

Az mTOR-jelátvitelt és tumormetabolizmust  
érintő eltérések mint célzott terápiás lehetőségek  
tűdődaganatokban

Doktori tézisek

**Dr. Krencz Ildikó**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Pápay Judit, Ph.D., egyetemi docens

Konzulens:

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

Hivatalos bírálók:

Dr. Gálffy Gabriella, Ph.D., osztályvezető főorvos

Dr. Patonai Attila, Ph.D., klinikai szakorvos

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Buzás Edit Irén, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Bohács Anikó, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest  
2020

## 1. BEVEZETÉS

A tüdőrák világszerte vezető daganatos halálok, Közép- és Kelet-Európában – így Magyarországon is – pedig kifejezetten magas az incidencia és a mortalitás. Munkánk során tüdő adenocarcinomákban (ADC-kban), kissejtes tüdődaganatokban (SCLC-kben) és lymphangioleiomyomatosisban (LAM-ban) vizsgáltuk az mTOR-aktivitást és az ehhez kapcsolódó metabolikus változásokat.

A homeosztázis fontos szabályozójaként az mTOR jelátviteli út számos környezeti jelet integrálva szabályozza a sejtek növekedését, proliferációját és anyagcseréjét. Az mTOR-kináz egy szerin-treonin kináz, ami két, felépítésében és funkciójában különböző fehérjekomplex – az mTORC1 és az mTORC2 – katalitikus alegységét képezi. Az mTOR-komplexek különböznek az őket felépítő fehérje alegységekben, szubcelluláris lokalizációjukban, rapamycin-érzékenységükben, upstream szabályozásukban és downstream effektoraik terén. Míg az mTORC1 elsősorban a sejtnövekedés, a proliferáció és a metabolizmus alapvető folyamatait regulálja, addig az mTORC2 inkább a sejtek túlélését, valamint az aktin citoskeleton reorganizációján keresztül a sejtek migrációját szabályozza. Az mTOR-kináz a PI3K/Akt/mTOR tengely fontos tagja, ugyanakkor számos más, daganatbiológiai szempontból fontos jelátviteli útvonalhoz (pl. Ras/Raf/MEK/ERK-jelátvitel) szintén kapcsolódik, így a molekuláris hálózatok központi elemét képezi.

Az mTOR-jelút hiperaktivációja gyakran megfigyelhető humán daganatokban. Az utóbbi évek molekuláris vizsgálatai feltárták, hogy a hiperaktivációhoz az mTOR-jelátvitelben szerepet játszó fehérjéket kódoló gének (pl. *PIK3CA*, *PTEN*, *STK11* és *RICTOR*) genetikai eltérései is hozzájárulhatnak. Ezek a genetikai eltérések tüdődaganatokban is gyakoriak és a személyre szabott terápia célpontjait képezhetik.

Az ADC a tüdőrákok leggyakoribb altípusa. Klinikai viselkedését, radiológiai és szövettani megjelenését tekintve meglehetősen heterogén képet mutató betegségről van szó. Az ADC-k gyakran

képeznek áttétet, a prognózis kedvezőtlen, az 5 éves túlélés mindössze 15-20%. Az mTOR-jelút kóros aktivációja gyakran megfigyelhető ADC-kban, továbbá az mTOR-jelátvitel aktivitását a kapcsolódó szignáltranszdukciós útvonalakat érintő genetikai eltérések – pl. az *EGFR* és a *KRAS* konstitutív aktivációt eredményező mutációi – is fokozhatják.

Az SCLC-k a tüdődaganatok 15-20%-át alkotják. A gyors tumornövekedés és a korai áttétképzés miatt a terápiás törekvések gyakran nem vezetnek sikerre, a kezelési lehetőségekben nem történt érdemi előrelépés az elmúlt évtizedekben. A genetikai eltérések gyakran érintik a PI3K/Akt/mTOR útvonalat, a *RICTOR* amplifikációját pedig a leggyakrabban megjelenő célozható genetikai eltérésként azonosították SCLC-ben.

A LAM egy ritka, a tüdő cisztás átalakulásával járó progresszív betegség, amelyet ma már egy jól differenciált neoplasztikus elváltozásként a perivaszkuláris epitheliod sejtes tumorok csoportjába sorolnak. A betegség sporadikus (S-LAM) és a sclerosis tuberosa betegség részjelenségeként (TSC-LAM) megjelenő formájának hátterében elsősorban a *TSC1* vagy *TSC2* gének mutációja áll, amelyek az mTOR-jelátvitel hiperaktivációját és következményesen a LAM sejtek proliferációját eredményezik.

Az mTOR-jelátvitel számos inhibitorával folynak klinikai vizsgálatok, azonban eddig csupán néhány hatóanyag került elfogadásra a daganatok terápiájában. Az mTOR-jelút legtöbb inhibitora monoterápiában alkalmazva korlátozott terápiás hatást eredményez, különböző kombinációk részeként viszont ígéretesnek bizonyulnak a hatékonyság növelésében. Annak érdekében, hogy az mTOR-gátlók klinikai transzlációja bekövetkezhesen, elengedhetetlen, hogy olyan prediktív markereket azonosítsunk, amelyek segítik a terápiás döntést. A biomarker-alapú betegszelekción túl fontos a racionális kombinációk alkalmazása, valamint a minél hatékonyabb és emellett jó biztonságossági profillal rendelkező szerek és adagolási módok kifejlesztése, amelyek eredményesek lehetnek a primer és szerzett rezisztencia leküzdésében.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Annak ellenére, hogy a PI3K/Akt/mTOR jelút inhibitoraival számos vizsgálatot folytattak, csupán néhány hatóanyag került törzskönyvezésre a daganatterápiában. Az egyik legfontosabb ok az mTOR-gátlók klinikai transzlációjának elmaradásában a megbízható prediktív biomarkerek hiánya lehet. Az mTOR-jelátvitel pontosabb megértése előrelépést hozhat az mTOR-jelút újgenerációs inhibitorainak klinikai transzlációjában. Ennek megfelelően vizsgálataink célja elsősorban az mTORC1/2-aktivitás meghatározása volt tüdődaganatokban, valamint ehhez kapcsolódóan metabolikus kulcsenzimek, transzporterek expressziójának vizsgálata LAM mintákban az alábbi célkitűzések szerint:

1. Az mTORC1- és mTORC2-aktivitás immunhisztokémiai vizsgálata és a klinikopatológiai adatokkal való összefüggések elemzése primer és agyi metasztatikus tüdő ADC-kban.
2. A *RICTOR*-amplifikáció és az mTORC2-aktivitás vizsgálata SCLC-kben:
  - A *RICTOR*-amplifikáció előfordulásának, valamint a Rictor és p(Ser473)-Akt expressziójának vizsgálata humán SCLC-kben, az eredmények összevetése a klinikai és túlélési adatokkal.
  - A PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonal különböző inhibitorainak hatása *RICTOR*-amplifikált, illetve egyéb, mTOR-jelátvitelt érintő genetikai eltéréseket hordozó SCLC sejtvonalak proliferációjára *in vitro*.
3. Az mTORC1/2-aktivitás és ehhez kapcsolódóan metabolikus kulcsenzimek expressziójának, valamint a klinikopatológiai adatok összefüggéseinek vizsgálata LAM-ban.

### **3. MÓDSZEREK**

#### **Vizsgált betegek**

##### *ADC kohorsz*

Primer tüdő ADC-ket (N=67) és tüdő ADC-k agyi áttéteit (N=67) vizsgáltuk. A minták között 15 ugyanazon betegből származó primer tumor-agyi metasztázis pár is volt. A tumorok műtéti eltávolítását az Országos Korányi Pulmonológiai Intézetben (Budapest) és a Bajcsy-Zsilinszky Kórházban (Budapest) és az Országos Klinikai Idegtudományi Intézetben (Budapest) végezték (ETT-TUKEB 510/2013 és 86/2015). Az archivált ADC mintákból szöveti multiblokkokat készítettünk. Az elérhető klinikopatológiai adatokat (életkor, nem, dohányzási anamnézis, stádium, az agyi áttétek mérete és száma) összegyűjtöttük.

##### *SCLC kohorsz*

Vizsgálatunk során 92 beteg összesen 100 mintáját (80 sejtblokk, 4 transzbronchiális biopszia és 16 műtéti reszekátum) elemeztük. A vizsgált betegek közül 6 beteg esetén 2, míg egy beteg esetén 3 különböző időpontban vett mintával rendelkezünk. A mintavétel a floridai Mayo Klinikán történt (Jacksonville, FL, USA; IRB#: 18-001887). Primer daganatokat (N=30), nyirokcsomó áttéteket (N=52) és távoli áttéteket (N=18) egyaránt vizsgáltunk. A túlélési adatok szintén elérhetőek voltak. A mintavétel előtt egy beteg sem kapott kemoterápiás kezelést.

##### *LAM kohorsz*

Összesen 11 S-LAM beteg műtétilag eltávolított tüdőszövet mintáját elemeztük, 7 esetben a minta explantált tüdőből, 4 esetben diagnosztikus célú mintavételből származott. A műtétekre a floridai Mayo Klinikán került sor (Jacksonville, FL, USA; IRB#: 15-000406).

A klinikopatológiai adatokat (életkor, dohányzási anamnézis, nyirokcsomó áttét, a sebészi beavatkozás típusa, a mintavétel előtti kezelés) összegyűjtöttük. Két beteg hormonterápiában részesült, azonban egy beteg sem kapott mTOR-gátlót a műtéti beavatkozás előtt.

## **Immunhisztokémia**

Az immunhisztokémiai (IHC) reakciókat a formalinban fixált, paraffinba ágyazott minták 4 µm vastagságú metszetein végeztük. A deparaffinálást és az endogén peroxidázok blokkolását követően az antigén feltárást elektromos kuktában 30 percig végeztük citrát (pH=6), Target Retrieval Solution (pH=6,1) vagy 0,1 M-os Tris-EDTA (pH=9) pufferoldatban, majd a mintákat az elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk. Az mTOR-kináz aktivitását a p-mTOR expressziójával jellemeztük. Az mTORC1 aktivitására a p-S6 expressziója (az mTORC1 downstream targetje), az mTOR2 aktivitására a p(Ser473)-Akt (p-Akt, az mTORC2 downstream targetje) és a Rictor (az mTORC2 vázfehérjéje) expressziója alapján következtettünk. A glikolízist és az oxidatív foszforilációt a glukóztanszporter 1 (GLUT1), a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) és a β-F1-ATP-áz (ATPB), a glutaminolízist a glutamináz (GLS), a zsírsavak β-oxidációját a karnitin-palmitoil-transzferáz 1A (CPT1A), az acetát-hasznosítást az acetyl-CoA szintetáz (ACSS2) és a monokarboxilát-transzporter 1 (MCT1) expressziójával jellemeztük. A LAM mintákban LAM markerek (SMA, HMB-45 és β-catenin) és hormon-receptorok (ösztrogén és progeszteron) expresszióját is vizsgáltuk. Novolink Polymer (Leica), illetve Vectastain Universal Elite ABC HRP Kit (Vector) másodlagos detektáló rendszereket alkalmaztunk, majd a reakciót 3,3'-diaminobenzidinnel (DAB) hívtuk elő. Magfestésként hematoxilint használtunk.

Az immunreakciók értékelését két független vizsgáló végezte. Az mTOR és metabolikus markerek értékelése során a H-score-t

használtuk az ADC és LAM minták esetén. Az SCLC mintákban a pozitív sejtek százalékos arányát adtuk meg. A markerek expresszióját az alábbiak szerint osztályoztuk: alacsony/magas expresszió (ADC minták), nincs/alacsony/közepes/magas expresszió (SCLC minták), nincs/alacsony/magas expresszió (LAM minták).

### ***RICTOR fluoreszcens in situ hibridizáció***

Az paraffinba ágyazott SCLC szövetminták és sejtblokkok metszetein végeztük a fluoreszcens *in situ* hibridizációt (FISH). A deparaffinálást és az előkezelést (79°C, 25 perc) követően a proteáz emésztést 38°C-on 25 percig végeztük. A *RICTOR* (#RICTOR-20-OR; Empire Genomics) és az 5. kromoszóma (*Chr5*) kontroll (#CHR05-10-GR; Empire Genomics) próbákat a hibridizációs pufferhez hozzáadva 37°C-on 2 órán keresztül hibridizáltunk, majd a mintákat 73°C-on 3 percig mostuk, szárítottuk, végül DAPI I háttérfestést alkalmaztunk.

A kiválasztott reprezentatív területeken a FISH reakciókat fluoreszcens mikroszkóppal, CytoVision szoftverrel (Leica) értékeltük. Az értékelést ún. hot-spotokra fókuszálva két független vizsgáló végezte mintánként legalább 2-2 területen 30 sejtmagban, a narancsszínű *RICTOR* és a zöld színű *Chr5* jelek számolásával. A jelek számát mintánként átlagoltuk és meghatároztuk a *RICTOR/Chr5* arányt. Az eredményeket pozitív, negatív és bizonytalan kategóriákba soroltuk.

### ***In vitro* vizsgálatok**

#### *Sejtvonalak*

Vizsgálatainkat a *RICTOR*-amplifikált vagy az mTOR-jelátviteli út egyéb eltéréseit hordozó humán SCLC sejtvonalakon végeztük: H196 (*RICTOR*-amplifikáció, *PTEN*-mutáció), H1048 (kettős missense mutáció a *PIK3CA* génben, *AKT3*-amplifikáció), H146 (*PIK3CA*- és

*AKT1*-amplifikáció) és DMS153 (*PIK3CA*-amplifikáció, *RICTOR* missense mutáció).

### *Alamar Blue assay*

Az mTOR-jelátviteli útvonal inhibitorainak hatását az SCLC sejtek proliferációjára 72 órás kezelést követően Alamar Blue teszttel vizsgáltuk. Az Alamar Blue oldatot (Thermo Fisher Scientific) 10% végkoncentrációban használtuk a kezelés utolsó 4 órájában, majd a fluoreszcencia értékeket Fluoroskan Ascent FL fluoriméterrel határoztuk meg. Az eredményeket a kezeletlen kontroll sejtek százalékában adtuk meg. Az alábbi gátlószerek hatását vizsgáltuk: cisplatin (3  $\mu$ M, standard kemoterápiás szer), rapamycin (50 ng/ml, mTORC1-inhibitor), PP242 (1  $\mu$ M, mTORC1/2-inhibitor), vistusertib (1  $\mu$ M, mTORC1/2-inhibitor), dactolisib (1  $\mu$ M, PI3K- és mTORC1/2-inhibitor) és ipatasertib (1  $\mu$ M, Akt-inhibitor).

### **Statisztikai analízis**

Parametrikus adatok esetén kétmintás t-próbát, non-parametrikus adatok esetén Mann-Whitney *U*-tesztet és Wilcoxon-féle előjeles rangpróbát alkalmaztunk. A kategorikus változókat Fisher-féle egzakt próbával hasonlítottuk össze. A korrelációk számítását Spearman-féle rangkorrelációval végeztük. A túlélési analízishez a Kaplan-Meier módszert használtuk, a túlélési görbék összehasonlítása log-rank teszttel történt. A szignifikanciaszintet az ADC-kel és SCLC-kel kapcsolatos vizsgálatokban  $P \leq 0,05$  értéknél, a LAM mintáknál – az esetszámra tekintettel –  $P \leq 0,01$  értéknél határoztuk meg.



#### 4. EREDMÉNYEK

##### **Az mTORC1/2 komplexek mennyiségével és aktivitásával összefüggő fehérjék expressziója primer és áttéti tüdő adenocarcinomákban**

Az mTOR-jelátviteli útvonal markereinek (p-mTOR, p-S6 és Rictor) expresszióját vizsgáltuk primer tüdő ADC-kben (N=67) és tüdő ADC-k agyi áttéteiben (N=67), amelyek között 15 mintapár vizsgálatára is lehetőségünk volt. Az mTORC1 és az mTORC2 aktivitására a p-mTOR, a p-S6 és a Rictor expressziója alapján következtettünk.

A daganat melletti ép tüdőszövetben a p-mTOR, a p-S6 és a Rictor expressziója alacsony volt, az I. és II. típusú pneumocytákban egyaránt gyenge festődést láttunk. A daganatsejteken a p-mTOR, a p-S6 és a Rictor leginkább citoplazmatikus expressziót mutatott, azonban néhány esetben – a primer ADC-k 15%-ában, az agyi áttétek 34%-ában – a p-mTOR magi expresszióját is megfigyeltünk. A Rictor az esetek kevesebb mint 10%-ában membránreakciót is mutatott, azonban a magban egy esetben sem figyeltünk meg Rictor expressziót.

Magas p-mTOR, p-S6 és Rictor expresszió sorrendben a primer ADC-k 33%-ában, 34%-ában és 37%-ában, illetve az agyi áttétek 79%-ában, 70%-ában és 66%-ában volt megfigyelhető. Mindhárom marker expressziója szignifikánsan magasabb volt az agyi metasztázisokban, mint a primer daganatokban ( $P < 0,01$ ). A klinikopatológiai adatokkal nem figyeltünk meg szignifikáns összefüggéseket.

A p-mTOR és p-S6 expresszió konkordanciáját az esetek 72%-ában (96/134) figyeltük meg, az ettől eltérő esetek 58%-ában (22/38) a magas p-mTOR expresszióhoz alacsony p-S6 expresszió társult. Ezen minták 45%-ában (10/22) a magas p-mTOR és alacsony p-S6 expresszió mellett magas Rictor expressziót figyeltünk meg. A magas p-mTOR és magas Rictor expresszió együttes előfordulását a primer tüdő ADC-k 16%-ában (11/67), az agyi áttétek 51%-ában (34/67) láttuk.

A mintapárok vizsgálata során az agyi áttétekben a primer daganatokhoz képest mind a p-mTOR, mind a p-S6 expressziója változott az esetek 60%-ában (9/15), míg a Rictor kifejeződése az esetek 40%-ában (6/15) mutatott eltérést. A p-mTOR és a p-S6 IHC eredményei az esetek többségében az mTORC1-aktivitás fokozódását mutatták az agyi áttétekben (p-mTOR: 6/9, p-S6: 8/9). A Rictor expressziója a mintapárok igazoltan agyi áttétet adó primer daganatainak többségében (10/15, 67%) magas volt, míg a többi primer tüdő ADC esetén csak a minták 28%-ában figyeltünk meg magas Rictor expressziót ( $P < 0,01$ ).

### **A *RICTOR*-amplifikáció és az mTORC2-aktivitás vizsgálata kissejtes tüdődaganatokban**

A *RICTOR*-amplifikációt FISH módszerrel vizsgáltuk 100 SCLC mintában. A medián (tartomány) *RICTOR* kópiaszám 2,90 (1,26-8,35) volt a daganatsejtekben. *RICTOR*-amplifikációt 100-ból 15 esetben (15%) állapítottuk meg. A többi 85 esetből 3 (3%) bizonytalan, míg 82 (82%) negatív volt.

Az SCLC mintákban a Rictor és a p-Akt expresszióját IHC módszerrel vizsgáltuk. A Rictor expressziója 14 esetben (14%) magas, 23 esetben (23%) közepes, 25 esetben (25%) alacsony volt, 38 esetben (38%) pedig nem figyeltünk meg expressziót. A p-Akt expressziója 16 esetben (16%) magas, 26 esetben (26%) közepes, 35 esetben (35%) alacsony fokú volt, míg 23 esetben (23%) nem detektáltunk p-Akt expressziót. A továbbiakban az IHC szenzitivitásának és specifitásának vizsgálatához a magas és közepes expressziót pozitívként, míg az ez alattiakat negatívként regisztráltuk.

A FISH vizsgálat során meghatározott *RICTOR* kópiaszám pozitív korrelációt mutatott mind a Rictor ( $\rho = 0,416$ ;  $P < 0,001$ ), mind a p-Akt ( $\rho = 0,289$ ;  $P < 0,01$ ) expressziójával. A Rictor és p-Akt expresszió között szintén erős pozitív korrelációt detektáltunk ( $\rho = 0,466$ ;  $P < 0,001$ ).

A 15 *RICTOR*-amplifikált esetből 14-ben (93%) IHC-val is Rictor pozitivitást detektáltunk (az expresszió 5 esetben magas, 9 esetben közepes volt), illetve a 15-ből 12 (80%) eset mutatott p-Akt IHC pozitivitást (5 esetben magas, 7 esetben közepes expresszió). Csupán egy *RICTOR*-amplifikált eset volt negatív mind a Rictor, mind a p-Akt IHC vizsgálata során. Ezzel szemben a 85 *RICTOR*-amplifikációt nem mutató – negatív vagy bizonytalan – esetből 23 (27%) volt Rictor IHC pozitív (9 esetben magas, 14 esetben közepes expresszióval), illetve 30 eset (35%) volt p-Akt IHC pozitív (11 esetben magas, 19 esetben közepes expresszióval). A *RICTOR* FISH-t gold standard eljárásnak tekintve a Rictor IHC szenzitivitása 93%, specificitása 73%; a p-Akt IHC szenzitivitása 80%, specificitása 65% volt.

A *RICTOR*-amplifikáció és a klinikopatológiai adatok között nem találtunk szignifikáns összefüggést, a Rictor ( $P < 0,001$ ) és a p-Akt ( $P = 0,09$ ) expressziója azonban szignifikánsan magasabb volt a távoli áttétekben, mint a nyirokesomó metasztázisokban vagy a primer tumorokban. A *RICTOR*-amplifikáció jelenléte nem mutatott összefüggést a teljes túléléssel. Ezzel szemben mind a Rictor ( $P = 0,007$ ), mind a p-Akt ( $P < 0,001$ ) magas expressziója szignifikánsan rövidebb teljes túléléssel társult azokkal az esetekkel összehasonlítva, amelyekben nem figyeltünk meg Rictor, illetve p-Akt expressziót.

*In vitro* vizsgálatainkban az mTOR-jelátvitel inhibitorainak hatását vizsgáltuk *RICTOR*-amplifikált vagy egyéb, PI3K/mTOR/Akt-jelút aktivitását érintő genetikai eltérést hordozó SCLC-kben.

A *RICTOR*-amplifikáció jelenlétét a sejtvonalakból készített sejtblokkok paraffinos metszetein vizsgáltuk. A H196 sejtvonalban igazoltuk a *RICTOR*-amplifikáció jelenlétét, míg a H1048, H146 és DMS153 sejtekben nem figyeltünk meg számbeli eltérést a *RICTOR* génben.

A vizsgált sejtvonalak eltérő ciszplatin érzékenységet mutattak. A *RICTOR*-amplifikált H196 sejtvonal ciszplatin-rezisztensnek, míg a *RICTOR* missense mutációt hordozó DMS153 sejtvonal ciszplatin-érzékenynek (~50%-os csökkentés,  $P < 0,05$ ) bizonyult.

Az mTORC1-gátló rapamycin a H196 sejtvonalban mérsékelt, a H1048 és H146 sejtvonalakban 40-50%-os proliferáció-csökkenést eredményezett, míg a *RICTOR*-mutáns DMS153 sejtvonal rapamycin-rezisztensnek bizonyult.

Az mTORC1/2-gátló PP242 és vistusertib hatását szintén vizsgáltuk. A PP242 a H196, H1048 és H146 sejtvonalakban nagymértékben csökkentette a proliferációt, a rapamycin-rezisztens DMS153 sejtekben azonban 20%-os csökkentést eredményezett. A vistusertib mind a 4 sejtvonalban jelentősen, legalább 40%-kal csökkentette a proliferációt.

A PI3K/mTOR inhibitor dactolisib a rapamycinhez hasonló hatást mutatott. Az pan-Akt-gátló ipatasertib egyik vizsgált SCLC sejtvonalban sem okozott jelentős proliferáció-csökkenést.

### **Az mTOR-jelátvitelhez és metabolikus folyamatokhoz kapcsolható fehérjék expressziója lymphangiomiomatosisban**

Az mTORC1/2 komplexekhez (p-S6 és Rictor), valamint a sejtek anyagcserefolyamataihoz (GLUT1, GAPDH, ATPB, GLS, ACSS2, MCT1, CPT1A) köthető markerek expresszióját vizsgáltuk 11 S-LAM esetben. Ezt ismert prekursor sejtek hiányában kontrollként a normál bronchiális simaizomsejtekben (BSM) megfigyelt expresszióval hasonlítottuk össze.

A LAM-sejtekben 11-ből 10 esetben (91%) magas p-S6 expressziót láttunk, jelezve az mTORC1 fokozott aktivitását. A Rictor expressziója a 11-ből 6 esetben (55%) volt magas, jelezve az mTORC2 jelentőségét ezekben az esetekben. Csupán egy olyan esetet találunk, ahol mind a p-S6, mind a Rictor expressziója alacsony volt. Ezzel szemben a BSM-sejtekben mindkét marker alacsony expressziót mutatott vagy nem fejeződött ki. A p-S6 és Rictor expresszió szignifikánsan magasabb volt a LAM-, mint a BSM-sejtekben ( $P < 0,01$ ).

GLUT1 pozitivitást a 11-ből 5 esetben (45%) figyeltünk meg, ezek közül csak egy esetben volt magas a GLUT1 expressziója a LAM-sejtekben. A BSM-sejtekben legfeljebb alacsony fokú expressziót mutattunk ki. A H-score-ok tekintetében a LAM- és BSM-sejtek között nem találtunk szignifikáns különbséget ( $P = 0,61$ ).

A GAPDH és az ATPB esetén a citoplazmatikus expressziót értékeltük. A LAM-sejtekben a GAPDH expressziója 7 esetben (64%), az ATPB expressziója 4 esetben (36%) volt magas. A BSM-sejtekben csak egy esetben figyeltünk meg magas ATPB expressziót (9%), a GAPDH expressziója pedig egy esetben sem volt intenzív. Az ATPB reakció H-score értékei nem mutattak szignifikáns különbséget a LAM- és BSM-sejtek között ( $P = 0,02$ ), míg a GAPDH expressziója szignifikánsan magasabb volt a LAM-sejtekben ( $P < 0,01$ ).

A GLS expresszióját a 11-ből 10 esetben (91%) figyeltük meg a LAM-sejtekben, az expresszió 7 esetben (64%) volt emelkedett. Ezzel szemben a BSM-sejtekben az esetek 91%-ában GLS expressziót nem figyeltünk meg. A GLS H-score értékek a LAM-sejtekben szignifikánsan magasabbak voltak, mint a BSM-sejtekben ( $P < 0,01$ ).

A CPT1A expresszió a LAM- és BSM-sejtekben egyaránt magas volt az összes vizsgált esetben. Összességében a H-score értékek alapján a CPT1A expresszió szignifikánsan magasabb volt a LAM-sejtekben, mint a BSM-sejtekben ( $P < 0,01$ ).

Míg a BSM-sejtekre nem volt jellemző sem az MCT1, sem az ACSS2 expressziója, addig 7 esetben (64%) magas MCT1, 9 esetben (82%) magas ACSS2 expressziót mutattunk ki a LAM-sejtekben. Ennek megfelelően az MCT1 és ACSS2 H-score értékek is szignifikánsan magasabbak voltak a LAM-sejtekben, mint a BSM-sejtekben ( $P < 0,01$ ).

Munkánk során a p-S6 és a Rictor, valamint a metabolikus folyamatokban kulcsszerepet játszó enzimek, transzporterek expressziója közötti összefüggéseket is vizsgáltuk. A LAM-sejtekben erős pozitív korrelációt figyeltünk meg a p-S6 és a GLS expressziója ( $\rho = 0,732$ ;  $P = 0,01$ ), valamint a Rictor és az ACSS2 expressziója ( $\rho$

= 0,849;  $P < 0,01$ ) között. A Rictor és ACSS2 közötti pozitív korreláció a BSM-sejtekben is megjelent ( $\rho = 0,769$ ;  $P < 0,01$ ).

A Rictor és az ATPB expressziója magasabb volt az explantált végállapotú tüdőkből, mint a betegség korábbi stádiumát reprezentáló diagnosztikus biopsziákban. A CPT1A expresszió és az ösztrogénreceptor pozitivitást között erős pozitív korrelációt figyeltünk meg a LAM-sejtekben ( $\rho = 0,808$ ;  $P < 0,01$ ). Egyéb összefüggést nem találtunk a vizsgált fehérjék expressziója és a klinikopatológiai adatok között.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK

### I. mTORC1/2 komplexek mennyiségével és aktivitásával összefüggő fehérjék immunhisztokémiai vizsgálata primer és agyi metasztatikus tüdő ADC-kben:

1. A p-mTOR, a p-S6 és a Rictor fokozott expressziója a primer tüdő ADC-k 30-40%-ára, az agyi áttétek 65-80%-ára jellemző, mindhárom marker expressziója szignifikánsan magasabb tüdő ADC-k agyi metasztázisaiban, mint primer tüdő ADC-kben.
2. Az mTOR-aktivitás az áttétképzés során fokozódik, a magas Rictor expresszió a primer tumorban jelezheti a későbbi áttétképzést.

### II. A *RICTOR*-amplifikáció és az mTORC2-aktivitás vizsgálata SCLC-kben:

1. A *RICTOR* amplifikáció esetén magasabb a Rictor és a p-Akt expresszió, a Rictor IHC magas szenzitivitással (93%) és közepes-magas specificitással (73%) használható a *RICTOR*-amplifikáció előszűrésére.
2. A Rictor expressziója szignifikánsan magasabb az SCLC-k távoli áttéteiben, mint a primer tumorokban, ami az mTORC2 potenciális szerepére utal az áttétképzés folyamatában.
3. A Rictor és a p-Akt magas szintje a *RICTOR*-amplifikáció jelenlététől függetlenül szignifikánsan rövidebb teljes túléléssel társul.
4. Az mTORC1/2-gátlók jelentős antiproliferatív hatással rendelkeznek a *RICTOR*-amplifikált és az PI3K/Akt/mTOR-jelátviteli út egyéb eltéréseit hordozó SCLC sejtvonalakban *in vitro*.

### **III. Az mTOR-jelátvitelhez és a tumormetabolizmushoz kapcsolódó fehérjék vizsgálata LAM-ban:**

1. A fokozott mTORC1-aktivitás mellett a magas Rictor expresszió az esetek több mint felében, valamint a magasabb Rictor expresszió a végállapotú tüdőkből vett mintákban az mTORC2-aktivitás jelentőségére utal a betegség patobiológiájában és progressziójában.
2. A LAM-sejtek anyagcseréjében a glutaminolízis, a zsírsavak  $\beta$ -oxidációja és az acetát-hasznosítás fontos szerepet játszhat, a p-S6 és a GLS, valamint a Rictor és az ACSS2 korrelációja pedig felveti, hogy az mTOR-gátlók terápiás hatásához a bioenergetikai folyamatok befolyásolása is hozzájárul.



## 6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények:

1.) **Krencz I**, Sebestyén A, Fábíán K, Márk Á, Moldvay J, Khor A, Kopper L, Pápay J. (2017) Expression of mTORC1/2-related proteins in primary and brain metastatic lung adenocarcinoma. *Hum Pathol*, 62:66-73. IF: 3,125

2.) **Krencz I** \*, Sebestyén A \*, Papay J, Jeney A, Hujber Z, Burger CD, Keller CA, Khor A. (2018) In situ analysis of mTORC1/2 and cellular metabolism related proteins in human lymphangioliomyomatosis. *Hum Pathol*, 79:199-207. (\* megosztott első szerzős közlemény) IF: 2,740

3.) **Krencz I**, Sebestyén A, Papay J, Lou Y, Lutz GF, Majewicz TL, Khor A. (2019) Correlation between immunohistochemistry and RICTOR fluorescence in situ hybridization amplification in small cell lung carcinoma. *Hum Pathol*, 93:74-80. IF: 2,740

4.) **Krencz I**, Sebestyén A, Khor A. (2020) mTOR in lung neoplasms. *Pathol Oncol Res*, doi: 10.1007/s12253-020-00796-1. [Epub ahead of print] IF: 2,433

### A disszertációtól független saját közlemények:

1.) Hujber Z, Petővári G, Szoboszlai N, Dankó T, Nagy N, Kriston C, **Krencz I**, Paku S, Ozohanics O, Drahos L, Jeney A, Sebestyén A. (2017) Rapamycin (mTORC1 inhibitor) reduces the production of lactate and 2- hydroxyglutarate oncometabolites in IDH1 mutant fibrosarcoma cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 36(1):74. IF: 6,217

2.) Hujber Z, Horváth G, Petővári G, **Krencz I**, Dankó T, Mészáros K, Rajnai H, Szoboszlai N, Leenders WPJ, Jeney A, Tretter L, Sebestyén A. (2018) GABA, glutamine, glutamate oxidation and

succinic semialdehyde dehydrogenase expression in human gliomas. *J Exp Clin Cancer Res*, 37(1):271. IF: 5,646

3.) Petővári G, Hujber Z, **Krencz I**, Dankó T, Nagy N, Tóth F, Raffay R, Mészáros K, Rajnai H, Vetlényi E, Takács-Vellai K, Jeney A, Sebestyén A. (2018) Targeting cellular metabolism using rapamycin and/or doxycycline enhances anti-tumour effects in human glioma cells. *Cancer Cell Int*, 18:211. IF: 3,439

4.) Petővári G, Dankó T, **Krencz I**, Hujber Z, Rajnai H, Vetlényi E, Raffay R, Pápay J, Jeney A, Sebestyén A. (2019) Inhibition of metabolic shift can decrease therapy resistance in human high-grade glioma cells. *Pathol Oncol Res*, doi: 10.1007/s12253-019-00677-2. [Epub ahead of print] IF: 2,433

## 7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Pápay Juditnak, hogy diákkörös éveim óta koordinálja tudományos tevékenységemet, bármikor fordulhattam hozzá kérdéseimmel, mindvégig támogatott szakmai munkámban.

Témavezetőmön kívül köszönettel tartozom Dr. Sebestyén Annának, aki munkacsoportjában bizalommal fogadott, tudását és tapasztalatait megosztva évek óta segíti és támogatja munkámat.

Köszönöm Dr. Khoór Andrásnak, hogy építő szakmai tanácsaira és véleményére mindig számíthattam. Pótolhatatlan segítsége nagyban hozzájárult a disszertációm alapját képező munkákhoz.

Köszönettel tartozom Matolcsy András professzor úrnak, hogy Ph.D. tanulmányaimat az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben végezhettem.

Szeretnék köszönetet mondani a Tumorbiológia Labor volt és jelenlegi munkatársainak, kiemelten Dankó Titanillának, Dr. Felkai Lucának, Dr. Hujber Zoltánnak, Dr. Hajdu Melindának, Dr. Márk Ágnesnek, Moldvai Dorottyanak, Dr. Nagy Noéminek, Petővári Gábornak, Raffay Reginának, Sztankovics Dánielnek és Dr. Vetlényi Enikőnek a baráti légkör és motiváló szakmai környezet kialakításáért. Szerencsés vagyok, hogy egy ilyen jó hangulatú, összetartó közösségben dolgozhattam.

Köszönöm Tracy Majewicz-nek a FISH vizsgálatokban nyújtott segítséget, Dr. Moldvay Juditnak és Dr. Fábíán Katalinnak az adenocarcinoma mintákat, valamint Dr. Döme Baláznak és Bárány Nándornak a kissejtes tüdőrák sejtvonalakat.

Köszönöm Dr. Krenács Tibornak, hogy dolgozatom házi bírálatát elvállalva hasznos javaslataival segítette munkámat.

Köszönöm férjemnek és szüleimnek, hogy mindvégig támogattak céljaim elérésében.

Köszönettel tartozom az Emberi Erőforrások Minisztériumának, a Magyar Tudógyógyász Társaságnak és a Tempus Közalapítványnak, hogy pályázataik révén támogatták tudományos munkámat.