2013) Increased mammalian lifespan and a segmental and tissue-specific slowing of aging after genetic reduction of mTOR expression. *Cell Rep*, 45: p. 913-920.
39. Hanahan, D.R.A. Weinberg. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 1445: p. 646-674.
40. Porta, C., C. PaglinoA. Mosca. (2014) Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol*, 4: p. 64.
41. Sarbassov, D.D., S.M. Ali, S. Sengupta, J.H. Sheen, P.P. Hsu, A.F. Bagley, A.L. MarkhardD.M. Sabatini. (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*, 222: p. 159-168.
42. Populo, H., J.M. LopesP. Soares. (2012) The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci*, 132: p. 1886-1918.

43. Decker, T., S. Hipp, I. Ringshausen, C. Bogner, M. Oelsner, F. Schneller, C. Peschel. (2003) Rapamycin-induced G1 arrest in cycling B-CLL cells is associated with reduced expression of cyclin D3, cyclin E, cyclin A, and survivin. *Blood*, 101: p. 278-285.
44. Hipp, S., I. Ringshausen, M. Oelsner, C. Bogner, C. Peschel, T. Decker. (2005) Inhibition of the mammalian target of rapamycin and the induction of cell cycle arrest in mantle cell lymphoma cells. *Haematologica*, 90: p. 1433-1434.
45. Khokhar, N.Z., J.K. Altman, L.C. Plataniotis. (2011) Emerging roles for mammalian target of rapamycin inhibitors in the treatment of solid tumors and hematological malignancies. *Curr Opin Oncol*, 23: p. 578-586.
46. Witzig, T.E., C.B. Reeder, B.R. LaPlant, M. Gupta, P.B. Johnston, I.N. Micallef, L.F. Porrata, S.M. Ansell, J.P. Colgan, E.D. Jacobsen, I.M. Ghobrial, T.M. Habermann. (2011) A phase II trial of the oral mTOR inhibitor everolimus in relapsed aggressive lymphoma. *Leukemia*, 25: p. 341-347.
47. Kang, S.A., M.E. Pacold, C.L. Cervantes, D. Lim, H.J. Lou, K. Ottina, N.S. Gray, B.E. Turk, M.B. Yaffe, D.M. Sabatini. (2013) mTORC1 phosphorylation sites encode their sensitivity to starvation and rapamycin. *Science*, 341: p. 1236-1244.
48. Efeyan, A.D.M. Sabatini. (2010) mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Curr Opin Cell Biol*, 22: p. 169-176.
49. Hsieh, A.C., M. Costa, O. Zollo, C. Davis, M.E. Feldman, J.R. Testa, O. Meyuhas, K.M. Shokat, D. Ruggiero. (2010) Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E. *Cancer Cell*, 17: p. 249-261.
50. Hsieh, A.C., Y. Liu, M.P. Edlind, N.T. Ingolia, M.R. Janes, A. Sher, E.Y. Shi, C.R. Stumpf, C. Christensen, M.J. Bonham, S. Wang, P. Ren, M. Martin, K. Jessen, M.E. Feldman, J.S. Weissman, K.M. Shokat, C. Rommel, D. Ruggiero. (2012) The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature*, 485: p. 55-61.
51. Ingels, A., H. Zhao, A.E. Thong, M. Saar, M.P. Valta, R. Nolley, J. Santos, D.M. Peehl. (2014) Preclinical trial of a new dual mTOR inhibitor, MLN0128, using renal cell carcinoma tumorgrafts. *Int J Cancer*, 134: p. 2322-2329.

52. Rodrik-Outmezguine, V.S., M. Okaniwa, Z. Yao, C.J. Novotny, C. McWhirter, A. Banaji, H. Won, W. Wong, M. Berger, E. de Stanchina, D.G. Barratt, S. Cosulich, T. Klinowska, N. Rosen, K.M. Shokat. (2016) Overcoming mTOR resistance mutations with a new-generation mTOR inhibitor. *Nature*, 5347606: p. 272-276.
53. Thoreen, C.C., S.A. Kang, J.W. Chang, Q. Liu, J. Zhang, Y. Gao, L.J. Reichling, T. Sim, D.M. Sabatini, N.S. Gray. (2009) An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem*, 28412: p. 8023-8032.
54. Liu, Q., C. Xu, S. Kirubakaran, X. Zhang, W. Hur, Y. Liu, N.P. Kwiatkowski, J. Wang, K.D. Westover, P. Gao, D. Ercan, M. Niepel, C.C. Thoreen, S.A. Kang, M.P. Patricelli, Y. Wang, T. Tupper, A. Altabef, H. Kawamura, K.D. Held, D.M. Chou, S.J. Elledge, P.A. Janne, K.K. Wong, D.M. Sabatini, N.S. Gray. (2013) Characterization of Torin2, an ATP-competitive inhibitor of mTOR, ATM, and ATR. *Cancer Res*, 738: p. 2574-2586.
55. Chresta, C.M., B.R. Davies, I. Hickson, T. Harding, S. Cosulich, S.E. Critchlow, J.P. Vincent, R. Ellston, D. Jones, P. Sini, D. James, Z. Howard, P. Dudley, G. Hughes, L. Smith, S. Maguire, M. Hummersone, K. Malagu, K. Menear, R. Jenkins, M. Jacobsen, G.C. Smith, S. Guichard, M. Pass. (2010) AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Res*, 701: p. 288-298.
56. Pike, K.G., K. Malagu, M.G. Hummersone, K.A. Menear, H.M. Duggan, S. Gomez, N.M. Martin, L. Ruston, S.L. Pass, M. Pass. (2013) Optimization of potent and selective dual mTORC1 and mTORC2 inhibitors: the discovery of AZD8055 and AZD2014. *Bioorg Med Chem Lett*, 235: p. 1212-1216.
57. Raynaud, F.I., S.A. Eccles, S. Patel, S. Alix, G. Box, I. Chuckowree, A. Folkes, S. Gowan, A. De Haven Brandon, F. Di Stefano, A. Hayes, A.T. Henley, L. Lensun, G. Pergl-Wilson, A. Robson, N. Saghir, A. Zhyvoloup, E. McDonald, P. Sheldrake, S. Shuttleworth, M. Valenti, N.C. Wan, P.A. Clarke, P. Workman. (2009) Biological properties of potent inhibitors of class I phosphatidylinositide

- 3-kinases: from PI-103 through PI-540, PI-620 to the oral agent GDC-0941. *Mol Cancer Ther*, 87: p. 1725-1738.
58. Dienstmann, R., J. Rodon, V. Serra, J. Tabernero. (2014) Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. *Mol Cancer Ther*, 135: p. 1021-1031.
 59. Liu, T.J., D. Koul, T. LaFortune, N. Tiao, R.J. Shen, S.M. Maira, C. Garcia-Echeverria, W.K. Yung. (2009) NVP-BEZ235, a novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor, elicits multifaceted antitumor activities in human gliomas. *Mol Cancer Ther*, 88: p. 2204-2210.
 60. Bendell, J.C., C. Kurkjian, J.R. Infante, T.M. Bauer, H.A. Burris, 3rd, F.A. Greco, K.C. Shih, D.S. Thompson, C.M. Lane, L.H. Finney, S.F. Jones. (2015) A phase 1 study of the sachet formulation of the oral dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 given twice daily (BID) in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*, 332: p. 463-471.
 61. Kranz, B., A.M. Wingen, U. Vester, J. König, P.F. Hoyer. (2013) Long-term side effects of treatment with mTOR inhibitors in children after renal transplantation. *Pediatr Nephrol*, 288: p. 1293-1298.
 62. Gan, B., E. Sahin, S. Jiang, A. Sanchez-Aguilera, K.L. Scott, L. Chin, D.A. Williams, D.J. Kwiatkowski, R.A. DePinho. (2008) mTORC1-dependent and -independent regulation of stem cell renewal, differentiation, and mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 10549: p. 19384-19389.
 63. Martelli, A.M., C. Evangelisti, F. Chiarini, J.A. McCubrey. (2010) The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients. *Oncotarget*, 12: p. 89-103.
 64. Zeng, Z., D. Sarbassov, I.J. Samudio, K.W. Yee, M.F. Munsell, C. Ellen Jackson, F.J. Giles, D.M. Sabatini, M. Andreeff, M. Konopleva. (2007) Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. *Blood*, 1098: p. 3509-3512.
 65. Pui, C.H., L.L. Robison, A.T. Look. (2008) Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 3719617: p. 1030-1043.
 66. Nemes, K., A. Sebestyén, A. Mark, M. Hajdu, I. Kenessey, T. Sticz, E. Nagy, G. Barna, Z. Varadi, G. Kovacs, L. Kopper, M. Csoka. (2013) Mammalian target of

- rapamycin (mTOR) activity dependent phospho-protein expression in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *PLoS One*, 84: p. e59335.
67. Baohua, Y., Z. Xiaoyan, Z. Tiecheng, Q. TaoS. Daren. (2008) Mutations of the PIK3CA gene in diffuse large B cell lymphoma. *Diagn Mol Pathol*, 173: p. 159-165.
 68. Sebestyen, A., T.B. Sticz, A. Mark, M. Hajdu, B. Timar, K. Nemes, N. Nagy, Z. VaradiL. Kopper. (2012) Activity and complexes of mTOR in diffuse large B-cell lymphomas--a tissue microarray study. *Mod Pathol*, 2512: p. 1623-1628.
 69. Choi, M.Y.T.J. Kipps. (2012) Inhibitors of B-cell receptor signaling for patients with B-cell malignancies. *Cancer J*, 185: p. 404-410.
 70. Jellusova, J.R.C. Rickert. (2016) The PI3K pathway in B cell metabolism. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 515: p. 359-378.
 71. Pfeifer, M., M. Grau, D. Lenze, S.S. Wenzel, A. Wolf, B. Wollert-Wulf, K. Dietze, H. Nogai, B. Storek, H. Madle, B. Dorken, M. Janz, S. Dirnhofer, P. Lenz, M. Hummel, A. TzankovG. Lenz. (2013) PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 11030: p. 12420-12425.
 72. Mark, A., M. Hajdu, Z. Varadi, T.B. Sticz, N. Nagy, J. Csomor, L. Berczi, V. Varga, M. Csoka, L. KopperA. Sebestyen. (2013) Characteristic mTOR activity in Hodgkin-lymphomas offers a potential therapeutic target in high risk disease--a combined tissue microarray, in vitro and in vivo study. *BMC Cancer*, 13: p. 250.
 73. Swerdlow, S.H., E. Campo, S.A. Pileri, N.L. Harris, H. Stein, R. Siebert, R. Advani, M. Ghielmini, G.A. Salles, A.D. ZelenetzE.S. Jaffe. (2016) The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 12720: p. 2375-2390.
 74. Schwering, I., A. Brauninger, U. Klein, B. Jungnickel, M. Tinguely, V. Diehl, M.L. Hansmann, R. Dalla-Favera, K. RajewskyR. Kuppers. (2003) Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, 1014: p. 1505-1512.
 75. Yared, J.A., N. Hardy, Z. Singh, S. Hajj, A.Z. Badros, M. Kocoglu, S. Yanovich, E.A. Sausville, C. Ujjani, K. Rühle, C. Goecke, M. LandauA.P. Rapoport. (2016) Major clinical response to nivolumab in relapsed/refractory Hodgkin lymphoma

- after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 516: p. 850-852.
76. Wang, X.S.Y. Sun. (2009) Enhancing mTOR-targeted cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 1310: p. 1193-1203.
 77. Johnston, P.B., D.J. Inwards, J.P. Colgan, B.R. Laplant, B.F. Kabat, T.M. Habermann, I.N. Micallef, L.F. Porrata, S.M. Ansell, C.B. Reeder, V. RoyT.E. Witzig. (2010) A Phase II trial of the oral mTOR inhibitor everolimus in relapsed Hodgkin lymphoma. *Am J Hematol*, 855: p. 320-324.
 78. Thomas E. Witzig . , K.T., Luigi Rigacci, Tongyu Lin, Takashi Ikeda, Anna Vanazzi, Masayuki Hino, Yuankai Shi, Jiri Mayer, Luciano J Costa, Carlos DANIEL Bermudez, Jun Zhu, David Belada, Kamal Bouabdallah, Joseph Gergi Kattan, Cassandra Wu, Jenna Fan, Anne-Laure Louveau, Maurizio Voi, Franco Cavalli. (2016) PILLAR-2: A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III study of adjuvant everolimus (EVE) in patients (pts) with poor-risk diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Journal of Clinical Oncology* 34no. 15_suppl p. 7506-7506.
 79. Calimeri, T.A.J.M. Ferreri. (2017) m-TOR inhibitors and their potential role in haematological malignancies. *Br J Haematol*, 1775: p. 684-702.
 80. Daver, N., Y. Boumber, H. Kantarjian, F. Ravandi, J. Cortes, M.E. Rytting, J.D. Kawedia, J. Basnett, K.S. Culotta, Z. Zeng, H. Lu, M.A. Richie, R. Garris, L. Xiao, W. Liu, K.A. Baggerly, E. Jabbour, S. O'Brien, J. Burger, L.J. Bendall, D. ThomasM. Konopleva. (2015) A Phase I/II Study of the mTOR Inhibitor Everolimus in Combination with HyperCVAD Chemotherapy in Patients with Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Cancer Res*, 2112: p. 2704-2714.
 81. Ben Markman , V.S., and Josep Tabernero, *mTOR Inhibition for Cancer Therapy: Past, Present and Future*. Vol. mTOR Inhibition Beyond Rapalogs. 2016: Springer. 251-275.
 82. Yuan, H.X., R.C. RussellK.L. Guan. (2013) Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy. *Autophagy*, 912: p. 1983-1995.

83. Samuels, Y., Z. Wang, A. Bardelli, N. Silliman, J. Ptak, S. Szabo, H. Yan, A. Gazdar, S.M. Powell, G.J. Riggins, J.K. Willson, S. Markowitz, K.W. Kinzler, B. Vogelstein V.E. Velculescu. (2004) High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*, 304:5670: p. 554.
84. Song, M.S., L. Salmena P.P. Pandolfi. (2012) The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13: p. 283-296.
85. Prizant, H.S.R. Hammes. (2016) Minireview: Lymphangioliomyomatosis (LAM): The "Other" Steroid-Sensitive Cancer. *Endocrinology*, 157: p. 3374-3383.
86. Carpten, J.D., A.L. Faber, C. Horn, G.P. Donoho, S.L. Briggs, C.M. Robbins, G. Hostetter, S. Boguslawski, T.Y. Moses, S. Savage, M. Uhlik, A. Lin, J. Du, Y.W. Qian, D.J. Zeckner, G. Tucker-Kellogg, J. Touchman, K. Patel, S. Mousset, M. Bittner, R. Schevitz, M.H. Lai, K.L. Blanchard J.E. Thomas. (2007) A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*, 448:7152: p. 439-444.
87. Davies, M.A. (2011) Regulation, role, and targeting of Akt in cancer. *J Clin Oncol*, 29:35: p. 4715-4717.
88. Massarelli, E., F. Andre, D.D. Liu, J.J. Lee, M. Wolf, A. Fandi, J. Ochs, T. Le Chevalier, F. Fossella R.S. Herbst. (2003) A retrospective analysis of the outcome of patients who have received two prior chemotherapy regimens including platinum and docetaxel for recurrent non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 39:1: p. 55-61.
89. Cheng, H., Y. Zou, J.S. Ross, K. Wang, X. Liu, B. Halmos, S.M. Ali, H. Liu, A. Verma, C. Montagna, A. Chachoua, S. Goel, E.L. Schwartz, C. Zhu, J. Shan, Y. Yu, K. Gritsman, R. Yelensky, D. Lipson, G. Otto, M. Hawryluk, P.J. Stephens, V.A. Miller, B. Piperdi R. Perez-Soler. (2015) RICTOR Amplification Defines a Novel Subset of Patients with Lung Cancer Who May Benefit from Treatment with mTORC1/2 Inhibitors. *Cancer Discov*, 5:12: p. 1262-1270.
90. Laugier, F., A. Finet-Benyair, J. Andre, P.S. Rachakonda, R. Kumar, A. Bensussan N. Dumaz. (2015) RICTOR involvement in the PI3K/AKT pathway regulation in melanocytes and melanoma. *Oncotarget*, 6:29: p. 28120-28131.

91. Ghosh, A.P., C.B. Marshall, T. Coric, E.H. Shim, R. Kirkman, M.E. Ballestas, M. Ikura, M.A. Bjornsti S. Sudarshan. (2015) Point mutations of the mTOR-RHEB pathway in renal cell carcinoma. *Oncotarget*, 620: p. 17895-17910.
92. Cao, J., M.H. Ge Z.Q. Ling. (2016) Fbxw7 Tumor Suppressor: A Vital Regulator Contributes to Human Tumorigenesis. *Medicine (Baltimore)*, 957: p. e2496.
93. Radtke, F., H.R. MacDonald F. Tacchini-Cottier. (2013) Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. *Nat Rev Immunol*, 136: p. 427-437.
94. Joutel, A., C. Corpechot, A. Ducros, K. Vahedi, H. Chabriat, P. Mouton, S. Alamowitch, V. Domenga, M. Cecillion, E. Marechal, J. Maciazek, C. Vayssiere, C. Cruaud, E.A. Cabanis, M.M. Ruchoux, J. Weissenbach, J.F. Bach, M.G. Bousser E. Tournier-Lasserre. (1996) Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature*, 3836602: p. 707-710.
95. Iso, T., Y. Hamamori L. Kedes. (2003) Notch signaling in vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 234: p. 543-553.
96. Kopan, R.M.X. Ilagan. (2009) The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, 1372: p. 216-233.
97. Shi, S., M. Stahl, L. Lu P. Stanley. (2005) Canonical Notch signaling is dispensable for early cell fate specifications in mammals. *Mol Cell Biol*, 2521: p. 9503-9508.
98. Ellisen, L.W., J. Bird, D.C. West, A.L. Soreng, T.C. Reynolds, S.D. Smith J. Sklar. (1991) TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*, 664: p. 649-661.
99. Ayaz, F.B.A. Osborne. (2014) Non-canonical notch signaling in cancer and immunity. *Front Oncol*, 4: p. 345.
100. Weng, A.P., A.A. Ferrando, W. Lee, J.P.t. Morris, L.B. Silverman, C. Sanchez-Irizarry, S.C. Blacklow, A.T. Look J.C. Aster. (2004) Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*, 3065694: p. 269-271.
101. Brauningner, A., R. Schmitz, D. Bechtel, C. Renne, M.L. Hansmann R. Kuppers. (2006) Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer*, 1188: p. 1853-1861.

102. Purow, B. (2012) Notch inhibition as a promising new approach to cancer therapy. *Adv Exp Med Biol*, 727: p. 305-319.
103. Palomero, T., M.L. Sulis, M. Cortina, P.J. Real, K. Barnes, M. Ciofani, E. Caparros, J. Buteau, K. Brown, S.L. Perkins, G. Bhagat, A.M. Agarwal, G. Basso, M. Castillo, S. Nagase, C. Cordon-Cardo, R. Parsons, J.C. Zuniga-Pflucker, M. DominguezA.A. Ferrando. (2007) Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat Med*, 1310: p. 1203-1210.
104. Larson Gedman, A., Q. Chen, S. Kugel Desmoulin, Y. Ge, K. LaFiura, C.L. Haska, C. Cherian, M. Devidas, S.B. Linda, J.W. TaubL.H. Matherly. (2009) The impact of NOTCH1, FBW7 and PTEN mutations on prognosis and downstream signaling in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Leukemia*, 238: p. 1417-1425.
105. Chan, S.M., A.P. Weng, R. Tibshirani, J.C. AsterP.J. Utz. (2007) Notch signals positively regulate activity of the mTOR pathway in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1101: p. 278-286.
106. Sade, H., S. KrishnaA. Sarin. (2004) The anti-apoptotic effect of Notch-1 requires p56lck-dependent, Akt/PKB-mediated signaling in T cells. *J Biol Chem*, 2794: p. 2937-2944.
107. Bonnet, M., M. Loosveld, B. Montpellier, J.M. Navarro, B. Quilichini, C. Picard, J. Di Cristofaro, C. Bagnis, C. Fossat, L. Hernandez, E. Mamessier, S. Roulland, E. Morgado, C. Formisano-Treziny, W.A. Dik, A.W. Langerak, T. Prebet, N. Vey, G. Michel, J. Gabert, J. Soulier, E.A. Macintyre, V. Asnafi, D. Payet-BornetB. Nadel. (2011) Posttranscriptional deregulation of MYC via PTEN constitutes a major alternative pathway of MYC activation in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 11724: p. 6650-6659.
108. Thoreen, C.C., L. Chantranupong, H.R. Keys, T. Wang, N.S. GrayD.M. Sabatini. (2012) A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature*, 4857396: p. 109-113.
109. Duvel, K., J.L. Yecies, S. Menon, P. Raman, A.I. Lipovsky, A.L. Souza, E. Triantafellow, Q. Ma, R. Gorski, S. Cleaver, M.G. Vander Heiden, J.P. MacKeigan, P.M. Finan, C.B. Clish, L.O. MurphyB.D. Manning. (2010)

- Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*, 392: p. 171-183.
110. Peterson, T.R., S.S. Sengupta, T.E. Harris, A.E. Carmack, S.A. Kang, E. Balderas, D.A. Guertin, K.L. Madden, A.E. Carpenter, B.N. FinckD.M. Sabatini. (2011) mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*, 1463: p. 408-420.
 111. Jewell, J.L., Y.C. Kim, R.C. Russell, F.X. Yu, H.W. Park, S.W. Plouffe, V.S. TagliabracciK.L. Guan. (2015) Metabolism. Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine. *Science*, 3476218: p. 194-198.
 112. Pearce, E.L.E.J. Pearce. (2013) Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity*, 384: p. 633-643.
 113. Biswas, S.K. (2015) Metabolic Reprogramming of Immune Cells in Cancer Progression. *Immunity*, 433: p. 435-449.
 114. Ward, P.S.C.B. Thompson. (2012) Signaling in control of cell growth and metabolism. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 47: p. a006783.
 115. Palmer, C.S., M. Ostrowski, B. Balderson, N. ChristianS.M. Crowe. (2015) Glucose metabolism regulates T cell activation, differentiation, and functions. *Front Immunol*, 6: p. 1.
 116. Caro-Maldonado, A., R. Wang, A.G. Nichols, M. Kuraoka, S. Milasta, L.D. Sun, A.L. Gavin, E.D. Abel, G. Kelsoe, D.R. GreenJ.C. Rathmell. (2014) Metabolic reprogramming is required for antibody production that is suppressed in anergic but exaggerated in chronically BAFF-exposed B cells. *J Immunol*, 1928: p. 3626-3636.
 117. Woodland, R.T., C.J. Fox, M.R. Schmidt, P.S. Hammerman, J.T. Opferman, S.J. Korsmeyer, D.M. HilbertC.B. Thompson. (2008) Multiple signaling pathways promote B lymphocyte stimulator dependent B-cell growth and survival. *Blood*, 1112: p. 750-760.
 118. Rathmell, J.C., C.J. Fox, D.R. Plas, P.S. Hammerman, R.M. CinalliC.B. Thompson. (2003) Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Mol Cell Biol*, 2320: p. 7315-7328.

119. Bhatt, A.P., S.R. Jacobs, A.J. Freemerman, L. Makowski, J.C. Rathmell, D.P. Dittmer, B. Damania. (2012) Dysregulation of fatty acid synthesis and glycolysis in non-Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 10929: p. 11818-11823.
120. Hartmann, S., C. Agostinelli, J. Diener, C. Doring, S. Fanti, P.L. Zinzani, A. Gallamini, L. Bergmann, S. Pileri, M.L. Hansmann. (2012) GLUT1 expression patterns in different Hodgkin lymphoma subtypes and progressively transformed germinal centers. *BMC Cancer*, 12: p. 586.
121. Birkenmeier, K., S. Drose, I. Wittig, R. Winkelmann, V. Kafer, C. Doring, S. Hartmann, T. Wenz, A.S. Reichert, U. Brandt, M.L. Hansmann. (2016) Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma are highly dependent on oxidative phosphorylation. *Int J Cancer*, 1389: p. 2231-2246.
122. Velez, J., N. Hail, Jr., M. Konopleva, Z. Zeng, K. Kojima, I. Samudio, M. Andreeff. (2013) Mitochondrial uncoupling and the reprogramming of intermediary metabolism in leukemia cells. *Front Oncol*, 3: p. 67.
123. Samudio, I., R. Harmancey, M. Fiegl, H. Kantarjian, M. Konopleva, B. Korchin, K. Kaluarachchi, W. Bornmann, S. Duvvuri, H. Taegtmeier, M. Andreeff. (2010) Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J Clin Invest*, 1201: p. 142-156.
124. Mirandola, L., L. Apicella, M. Colombo, Y. Yu, D.G. Berta, N. Platonova, E. Lazzari, M. Lancellotti, G. Bulfamante, E. Cobos, M. Chiriva-Internati, R. Chiaramonte. (2013) Anti-Notch treatment prevents multiple myeloma cells localization to the bone marrow via the chemokine system CXCR4/SDF-1. *Leukemia*, 277: p. 1558-1566.
125. Egervari, G., A. Mark, M. Hajdu, G. Barna, Z. Sapi, T. Krenacs, L. Kopper, A. Sebestyen. (2011) Mitotic lymphoma cells are characterized by high expression of phosphorylated ribosomal S6 protein. *Histochem Cell Biol*, 1354: p. 409-417.
126. Hajdu, M., L. Kopper, A. Sebestyen. (2010) Notch-regulation upon Dll4-stimulation of TGF β -induced apoptosis and gene expression in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Scand J Immunol*, 711: p. 29-37.
127. Mihalik, R., F. Uher, E.E. Pocsik, L. Berczi, M. Benczur, L. Kopper. (1996) Detection of Drug-induced Apoptosis by Flow Cytometry after Alkaline Extraction of Ethanol Fixed Cells. *Pathol Oncol Res*, 21-2: p. 78-83.

128. Kopper, L.G.G. Steel. (1975) The therapeutic response of three human tumor lines maintained in immune-suppressed mice. *Cancer Res*, 3510: p. 2704-2713.
129. Nosho, K., T. Kawasaki, M. Ohnishi, Y. Suemoto, G.J. Kirkner, D. Zepf, L. Yan, J.A. Longtine, C.S. Fuchs S. Ogino. (2008) PIK3CA mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations. *Neoplasia*, 106: p. 534-541.
130. Fredriksson, S. (2009) Visualizing signal transduction pathways by quantifying protein-protein interactions in native cells and tissue. *Nature Methods*, 6Advertising feature.
131. Szoboszlai, N., X. Guo, O. Ozohanics, J. Olah, A. Gomory, V.G. Mihucz, A. Jeney K. Vekey. (2014) Determination of energy metabolites in cancer cells by porous graphitic carbon liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry for the assessment of energy metabolism. *Anal Chim Acta*, 819: p. 108-115.
132. Koubaa, M., J.C. Cocuron, B. Thomasset A.P. Alonso. (2013) Highlighting the tricarboxylic acid cycle: liquid and gas chromatography-mass spectrometry analyses of (13)C-labeled organic acids. *Anal Biochem*, 4362: p. 151-159.
133. Khwaja, A. (2010) PI3K as a target for therapy in haematological malignancies. *Curr Top Microbiol Immunol*, 347: p. 169-188.
134. Lee, J.W., Y.H. Soung, S.Y. Kim, H.W. Lee, W.S. Park, S.W. Nam, S.H. Kim, J.Y. Lee, N.J. Yoo S.H. Lee. (2005) PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene*, 248: p. 1477-1480.
135. Oda, K., D. Stokoe, Y. Taketani F. McCormick. (2005) High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. *Cancer Res*, 6523: p. 10669-10673.
136. Peskoe, S.B., J.R. Barber, Q. Zheng, A.K. Meeker, A.M. De Marzo, E.A. Platz S.E. Lupold. (2017) Differential long-term stability of microRNAs and RNU6B snRNA in 12-20 year old archived formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *BMC Cancer*, 171: p. 32.
137. Stemke-Hale, K., A.M. Gonzalez-Angulo, A. Lluch, R.M. Neve, W.L. Kuo, M. Davies, M. Carey, Z. Hu, Y. Guan, A. Sahin, W.F. Symmans, L. Pusztai, L.K. Nolden, H. Horlings, K. Berns, M.C. Hung, M.J. van de Vijver, V. Valero, J.W. Gray, R. Bernards, G.B. Mills B.T. Hennessy. (2008) An integrative genomic and

- proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res*, 6815: p. 6084-6091.
138. Kuppens, R., A. Engert, M.L. Hansmann. (2012) Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest*, 12210: p. 3439-3447.
 139. Aldinucci, D., A. Gloghini, A. Pinto, R. De Filippi, A. Carbone. (2010) The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. *J Pathol*, 2213: p. 248-263.
 140. Duncan, A.W., F.M. Rattis, L.N. DiMascio, K.L. Congdon, G. Pazianos, C. Zhao, K. Yoon, J.M. Cook, K. Willert, N. Gaiano, T. Reya. (2005) Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol*, 63: p. 314-322.
 141. Hales, E.C., J.W. Taub, L.H. Matherly. (2014) New insights into Notch1 regulation of the PI3K-AKT-mTOR1 signaling axis: targeted therapy of gamma-secretase inhibitor resistant T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cell Signal*, 261: p. 149-161.
 142. Schwarzer, R., B. Dorken, F. Jundt. (2012) Notch is an essential upstream regulator of NF-kappaB and is relevant for survival of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Leukemia*, 264: p. 806-813.
 143. Suresh, S.A.E. Irvine. (2015) The NOTCH signaling pathway in normal and malignant blood cell production. *J Cell Commun Signal*, 91: p. 5-13.
 144. Jundt, F., I. Anagnostopoulos, R. Forster, S. Mathas, H. Stein, B. Dorken. (2002) Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood*, 999: p. 3398-3403.
 145. O'Neil, J., J. Grim, P. Strack, S. Rao, D. Tibbitts, C. Winter, J. Hardwick, M. Welcker, J.P. Meijerink, R. Pieters, G. Draetta, R. Sears, B.E. Clurman, A.T. Look. (2007) FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *J Exp Med*, 2048: p. 1813-1824.
 146. Andersen, P., H. Uosaki, L.T. Shen, J.C. Kwon. (2012) Non-canonical Notch signaling: emerging role and mechanism. *Trends Cell Biol*, 225: p. 257-265.
 147. Linke, F., M. Harenberg, M.M. Nietert, S. Zaunig, F. von Bonin, A. Arlt, M. Szczepanowski, H.A. Weich, S. Lutz, C. Dullin, P. Janovska, M. Krafcikova, L. Trantirek, P. Ovesna, W. Klapper, T. Beissbarth, F. Alves, V. Bryja, L. Trumper,

- J. WiltingD. Kube. (2017) Microenvironmental interactions between endothelial and lymphoma cells: a role for the canonical WNT pathway in Hodgkin lymphoma. *Leukemia*, 312: p. 361-372.
148. Mathur, R., L. Sehgal, F.K. Braun, Z. Berkova, J. Romaguerra, M. Wang, M.A. Rodriguez, L. Fayad, S.S. NeelapuF. Samaniego. (2015) Targeting Wnt pathway in mantle cell lymphoma-initiating cells. *J Hematol Oncol*, 8: p. 63.
149. Walker, M.P., C.M. Stopford, M. Cederlund, F. Fang, C. Jahn, A.D. Rabinowitz, D. Goldfarb, D.M. Graham, F. Yan, A.M. Deal, Y. Fedoriw, K.L. Richards, I.J. Davis, G. Weidinger, B. DamaniaM.B. Major. (2015) FOXP1 potentiates Wnt/beta-catenin signaling in diffuse large B cell lymphoma. *Sci Signal*, 8362: p. ra12.
150. Espinoza, I.L. Miele. (2013) Notch inhibitors for cancer treatment. *Pharmacol Ther*, 1392: p. 95-110.
151. Shepherd, C., L. Banerjee, C.W. Cheung, M.R. Mansour, S. Jenkinson, R.E. GaleA. Khwaja. (2013) PI3K/mTOR inhibition upregulates NOTCH-MYC signalling leading to an impaired cytotoxic response. *Leukemia*, 273: p. 650-660.
152. Colombo, M., L. Mirandola, N. Platonova, L. Apicella, A. Basile, A.J. Figueroa, E. Cobos, M. Chiriva-InternatiR. Chiaramonte. (2013) Notch-directed microenvironment reprogramming in myeloma: a single path to multiple outcomes. *Leukemia*, 275: p. 1009-1018.
153. Wander, S.A., D. Zhao, A.H. Besser, F. Hong, J. Wei, T.A. Ince, C. Milikowski, N.H. Bishopric, A.J. Minn, C.J. CreightonJ.M. Slingerland. (2013) PI3K/mTOR inhibition can impair tumor invasion and metastasis in vivo despite a lack of antiproliferative action in vitro: implications for targeted therapy. *Breast Cancer Res Treat*, 1382: p. 369-381.
154. Xing, X., L. Zhang, X. Wen, X. Wang, X. Cheng, H. Du, Y. Hu, L. Li, B. Dong, Z. LiJ. Ji. (2014) PP242 suppresses cell proliferation, metastasis, and angiogenesis of gastric cancer through inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Anticancer Drugs*, 2510: p. 1129-1140.
155. Muller, A., C. Zang, C. Chumduri, B. Dorken, P.T. DanielC.W. Scholz. (2013) Concurrent inhibition of PI3K and mTORC1/mTORC2 overcomes resistance to

- rapamycin induced apoptosis by down-regulation of Mcl-1 in mantle cell lymphoma. *Int J Cancer*, 1338: p. 1813-1824.
156. Sebestyén, A., A. Mark, M. Hajdu, N. Nagy, A. Molnár, G. Vegso, G. Barna, L. Kopper. (2015) Rapamycin can restore the negative regulatory function of transforming growth factor beta 1 in high grade lymphomas. *Cytokine*, 732: p. 219-224.
157. Jeney, A., Z. Hujber, N. Szoboszlai, A. Fullar, J. Olah, E. Pap, A. Mark, C. Kriston, J. Kralovanszky, I. Kovalszky, K. Vekey, A. Sebestyén. (2016) Characterisation of bioenergetic pathways and related regulators by multiple assays in human tumour cells. *Cancer Cell Int*, 16: p. 4.
158. Hujber, Z., G. Petovari, N. Szoboszlai, T. Danko, N. Nagy, C. Kriston, I. Krencz, S. Paku, O. Ozohanics, L. Drahos, A. Jeney, A. Sebestyén. (2017) Rapamycin (mTORC1 inhibitor) reduces the production of lactate and 2-hydroxyglutarate oncometabolites in IDH1 mutant fibrosarcoma cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 361: p. 74.
159. Lien, E.C., C.A. Lyssiotis, L.C. Cantley. (2016) Metabolic Reprogramming by the PI3K-Akt-mTOR Pathway in Cancer. *Recent Results Cancer Res*, 207: p. 39-72.
160. Broecker-Preuss, M., N. Becher-Boveleth, A. Bockisch, U. Duhren, S. Müller. (2017) Regulation of glucose uptake in lymphoma cell lines by c-MYC- and PI3K-dependent signaling pathways and impact of glycolytic pathways on cell viability. *J Transl Med*, 151: p. 158.
161. Schug, Z.T., B. Peck, D.T. Jones, Q. Zhang, S. Grosskurth, I.S. Alam, L.M. Goodwin, E. Smethurst, S. Mason, K. Blyth, L. McGarry, D. James, E. Shanks, G. Kalna, R.E. Saunders, M. Jiang, M. Howell, F. Lassailly, M.Z. Thin, B. Spencer-Dene, G. Stamp, N.J. van den Broek, G. Mackay, V. Bulusu, J.J. Kamphorst, S. Tardito, D. Strachan, A.L. Harris, E.O. Aboagye, S.E. Critchlow, M.J. Wakelam, A. Schulze, E. Gottlieb. (2015) Acetyl-CoA synthetase 2 promotes acetate utilization and maintains cancer cell growth under metabolic stress. *Cancer Cell*, 271: p. 57-71.

10 Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények

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.

Ágnes Márk, Melinda Hajdu, Zsófia Váradi, Tamás Béla Sticz, **Noémi Nagy**, Judit Csomor, Lajos Bercei, Viktória Varga, Mónika Csóka, László Kopper, Anna Sebestyén
BMC Cancer 2013, 13:250; 1-12 **IF: 3,319**

Growth inhibitory effect of rapamycin in Hodgkin-lymphoma cell lines characterized by constitutive NOTCH1 activation

Noémi Nagy, Melinda Hajdu, Ágnes Márk, Péter Attila Király, Mónika Tóth, Titanilla Dankó, Mónika Csóka, Anna Sebestyén

Tumor Biology, October 2016, Volume 37, Issue 10, pp 13695–13704 **IF: 3,650**

Rapamycin (mTORC1 inhibitor) reduces the production of lactate and 2-hydroxyglutarate oncometabolites in IDH1 mutant fibrosarcoma cells.

Zoltán Hujber, Gábor Petővári, Norbert Szoboszlai, Titanilla Dankó, Noémi Nagy, Csilla Kriston, Ildikó Krencz, Sándor Paku, Olivér Ozoholics, László Drahos, András Jeney, Anna Sebestyén.

J Exp Clin Cancer Res. 2017 Jun 2;36(1):74. doi: 10.1186/s13046-017-0544-y. 1-12.

IF: 5,189*

A disszertációtól független saját közlemények

Activity and complexes of mTOR in diffuse large B-cell lymphomas—a tissue microarray study.

Anna Sebestyén, Tamás Béla Sticz, Ágnes Márk, Melinda Hajdu, Botond Timár, Karolina Nemes, **Noémi Nagy**, Zsófia Váradi, László Kopper

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

Expression of Certain Leukemia/Lymphoma Related microRNAs and its Correlation with Prognosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia.

Karolina Nemes, Mónika Csóka, **Noémi Nagy**, Ágnes Márk, Zsófia Váradi, Titanilla Dankó,

Gábor Kovács, László Kopper, Anna Sebestyén

Pathol. Oncol. Res. 2014, DOI 10.1007, ISSN: 1219-4956, **IF: 1,940**

Rapamycin can restore the negative regulatory function of transforming growth factor beta 1 in high grade lymphomas.

Anna Sebestyén, Ágnes Márk, Melinda Hajdu, **Noémi Nagy**; Anna Molnár, Gyula Végső, Gábor Barna, László Kopper

Cytokine 2015;73(2):219-24. doi:10.1016/j.cyto.2015.02.024. **IF: 2,940**

mTOR activity and its prognostic significance in human colorectal carcinoma depending on C1 and C2 complex-related protein expression.

Tamás Sticz, Anna Molnár, Ágnes Márk, Melinda Hajdu, **Noémi Nagy**, Gyula Végső, Tamás, Micsik László Kopper, Anna Sebestyén

J Clin Pathol 2016;0:1–7. doi:10.1136/jclinpath-2016-203913 **IF: 2,687***

Daganatos őssejtek jelútjai (Notch, Hedgehog, WNT)

Kopper László, **Nagy Noémi**, Sebestyén Anna

KLINIKAI ONKOLÓGIA 4:(2) pp. 139-149. (2017)

11 Köszönetnyilvánítás

Elsősorban külön köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Sebestyén Annának, aki már egyetemi éveimtől kezdve tanított, támogatott és folyamatos szakmai és lelki segítséget nyújtott a munkámamban, doktori munkám nélküle nem jöhetett volna létre. Ötleteiből, tudományos tapasztalataiból, gyors és logikus lényegrelátásából rengeteget tanulhattam arról, hogy milyen a jó kutatói szemlélet, valamint hogy, hogy kell egy jó hangulatú, baráti munkahelyi légkört megteremteni.

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 hogy minden alkalommal, építő szakmai véleményét, tanácsait megosztotta velem.

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

Köszönöm a Kopper-laborban dolgozó/ott munkatársaknak (Böszörményi Judit, Csorba Gézné, Dr. Hajdu Melinda, Dr. Hujber Zoltán, Dr. Krencz Ildikó, Mallászné Bagi Györgyi, Dr. Márk Ágnes, Dr. Nemes Karolina, Petővári Gábor, Dr. Stitz Tamás, Dankó Titanilla) az összetartó, jó hangulatú baráti légkör megteremtését.

Külön köszönettel tartozom Csorba Gézné, Maricának, hogy ismerhettem. Mind szakmai mind baráti szempontból rengeteg újat tanulhattam tőle. Az elsajátított sejt- és szövettényésztési technikák, valamint a tőle tanult munkaerő és munkamorál a jelen PhD munkámhoz és a jövőbeli kutatásaimhoz nélkülözhetetlen alapot adtak.

Köszönöm Dr. Márk Ágnesnek a sok segítséget, türelmet, amit a módszerek elsajátítása, betanulásom során nyújtott, továbbá a fejlődésemhez fontos szakmai és baráti támogatását, mely minden alkalommal jó hangulatot és lelkesedést adott.

Köszönöm Dr. Hujber Zoltánnak, Petővári Gábornak és Dr. Krencz Ildikónak a tudományos megbeszéléseket, összetartást és hogy a laborban eltöltött idők mindig vidám hangulatban teltek/telnek.

Köszönet Molnár Annának a kitartó hallgatói munkájáért, hogy a lehetetlent nem ismerve, példamutató lelkesedéssel segítette PhD munkámat.

Köszönöm Dr. Hajdu Melindának és Dr. Pápay Juditnak, hogy a patológiai szaktudásukkal mindig a segítségemre voltak.

Köszönet Dankó Titanillának, amiért mindig kézségesen segítségemre volt mind lektorálási mind kutatással kapcsolatos technikai nehézségek megoldásában.

Köszönöm Dr. Barna Gábornak, Dr. Márk Ágnesnek és Kriston Csillának az áramlás citometriai vizsgálatok kivitelezésében és analízisében nyújtott segítségét.

Köszönöm Sztodola Andrásnak, Dr. Tóvári Józsefnek, hogy az állatkísérletek kivitelezését és megvalósítását lehetővé tették.

Dr. Szoboszlai Norbertnek, Dr. Hujber Zoltánnak és Petővári Gábornak az LC-MS mérés során nyújtott segítségeket.

Köszönöm Dr. Bödör Csabának és Dr. Király Péter Attilának a molekuláris vizsgálatokban nyújtott szakmai segítségeket, továbbá a dolgozat írása során nyújtott baráti támogatásukat.

Köszönet Dr. Peták István és Dr. Braunschetter Diana az Oncompass Medicine – Molekuláris diagnosztika munkatársainak, továbbá Dr. Hollósi Péternek a Molekuláris Diagnosztika laboratórium volt munkatársának a szekvenálásokért.

Köszönet Dr. Paku Sándornak a fluoreszcensmikroszkóp használatra bocsátásáért és a mikorszópos képek elkészítéséért.

Köszönet az összes TDK hallgatónak, akik bármilyen formában segítettek a PhD munkámban.

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

Köszönöm barátaimnak, hogy mellettem álltak és türelemmel támogattak minden alkalommal. Köszönöm Katona Árpád időt és energiát nem kímélő segítségét, lelki támogatását, amit a disszertáció megírása során tanúsított.

Nem utolsó sorban hálámat szeretném kifejezni családomnak, szüleimnek, testvéreimnek és nagyszüleimnek, akik szeretettel, gondoskodással és türelemmel végigkísérték eddigi munkámat. Minden döntésemben támogattak és biztattak, nélkülük ma nem tarthatnék itt.