

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

Doktori tézisek

**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

## 1. Bevezetés

A sejtek működésének szabályozásában nagyon fontos szerepet játszanak a jelátviteli útvonalak összességét jelentő jelátviteli hálózatok, amelyben számos ponton kapcsolódnak a különböző regulációs folyamatok egymáshoz. A hálózatban központi 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. A tumor biológiai kutatásokban a **PI3K/AKT/mTOR jelút** elemeinek mutációs és aktivitás változásairól megismert adatok alátámasztják az útvonal szabályozási zavarának szerepét a daganatok kialakulásában. Az mTOR gátlók fejlesztése, klinikai alkalmazásának vizsgálata, bizonyos kezelések bevezetése már megtörtént, illetve megkezdődött, ennek ellenére még nincs elég adat arról, hogy az mTOR hiperaktivitást az adott daganattípusok esetében milyen tényezők vagy akár pontosan milyen a daganatsejtekre jellemző jelátviteli változások eredményezik.

Értekezésemben az mTOR jelátviteli útvonal aktivitását befolyásoló tényezőket, ezek között a Notch szignál aktivitás változásának szerepét, valamint az mTOR jelút anyagcserefolyamatokat szabályzó szerepét és tumornövekedésre gyakorolt hatását vizsgáltam mTOR inhibitorok segítségével humán Hodgkin lymhomákban (HL) *in vitro* és *in vivo*.

Az **mTOR** szerin-treonin kináz elnevezését, az 1970-es években a Húsvét-szigeten (Rapa Nui) felfedezett, *Streptomyces hygroscopicus* baktériumból izolált gátlószeréről, eredetileg gombaellenes, később immunszuppresszív hatóanyagként jellemzett rapamycinről kapta.

Az **mTOR kináz** a sejtekben **két multiprotein komplexben található**, melyek több eleme is azonos, de a komplexre jellemző egyedi fehérjék biztosítják a szerkezeti, funkcionális és gátlószerekkel szembeni érzékenység különbségüket. Az mTORC1 komplex elemeként a Raptor és az mTORC2 komplex elemeként a Rictor, a komplex fontos „scaffold” fehérjei.

Az **mTOR kináz számos intracelluláris és extracelluláris folyamat szabályozásában vesz részt, szabályozási zavara számos tumor esetében jól ismert.** Az mTORC1 és C2 fontos elemei a

PI3K/AKT jelútnak, a különböző receptorok aktivációjukat követően a foszforilációs kaszkádban, a PI3K foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP2) foszfatidilinozitol-3,4,5-trifoszfáttá (PIP3) alakítják. Ennek negatív szabályozója a PTEN, jól ismert tumor szuppresszor fehérje is. A foszforilációk sorozatát a protein dependens kináz, majd az AKT szerin-treonin kináz fehérje aktivációja követi, mely gátolja a tuberous sclerosis komplex 1/2 (TSC 1/2) szintén gátló hatását. Az mTOR aktivitást a hipoxiával és az alacsony energia ellátottsággal összefüggő adenoszin-monofoszfát-aktivált kináz (AMPK) gátló hatása is szabályozza, emellett más, daganat típusok esetében ismert, hiperaktív szignálok, a PI3K-tól függetlenül szintén befolyásolhatják.

Az **mTORC1** fontos **célfehérjéi**: a riboszómális S6 kináz (S6K), illetve a 4E kötő fehérje (4EBP). Ezek aktivitása az S6 foszforilációján, illetve az elongációs faktor aktivitásának szabályozásán keresztül, elsősorban a 5' cap-függő mRNS-ek translációjához kapcsolódnak, olyan onkogének átírását is érintik, mint pl. a c-MYC, ciklinD vagy a VEGF. Az mTORC1 szabályozása alatt állnak még a lipidszintézis bizonyos faktorai; illetve a HIF1 $\alpha$ , hipoxiával összefüggő változások szabályozása. Előbbiek a C1 komplex anyagcsere-szabályozó hatásaiban is részt vesznek, befolyásolják a nukleotid, a lipidszintézis és a glükóz metabolizmus folyamatait, illetve az autofágiát is. **Az mTORC2 komplex szabályozó szerepéről** is egyre több adat ismert. Hiperaktivitása számos AKT függő folyamatot (sejtek túlélése, anti-apoptotikus hatások) és a sejt citoskeletális átépüléseit befolyásolja, hatással a daganat progresszióra, a rezisztencia problémák kialakulására.

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 más szabályozási zavarok is befolyásolhatják az aktivitását**. Az útvonal szabályozási zavarát okozhatják „upstream” a hálózati csomópontokban található fehérjék funkcionális hibái. Számos onkogén fokozott, **mutációkkal összefüggő aktivitása ismert** – kelőbbiekben, pl. a **PI3K katalitikus alegységének, az IGF1R-nek, az AKT-nak** aktiváló mutációja. Előbbiek mellett tumor szuppresszorok

funkcióvesztő mutációi, pl. a **PTEN**-nek, a **TSC1/2**-nek kiesésével járulhatnak hozzá az emelkedett mTOR aktivitáshoz.

Az mTOR komplexek fiziológiai és patofiziológiai jelentőségét **nem daganatos betegségek** esetében is ismerjük (elhízás, öregedés, cukorbetegség, kardiovaszkuláris vagy bizonyos idegrendszeri betegségek). Fokozott mTOR aktivitás a fehérje transzláción és az autofágia gátlásán keresztül vezethet azoknak a fehérjéknek vagy azon fehérjék felhalmozódásához, amik neurodegeneratív betegségek kialakulásában játszanak szerepet. Az mTORC1 a glükóz homeosztázis szabályozásának is fontos tényezője, a II-es típusú diabétesszel és az elhízással is összefüggő az aktivitás zavara. Az mTOR gátlás, a csökkentett tápanyag bevitel élethossz növekedéshez, különböző öregedési folyamatok lassulásához is vezethet.

Az mTOR aktivitás változások legkülönbözőbb betegségekben megismert szerepe alapján az immunszuppresszív hatású rapamycin mellett, számos új **mTOR inhibitor** fejlesztése kezdődött meg. A klasszikus mTOR inhibitorok két nagy csoportba sorolhatók: **a rapamycin és a rapamycin analógok (rapalógok)** csoportjába. A rapamycin volt az első izolált mTOR inhibitor, mely allosztérikusan gátolja a komplex összeszerelődését és az mTORC1 komplex aktivitását. A komplexek szerkezeti különbségei miatt, az mTORC2 esetében a direkt gátlás nem jöhet létre. Hosszútávú és nagyobb dózisú rapamycin kezeléskor azonban csökkent mTORC2 aktivitást figyeltek meg. Az FDA 1999-ben hagyta jóvá a rapamycin alkalmazását vesetranszplantációban, tumornövekedést gátló hatását pedig 2002-ben írták le, alkalmazása több daganat esetében engedélyezett. A köpenysejtes lymphomák (MCL) kezelésében és számos rossz prognózisú daganat esetében van lehetőség rapalógok alkalmazására. A rapalógok a rapamycinhez hasonló szerkezetű, de jobb oldékonyági és stabilitási tulajdonsággal rendelkező származékok. A három jelenleg klinikai alkalmazásban elérhető rapalóg a temsirolimus, everolimus és a ridaforolimus. Az **everolimus kezelés rossz prognózisú Hodgkin és non-Hodgkin lymphomás betegek**nél is hatékonynak bizonyult, ez alapján egyedi elbírálás esetén van lehetőség mTORC1 gátló kezelésre. Előbbiekén túl, másod- és harmadvonalban alkalmazható metasztatizált endometrium carcinomák, akut myeloid leukémiák (AML), glioblastomák és szarkómák esetében.

Az új generációs mTOR inhibitorok, komplextől függetlenül, ATP kompetitív hatásuk miatt, mindkét mTOR komplex aktivitását, vagy akár ezzel párhuzamosan más, az útvonalhoz tartozó, fehérjék (AKT, PI3K) aktivitását is gátolják (duál inhibitorok). Az első mTORC1/2 inhibitor a PP242 volt, származékait jelenleg szolid daganatokban és haematológiai daganatokban tesztelik. A duál inhibitorok a p70S6K negatív „feedback loop” hatás kiesés kiküszöbölésére adnak lehetőséget (pl.: NVP-BEZ 235 – ez a **duál inhibitorok** közül klinikai vizsgálatok alapján a legsikeresebb). Jelenleg már a **harmadik generációs mTOR inhibitorok** (pl.: RapaLinks) tesztelése is elkezdődött.

A haemopoetikus sejtek aktivációja és differenciációja során, a PI3K/AKT/mTOR szignál kapcsolatban áll mind a B-, mind a T-sejt receptor, illetve számos növekedési faktor és citokin útvonallal. Hibás működése a myeloid és a lymphoid érési vonalak zavarát okozhatja. **Haematológiai daganatok esetében, szabályozási zavarai ígéretes terápiás célpontok.** PI3K/AKT útvonal aktivációja jellemzi pl. az AML (> 60%), ALL sejteket, és a legkülönbözőbb lymphomák kialakulásával is összefüggésbe hozták (pl. MCL, Burkitt, HL és DLBCL). A HL-s esetek több mint 90%-ában magas mTORC1 aktivitást figyeltünk meg, DLBCL-ek esetében pedig egyértelmű prognosztikai összefüggéseket találtunk a két komplex aktivitás különbségeivel összefüggésben.

Munkámban HL sejtvonalakat használtam modell-kísérleteimben. A HL betegek kezelésének terápiás eredményei igen jók, a betegek több mint 80%-ánál öt évnél hosszabb túlélést, a betegek jelentős részénél gyógyulás várható. Ugyanakkor, a rosszabb prognózisú esetekben fontos lenne új, célzott terápiás kezelések bevezetése.

Az mTOR aktivitás, a két különböző mTOR komplex a sejttállapotát szenzoráló, monitorozó útvonalakkal áll kapcsolatban. Munkám az mTOR és a **Notch szignál** útvonalak kooperációját, a két szignált gátló kezelések hatásait vizsgáltam ezért a továbbiakban a Notch jelútvonal ismertetését és eddig ismert funkcionális és daganatbiológiai szerepét foglaltam össze.

A Notch útvonalnak a lymphoid sejtek differenciálódásának és funkcióinak szabályozásán túl is, fontos, az egész szervezet fejlődését érintő szerepe van. Sejt-sejt közötti kommunikációs kapcsolatban kitüntetett szerepet játszó útvonal, legjobban jellemzett funkciói az

immunsejtek fejlődésének és működésének szabályozásában ismertek. 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 Notch receptor ligand kötést követően egy hasítási kaszkádon keresztül aktiválódik, a **Notch receptorok (NOTCH1-4) és a ligandjaik (Jagged1,2 vagy Delta-like 1, 3 és 4)** kapcsolódása aktiválja az **ADAM metalloproteázt, majd a gamma-szekretáz hasítja a receptort**. A receptor intracelluláris doménje (NICD) a magba vándorol, ahol a CSL transzkripciós faktorról és más kofaktorokkal különböző gének expresszióját indukálja, pl. a c-MYC és HES1 transzkripciós faktorokét. A Notch receptor ligand kapcsolatok erőssége, a szignál aktivitása, a mikrokörnyezet jellegzetességei befolyásolják az útvonal hatásait a legkülönbözőbb celluláris folyamatokban. A Notch szignál hibás, nem megfelelően szabályozott működését haematológiai malignitások (T-ALL) kialakulásával kapcsolatosan írták le elsőként. HL-k esetében a NOTCH1 fokozott aktivitását mutatták ki Sternberg-Reed sejtekben és sejtvonalakban, ezt összefüggésbe hozták a sejtek proliferációjával és túlélésével, továbbá B-sejt jellegük elvesztésével is.

A Notch receptor potenciális daganatterápiás célpont. A kis molekulású Notch inhibitorok közé a **gamma-szekretázt gátlók (GSIk)** tartoznak, melyek közül a legelterjedtebb a DAPT (N-[N-(3,5-difluorofenilacetil-L-alanil)]-S-fenilglicin t-butilészter), de számos származéka is elérhető. Jó eredményeket mutatnak azok a preklinikai vizsgálatok, melyekben a NOTCH1 receptor aktivált, intracelluláris doménjéhez kapcsolódó inhibitorot használtak – SAHM1 (stapled  $\alpha$ -helical peptides derived from MAML1).

A Notch és az mTOR jelátviteli útvonalak kapcsolódása több ponton megalósulhat (pl. az AKT, a PTEN, az FBXW7 ubiquitin ligáz vagy a c-MYC fehérjék aktivitásának és mennyiségének változása).

A sejtek osztódásához és növekedéshez sok energiára, új anyagcseretermékekre van szükség, párhuzamosan 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 a katabolikus folyamatok egyensúlyának szabályozásában. Ismert, hogy hipoxiás körülmények között a glikolízis során piruvátból laktát keletkezik. Az mTORC1 segíti a laktát termelő glikolízis irányába tolni a sejtek anyagcseréjét akár a hipoxia indukálta faktor 1  $\alpha$  transzkripciós faktor (HIF1 $\alpha$ ) vagy c-MYC transzlációjának fokozásán keresztül is. Az oxidatív foszforiláció folyamatait is gátolhatja, továbbá a sejtek a glükóz mellett más szubsztrátokat, pl. a glutamint is hasznosíthatják mTORC1 mediált glutaminolízis segítségével.

Az immunsejtek gyors aktivációjához hasonlóan, számos, a daganatsejtek esetében is megjelenő, aktivitásváltozás figyelhető meg lymphoid sejtekben, pl.: az anyagcsere hasonló glikolitikus átprogramozás. Az aktivált lymphociták fő energiaforrása a glükóz, melyet oxigén jelenlétében is laktáttá alakítanak, vagyis sok szolid tumort is jellemző, aerob glikolízis (Warburg effektus) jellemzi a sejteket. Az aktivált lymphoid sejtek a tumorokhoz hasonlóan szintén a glutamint és a zsírsavakat hasznosíthatják alternatív szén- és energiaforrásként. Egyre nyilvánvalóbb, hogy mindez szigorúan szabályozott folyamatok összessége. A B-sejt populációkat jellemző metabolikus folyamatokról még keveset tudunk. Az mTOR aktivitásváltozásokról és azok a B-sejt fejlődésben, valamint leukémia és lymphoma sejtekben megfigyelhető aktivitásváltozásairól azonban sok adat érhető el. Több lymphoma sejtet fokozott glikolitikus aktivitás jellemezi, ezt *in vitro* vizsgálatokkal is igazoltak. A HL-ás betegek közel felében fokozott glükóztranszporter 1 (Glut1) aktivitást figyeltek meg, továbbá a tumorsejtek intenzív laktát-dehidrogenáz enzim expresszióját detektálták, ezek az intenzív glikolízisre utalnak, ugyanakkor *in vitro* adatok alapján a HL sejtek oxidatív foszforilációs aktivitása is jelentős lehet.

## 2. Célkitűzések

1. A korábbi eredményeink és irodalmi adatok alapján, a Hodgkin lymphoma (HL) sejteket szöveti környezetben fokozott mTOR aktivitás jellemzi, ennek molekuláris háttere azonban nem tisztázott. A lymphoid sejtek differenciálódásában szabályozó szerepet betöltő Notch jelátviteli útvonal működészavara számos haematológiai malignitás és daganat esetében ismert. Munkánk során célunk az emelkedett mTOR aktivitás és a Notch szignál aktivitás 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 sejtvonalakban *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 aktivitásváltozásait 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 sejtvonalak *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

***In vitro* vizsgálatok:** klasszikus HL sejtvonalak (DEV, KMH2 és L1236); T-ALL sejtvonalak (MOLT4; Jurkat); mTOR inhibitorok (rapamycin; PP242; NVP-BEZ 235) és Notch útvonal gátlók (DAPT, GSI-XII, SAHM1) alkalmazása. Jagged1 ligand kezelés.

Az apoptotikus sejtek százalékos aránya - áramlási citometria, proliferációs mérések - AlamarBlue teszt.

***In vivo* vizsgálatok:** HL **xenograftok** SCID egerekben subcután oltással. Kezelések: mTORC1 inhibitorok - Rapamune, Torisel; mTORC1/2 inhibitor - PP242; duál inhibitor - NVP-BEZ 235; gamma-szekretáz inhibitor - GSI-XII.

**A Hodgkin lymphoma beteganyagokon** végzett vizsgálatokhoz az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet archivált formalinban fixált, paraffinba ágyazott biopsziás mintáit használtuk.

**A mutációs analíziseket** Sanger és piroszekvenálással végeztük el az *FBXW7* (exon 5, 9, 10 és 11-re) illetve a *PIK3CA* (exon 9 és 20) gén leggyakrabban mutált exonjaira. A HL sejtvonalakban 50 onkogén mutációs forrópontjait is vizsgáltuk NGS és az Oncompass Medicine – Molekuláris diagnosztika segítségével.

**mRNS expresszió vizsgálatok:** PureLink<sup>TM</sup> Micro-to-Midi kit RNS izolálás (Invitrogen) után, reverz PCR reakció különböző Notch receptorok és ligandok mRNS expressziójának igazolásához. Valós idejű PCR vizsgálatok NOTCH1 target transzkripció faktor mRNS-ek esetében TaqMan Assay segítségével készültek.

**Fehérje expresszió vizsgálatok:** p-S6, Rictor, Raptor, hasított caspase-3, p-HH3, hasított NOTCH1, NOTCH1, glükóz tanszporter1, glutamináz ellenanyagokat és Novolink másodlagos előhívó kit-et használtunk **ICC és IHC** vizsgálatainkban. Mennyiségi összehasonlító vizsgálathoz **Western blot** technikát alkalmaztunk: anti-pS6, anti-Rictor, anti-Raptor, anti-hasított-NOTCH1, anti-NOTCH1 ellenanyagok, Vectastain Elite ABC másodlagos előhívó kit és kemilumineszcens előhívó rendszerrel. Fehérje komplexek illetve fehérje módosulások (foszforiláció, metiláció stb.) *in situ* kvantitatív kimutatására **Duolink festést** alkalmaztunk anti-pS6-nyúl és anti-S6 egér, illetve anti-mTOR-nyúl és anti-Rictor egér ellenanyag párokkal. Ha a két ellenanyag pár a megfelelő távolságon belül kötődött, akkor pontszerű fluoreszcens jeleket detektáltuk.

A **metabolit koncentráció vizsgálatok** a különböző jelöletlen és  $^{13}\text{C}$  glükóz-, acetát- és glutamin hozzáadással megjelölt sejtekből megfelelő lizátumokat és azok származékait készítettük el. Szoboszlai Norbert és Hujber Zoltán segítségével metabolit koncentráció LC-MS mérését végeztünk. Sejtszámra vagy tumor tömegre vonatkoztatva adtuk meg a metabolitok intracelluláris koncentrációját.

A **statisztikai vizsgálatok**at legalább három független mérés segítségével végeztük, mely során átlagot és szórást számoltunk. Past 3.05 statisztikai programmal és IBM, SPSS v.22 szoftvert,  $t^2$  próbát, egyszempontos variancia-analízist használtunk szükség szerint. Szignifikánsnak a  $p \leq 0,05$  értéket vettük

## 4. Eredmények

### HL sejtek mTOR és a Notch1 útvonalak aktivitása

A rendelkezésünkre álló három különböző HL lymphoma sejtvonal – KMH2, DEV, L1236 – esetében RT-PCR segítségével igazoltuk a *NOTCH1* és 2 receptor és *JAGGED1,2* és *DLL1* ligand mRNS-ek jelenlétét.

Western blot eredményeink alapján mindhárom sejtvonalat konstitutívan aktív Notch1 szignál jellemezte *in vitro* körülmények között. A szignál aktivitását jelző hasított NOTCH1 receptor (c-NOTCH1) expresszióját figyeltük meg, hasítatlan receptort nem detektáltunk csak a pozitív kontrollnak tekinthető Jurkat vagy CEM sejtekben. Az aktivált NOTCH1 fragmentek jelenlétét, a HL-ás betegek szöveti mintáiban is ki tudtuk mutatni IHC festéssel. A HL sejtvonalakban kimutatott magas Notch1 szignálaktivitás ligand független jelenlétét 72 órás *in vitro* GSI kezeléssel igazoltuk.

### Konstitutív NOTCH1 aktivitás háttérének vizsgálata

A NOTCH1 és az mTORC1 hiperaktivitás genetikai háttérében, onkogén, illetve tumor szuppresszor gén génmutációt nem tudunk kimutatni egyik sejtvonalban sem, innen esetleg lehetne külön mondat a két útvonalat érintő gének mutációit vizsgáltuk, mely során vizsgált gének vad típusúnak bizonyultak. (pl. *EGFR*, *FBXW7*, *NOTCH1*, *PIK3CA*, *TP53*, *PTEN*, *VHL*, *stb.*)

### mTOR és Notch1 aktivitást befolyásoló kezelések

Jagged1 ligand, GSI, illetve mTORC1 aktivitást gátló rapamycin kezelések nem befolyásolták a *NOTCH1* mRNS expressziót HL sejtekben. Emellett a kezelőszerek, sem monoterápiában, sem kombinációban nem befolyásolták az aktív Notch1 szignál következményeként kimutatható hasított NOTCH1 mennyiségét sem.

A rapamycin kezelés mTORC1 aktivitást befolyásoló időfüggő (2, 24 és 72 órás) hatásait igazoltuk a HL sejtvonalakban. 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 a korai hatás tartósnak. A GSI kezelés nem okozott szignifikáns változást az mTOR aktivitásban.

### **mTOR és NOTCH1 inhibitor tumornövekedés gátló hatásai**

A rapamycin kezelés esetében a legérzékenyebb sejtvonal a KMH2 volt, melyben nem csak proliferációgátlást, hanem apoptózis indukciót is ki tudtunk mutatni. A GSI önmagában nem bizonyult hatékony gátlószernek, egyik sejtvonal esetében sem. Az aktivált NOTCH1 inhibitor, SAHM1 kezelés viszont, mind a három sejtvonalban szignifikánsan gátolta a sejtek proliferációját– a DEV és az L1236 sejtek esetében apoptózist indukált. Érdekes, hogy jelentős proliferációgátló hatást figyeltünk meg GSI + rapamycin kezelés után is, – szignifikánsan jobban gátolta a proliferációt, mint a rapamycin a kevésbé érzékeny DEV és L1236 sejtvonalak esetében is. L1236 xenograftokban a GSI kezelés csökkentette a tumornövekedést, de nem szignifikánsan, míg a Torisel (rapamycin származék) kezelés szignifikánsan gátolta a tumornövekedést. A GSI és Torisel kombinált kezelés bizonyult a leghatékonyabbnak. IHC festéssel az mTORC1 gátlás anti-proliferatív és pro-apoptikus hatásait igazoltuk szöveti szinten.

### **HL sejtek mTOR komplex aktivitásának vizsgálata**

Hodgkin lymphoma sejtvonalak mTORC1 és mTORC2 komplexeinek vizsgálatakor a három sejtvonalban jelentős expressziós különbségeket mutattunk ki. p-S6 (mTORC1 aktivitás marker fehérje) a KMH2 sejtvonalban volt a legnagyobb mennyiségben. Ez arra utal, hogy a KMH2 sejteknek legmagasabb az mTORC1 aktivitása a három vizsgált sejtvonal közül, míg az L1236 és a DEV sejtvonal alacsonyabb mTORC1 aktivitással jellemezhető. Raptor (az mTORC1 komplexre jellemző fehérje) és Rictor (az mTORC2 komplexre jellemző) fehérjék mennyiségét immuncitokémiai festéssel és Duolink technika segítségével vizsgáltuk. A Duolink festések és értékelések alapján, az mTORC2 komplex fehérjék túlsúlyát detektáltuk 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.

### **mTOR inhibitor kezelések tumornövekedés gátló hatása HL sejtekben**

A magas mTORC2 komplex expressziót mutató sejtvonalakban a rapamycin (mTORC1 inhibitor) kevésbé hatékony. *In vitro*

eredményeink igazolták, az mTOR inhibitor érzékenység különbségeket, a PP242, illetve az NVP-BEZ 235 (új generációs mTOR inhibitorok) kezelés hatékonyabb proliferációgátló és apoptózis indukáló hatású, mint a rapamycin kezelés a magasabb mTORC2 aktivitással rendelkező HL sejtekben *in vitro*. A 72 órás NVP-BEZ 235 és PP242 kezelések mind a három sejtvonal proliferációját szignifikánsan csökkentették, míg a rapamycin csak a KMH2 sejtvonal esetében volt szignifikáns proliferációgátló. 120 óra kezelés után pedig az új generációs mTOR inhibitorok már az L1236 sejtvonalban is szignifikáns apoptózis indukáló hatást mutattak.

Az előbbi kezelések tumornövekedést gátló hatásait *in vivo* is igazoltuk. Szignifikáns tumornövekedés gátlást tapasztaltunk mindhárom sejtvonal modellünkben Torisel, illetve Rapamune kezelések esetében. Az L1236 és a DEV xenograftokban a háromféle mTOR inhibitor hatásait összehasonlítva *in vivo*, azt tapasztaltuk, hogy a rapamycinhez hasonlóan csökkent a tumorok növekedése.

### **HL sejtvonalak anyagcsere folyamatainak vizsgálata mTOR inhibitor érzékenységgel összefüggésben**

A lymphoid sejtekre aktivált állapotban jellemző, magas intracelluláris laktát mennyiségeket mértünk mindhárom sejtvonalban. A laktát mennyisége az L1236 sejtek esetében volt a legmagasabb. *In vitro* 48 órás mTOR inhibitor kezelés után a glikolitikus laktátszint csökkenése jellemezte a KMH2 és DEV sejteket, míg az L1236 esetében a laktát mennyisége emelkedett, rapamycin és NVP-BEZ 235 duál inhibitor kezelés hatására. Hasonló metabolikus változásokat *in vivo* xenograft tumorok esetében is detektáltunk.

A sejtek magas glikolitikus aktivitását alátámasztja, hogy a három sejtvonalban 1 óra alatt a laktát 15-23%-ában jelent meg a jelölt glükózból származó <sup>13</sup>C izotóp. Az mTOR aktivitás szerepe a glikolízis folyamatában KMH2 sejtekben egyértelműen igazolható volt. *In vitro* rapamycin kezelés mellett 48 óra után a sejtek glükóz hasznosítása, Glut1 expressziója és a p-S6 expressziója is csökkent. A sejtek glutamin hasznosítását, jelölt glutamin metabolitokba épülésén keresztül is nyomon tudtuk követni. Megfigyeltük a glutamináz enzim mennyiségének mTORC1 függő szabályozását is; a rapamycin kezelés a glutamináz enzim mennyiségét csökkentette a kezelt lymphoma sejtekben.

## 5. Következtetések

A PI3K/AKT/mTOR útvonal központi szabályozó és ezen keresztül daganatbiológiai szerepét mutatják saját vizsgálataim eredményei. Eddigi kutatási eredményeim az mTOR kináz aktivitásával kapcsolatos ismeretek bővítését, a folyamatok jobb megértését segítik elsősorban humán Hodgkin lymphomák esetében, és reményeink szerint terápiás, diagnosztikai fejlesztések alapjául is szolgálhatnak a jövőben.

Korábbi vizsgálatainkban jellemeztük a HL-ás betegek HL sejtjeinek mTORC1 komplexhez köthető, fokozott mTOR aktivitását. Igazoltuk bizonyos HL sejtvonallal modellek (KMH2, DEV, L1236) szintén jelentős mTOR aktivitását mellyel kapcsolatban a szignált érintő tumor szuppresszor vagy onkogén fehérjék génjeinek mutációi merülnek fel, ezek a mutációk azonban a HL lymphomákat kevésbé jellemzik. Saját eredményeink megerősítették ezeket az adatokat, a vizsgált tumor szuppresszor és onkogén gének vad típusának bizonyultak a HL sejtekben. A Hodgkin lymphomás szöveti környezetben a citokineknek és kemokineknek (pl.: IL-5, CCL5), valamint a sejtek közötti receptor-ligand kapcsolatainak hatásai jól ismertek. Pl. CD40 – CD40L vagy a NOTCH1 és Jagged1 biztosítják a sejtek túléléséhez és proliferációs aktivitásának megfelelő mikrokörnyezetet. HL sejtvonalakon végzett vizsgálataim eredményeit, mely során a NOTCH1-3 és Jagged1,2 expressziót igazoltuk, Jundt megfigyelései is alátámasztják. Előbbiek megerősítette, hogy az aktivált, hasított NOTCH1 fehérje konstitutív, ligand aktivációtól független jelenlétét elsőként mutattuk ki a vizsgált HL sejtvonalakban, illetve hasított NOTCH1 fehérjét a humán szöveti mintákban is. A GSI hatásaival szembeni rezisztencia hátterében leggyakrabban a NOTCH1 receptor, PTEN fehérje vagy FBXW7, ubiquitin ligáz mutációja állhat, ami azonban egyik vizsgált sejtvonalat sem jellemezte.

Más preklinikai vizsgálatok és jelen kísérleteink is alátámasztják, hogy az aktivált NOTCH1 transzkripciót aktiváló hatását gátló új inhibitor, a SAHM1, hatékonyabb a GSI-oknál; mind a három HL sejtvonallal szignifikáns biológiai változást eredményezett (proliferációgátló és apoptózis indukáló volt), habár a célgének átírásában (*c-MYC* és *HES1*) nem tapasztaltunk szignifikáns változást. A NOTCH1 célgének különböző módon szabályozhatnak más a jelút

aktivitását szabályozó fehérjét. Saját eredményeink is felhívják a figyelmet arra, hogy új célpont lehet a különböző magas NOTCH1 aktivitást mutató tumorsejtek, így a HL-ek kezelésében az mTORC1 komplex aktivitás is. Az mTORC1 specifikus gátlója a rapamycin, a GSI-ral szembeni rezisztencia esetében is, szignifikáns tumornövekedés gátlónak bizonyult *in vitro* és *in vivo*, monoterápiában is és GSI-vel kombinációban is. Kombinált kezelés esetében a tapasztalt tumornövekedés gátlás a rapamycin mTOR jelút gátló hatásához kötődik (sem a GSI 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 a GSI kombinált kezelés fokozta a rapamycin hatását *in vitro* és *in vivo* is, ami a GSI mikrokörnyezet módosító hatásából is következhet. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a konstitutív NOTCH1 aktivitás, mely a HL sejteket jellemzi, olyan potenciális terápiás célpont lehet, amelynek hatásait más, a NOTCH1 aktiváció következményeit befolyásoló kezelések, így például az mTOR inhibitor kezelés is befolyásolhatja.

A dolgozatban vizsgált HL sejtvonalak rapamycin érzékenysége *in vitro* vizsgálataink szerint az mTORC2 jelenlétével összefüggést mutatott. Más rapamycin rezisztens haematológiai és egyéb daganatokon végzett preklinikai vizsgálatokkal összhangban az mTORC2 komplex expressziót és aktivitást mutató sejtvonalakban, csak az új generációs inhibitoroknak volt tumornövekedés gátló hatása *in vitro*. Bár az *in vitro* különbségek ellenére a mTORC1 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 rapalógok már klinikai-terápiás készítmények.

Az mTOR aktivitás sejtek anyagcseréjének szabályozását érintő hatásai egyre ismertebbeké váltak az elmúlt időben. A vizsgált három HL sejtvonalban az intracelluláris metabolitok koncentrációjának meghatározásával magas laktát mennyiségeket, magas glikolitikus aktivitást, jelentős glükóz transzporter1 expressziót figyeltünk meg. Sejtvonalanként általunk elsőként mért eltérő egyedi glikolitikus

aktivitás HL sejtekben, valamint az irodalmi és más korábbi saját vizsgálataink felhívják a figyelmet arra, hogy az mTORC1 gátlás hatására egyes anyagcsere és bioenergetikai folyamatok aktivitása megváltozhat, a felépítő és lebontó folyamatok egyensúlya átrendeződhet. Az mTOR inhibitorok, elsősorban az új generációs inhibitorok (kettős illetve duál inhibitorok) általános intracelluláris metabolit-koncentráció csökkentő hatását figyeltük meg általánosan a különböző HL sejtvonalakban. Metabolikus vizsgálataink eredményei azt mutatják, hogy az mTOR aktivitás a sejtek túlélését és proliferációját segítő hatásai mellett, metabolikus szabályozó funkcióval is rendelkezik a HL-ák esetében. Ennek praktikus következménye lehet a betegek kezelésében pl. a jól karakterizált mTOR aktivitás, terápiás target lehet, illetve újabb metabolikus targetekre is felhívja figyelmet.

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

- Elsőként írtuk le HL sejtek konstitutív, ligand és GSI független Notch1 szignál aktivitását.

- Megállapítottuk, hogy a Notch és az mTOR jelátviteli út vonal hiperaktivitásában, a két út vonal szabályozását érintő mutációk (*EGFR*, *AKT*, *FBXW7*, *NOTCH1*, *PIK3CA*, *PTEN* vagy *TP53*) nem játszanak szerepet.

- Igazoltuk a rapamycin kezelés mTORC1 aktivitás gátló hatását HL sejtekben, és ezzel párhuzamosan kimutattuk GSI-ral tovább fokozható tumornövekedés gátló és apoptózis indukáló hatását *in vitro* és *in vivo* is.

- Megállapítottuk, hogy a HL sejt vonalak mTORC1/C2 aktivitás különbségei korrelálnak az mTORC1 gátló érzékenységgel, illetve, hogy a C2 komplex aktivitású HL sejt vonalak esetében a kettős C1 és C2 gátló vagy duál inhibitorok hatékony tumornövekedés gátló szerek lehetnek.

*HL sejtek mTOR aktivitásváltozásaival és azok metabolikus hatásaival kapcsolatos vizsgálataim megállapításai:*

- Megállapítottuk, hogy a HL sejt vonalakat intenzív glikolízis és jól működő mitokondrium jellemzi *in vitro*, de a glikolitikus aktivitás mértékében egyedi különbségeket mutatnak a HL



sejtvonalak. Párhuzamosan a sejtek intracelluláris metabolit-koncentrációjának vizsgálata segítségével megfigyeltük, az mTOR inhibitor kezelések a sejtek érzékenységétől függő anyagcsere-változást okozó hatásait.

## 7. Saját publikációk jegyzéke

### A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények

**Noémi Nagy**, Melinda Hajdu, Ágnes Márk, Péter Attila Király, Mónika Tóth, Titanilla Dankó, Mónika Csóka, Anna Sebestyén: Growth inhibitory effect of rapamycin in Hodgkin-lymphoma cell lines characterized by constitutive NOTCH1 activation. *Tumor Biology*, October 2016, Volume 37, Issue 10, pp 13695–13704 **IF: 3,650**

Ágnes Márk, Melinda Hajdu, Zsófia Váradi, Tamás Béla Sticz, **Noémi Nagy**, Judit Csomor, Lajos Berczi, Viktória Varga, Mónika Csóka, László Kopper, Anna Sebestyén: Characteristic mTOR activity in Hodgkin-lymphomas offers a potential therapeutic target in high risk disease – a combined tissue microarray, *in vitro* and *in vivo* study. *BMC Cancer* 2013, 13:250 **IF: 3,319**

Zoltán Hujber, Gábor Petővári, Norbert Szoboszlai, Titanilla Dankó, Noémi Nagy, Csilla Kriston, Ildikó Krencz, Sándor Paku, Olivér Ozohanics, László Drahos, András Jeney, Anna Sebestyén: Rapamycin (mTORC1 inhibitor) reduces the production of lactate and 2-hydroxyglutarate oncometabolites in IDH1 mutant fibrosarcoma cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017 Jun 2;36(1):74. doi: 10.1186/s13046-017-0544-y. **IF: 5,189**

## **A disszertációtól független saját közlemények**

Anna Sebestyén, Tamás Béla Sticz, Ágnes Márk, Melinda Hajdu, Botond Timár, Karolina Nemes, **Noémi Nagy**, Zsófia Váradi, László Kopper: Activity and complexes of mTOR in diffuse large B-cell lymphomas—a tissue microarray study. *Mod Pathol.* 2012, 12:1623-8. **IF: 5,253**

Karolina Nemes, Mónika Csóka, **Noémi Nagy**, Ágnes Márk, Zsófia Váradi, Titanilla Dankó, Gábor Kovács, László Kopper, Anna Sebestyén: Expression of Certain Leukemia/Lymphoma Related microRNAs and its Correlation with Prognosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pathol. Oncol. Res.* 2014, DOI 10.1007, ISSN: 1219-4956, **IF: 1,940**

Anna Sebestyén, Ágnes Márk, Melinda Hajdu, **Noémi Nagy**, Anna Molnár, Gyula Végső, Gábor Barna, László Kopper: Rapamycin can restore the negative regulatory function of transforming growth factor beta 1 in high grade lymphomas. *Cytokine* 2015;73(2):219-24. doi:10.1016/j.cyto.2015.02.024. **IF: 2,940**

Tamás Sticz, Anna Molnár, Ágnes Márk, Melinda Hajdu, **Noémi Nagy**, Gyula Végső, Tamás, Micsik László Kopper, Anna Sebestyén: mTOR activity and its prognostic significance in human colorectal carcinoma depending on C1 and C2 complex-related protein expression. *J Clin Pathol* 2016;0:1–7. doi:10.1136/jclinpath-2016-203913 **IF: 2,687**

Kopper László, **Nagy Noémi**, Sebestyén Anna  
Daganatos őssejtek jelútjai (Notch, Hedgehog, WNT)  
*Klinikai Onkológia* 4:(2) pp. 139-149. (2017)

## 8. Köszönetnyilvánítás

- Elsősorban külön köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Sebestyén Annának**, aki már egyetemi éveimtől kezdve tanított, támogatott és folyamatos szakmai és lelki segítséget nyújtott. Doktori munkám nélküle nem jöhetett volna létre.

- 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 a Ph.D. munkámat az Intézetben végezhettem.

- Dr. Rajnai Hajnalka házi opponensemnek a doktori dolgozatom elbírálását és hasznos tanácsait.

- Külön köszönettel tartozom Csorba Gézáné, Maricának, hogy ismerhettem. Mind szakmai mind baráti szempontból rengeteg újat tanulhattam tőle. Az elsajátított sejt- és szövettenyésztési technikák, valamint a tőle tanult munkaerő és munkamorál a jelen Ph.D. 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

- Köszönöm az Intézet és a Tumorbíológiai labor volt és jelenlegi munkatársainak hogy segítették munkámat.

- Nem utolsó sorban hálámat szeretném kifejezni családomnak, akik szeretettel, gondoskodással és türelemmel végigkísérték eddigi munkámat.