

# mTOR komplex aktivitás és metabolikus változások mint potenciális célpontok szolid daganatokban

Doktori értekezés

**Petővári Gábor**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai tudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók:

Dr. Borka Katalin, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Péterfia Bálint, Ph.D., tudományos  
főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Szalai Csaba, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető

Dr. Cervenák László, Ph.D., tudományos  
főmunkatárs

Budapest  
2020

## 1. Bevezetés

A sejtek anyagcsere-folyamatainak szabályozása fontos szerepet játszik a biológiai változások bioenergetikai hátterének biztosításában. A metabolizmus – anyagcsere – olyan komplex folyamatok összessége, amelyek egyensúlyt teremtenek a felépítő (anabolikus) és lebontó (katabolikus) folyamatok között, miközben energiát és építőelemeket biztosítanak a szervezet növekedéséhez és fenntartásához. Eukarióta sejtekben a citrátciklus és az oxidatív foszforiláció (OXPHOS) a mitokondriumban zajlik, de számos egyéb folyamat (pl. glikolízis, fehérje-, és lipidbontás stb.) is segíti a bioenergetikai egyensúly fenntartását. A glükózhasznosítás fő útvonalai jól ismertek, a citoplazmában zajló glikolízis lépései után a legjobb hatékonyságú energiatermelést a mitokondriális folyamatok (citromsavciklus és OXPHOS) biztosítják. Oxigén hiányában vagy akár pszeudohipoxia esetén a glikolízis laktáttermelés mellett is képes energiát biztosítani (Warburg-effektus). A keletkező tejsavat a monokarboxilát transzporterek (MCT) szállítják az extracelluláris térbe, ahol a savas mikrokörnyezet is segíti a tumornövekedést. A glutamin is fontos energiaforrás lehet. Szerepe az anyagcsere-folyamatokban többféle, részt vesz a fehérje- és a nukleotidszintézisben, az N- és az O-glikolizációban, de a lebontásával bioenergetikai (glutamát) és transzamináz szubsztrátok is keletkeznek. A glutamin-glutamát átalakulást glutamináz (GLS) enzimek segítik. A glutamát fehérje- vagy nukleinsav beépülést követően vagy direkt módon  $\alpha$ -ketoglutarát ( $\alpha$ -KG) útján is hasznosulhat. Az  $\alpha$ -KG a citrátköri mitokondriális oxidációval az energiatermelésben vagy reverz úton

izocitrát-citrát átalakuláson keresztül a zsírsav-, és a lipidszintézisben is vehet részt. A sejt/szervezet a telített és a telítetlen zsírsavakat, lipideket a legkülönbözőbb módon használhatja fel (pl.  $\beta$ -oxidáció energianyerés, membránfelépítés), illetve raktározhatja is. Daganatok esetében a CPT1A fokozott termelése és aktivitása inkább a lipidlebontó (lipolitikus), mintsem a lipidszintetikus folyamatokkal áll összefüggésben.

Azok a sejtek, amelyek képtelenek alkalmazkodni a megváltozott bioenergetikai feltételekhez, átmeneti proliferációgátlást követően nekrozis, apoptózis vagy egyéb mechanizmusok útján elpusztulnak. Azok a sejtek azonban, amelyek metabolikusan is gyorsan alkalmazkodnak, előnyre tesznek szert a többivel szemben. Előbbiek alapján a metabolikus gátlószerek kombinálása a hagyományos kezelésekkel (akár kemo-, akár sugár- vagy célzott terápiás kezelések) vagy akár több metabolikus inhibitor kombinált hatásának vizsgálata segítheti a daganat terápia rezisztenciájának áttörését.

Az mTOR kináz funkcióinak, szabályozási szerepének megértését és vizsgálatát egyaránt nehezíti, hogy két komplexe (mTORC1 és C2) között strukturális, funkcionális és inhibitorokkal szembeni érzékenységekülönbségek is vannak. Az mTORC2-ben az mTOR kináz FKBP kötő része a fehérjekomplex belső részében található, így az FKBP12-rapamycin nem képes kötődni az mTORC2 komplexhez, az rapamycin rezisztens.

Az mTOR a jelátviteli hálózat központi részeként több olyan fehérjével és jelátviteli útvonallal is kapcsolatban áll, amelyeknek mutációi (pl. PI3K, TSC1/2, PTEN stb.), így nem megfelelő működése gyakori daganatokban és más kórfolyamatokban is. Az

mTORC1 célfehérjéi részt vesznek katabolikus és anabolikus folyamatok szabályozásában (fehérje-, zsírsav-, nukleotid- és ATP-szintézis, autofágia gátlása). Az mTORC1 legjobban ismert funkciója a fehérjeszintézis támogatása az eukarióta iniciációs faktor 4E-kötő fehérjék (4E-BP-k) és a p70 S6-kináz 1 (S6K1) foszforiláción keresztül. Az mTOR/mTORC1 az új membránok szintézisét a zsírsav- és a lipidfelépítő folyamatok fokozásán, míg a glükózanyagcserét (glükózfelvételt és lebontást) a kapcsolódó - glikolitikus – enzimek termelésének növelésén keresztül segíti elő. Előbbiekhez hasonlóan részt vesz a mitokondriális folyamatok és a pentóz-foszfát útvonal enzimeinek expressziójának szabályozásában is. Bioszintetikus építőelem- és energiabőség mellett gátolja az ULK1 és ATG13 autofagoszóma fehérjéket, kontrollálja a korai és késői autofágia lépéseit (pl. UVRAG). Az mTORC2 fő alkotóelemeinek kiütése gátolja a sejtváz átépülését, a kemotaxist és a migrációt, a PKC $\alpha$  foszforiláció elmaradásán keresztül. Az mTORC2-függő foszforilációs folyamatok szabályozzák a PDK1, SGK1 és az Akt kináz aktivitásokat is. A GSK3b aktivitásának fokozásával gátolja pl. az apoptózist és irányítja a glükózanyagcserét. Lényeges szerepe van még a stresszfaktorok elleni védelemben is.

A rapamycint felfedezését követően immunszuppresszáns szerként törzskönyvezték. Az mTOR kináz daganatbiológiai szerepének megismerése után jelenleg már a harmadik generációs gátlók fejlesztése és tesztelése zajlik. A rapamycin és származékai az FKBP12 fehérjén keresztül kötnek az mTORC1 komplexhez és gátolják a kináz aktivitását. Származékainak tumor indikációs területei: AML – temsirolimus; előrehaladott vesecarcinoma,

neuroendokrin tumorok, hasnyálmirigy-, emésztőrendszeri-, tüdődaganatok – everolimus. A rapalóg kezelések azonban klinikailag nem mindig sikeresek. A rapalógok az mTORC2 komplexre nem vagy kevésbé hatnak, sőt a jelátvitel visszacsatolási mechanizmusai miatt, akár fokozhatják is az mTORC2 aktivitását. A második generációs mTOR inhibitorok ATP-kompetitív gátlók, az mTORC1 és C2 komplexek hatásait egyaránt célozzák, illetve más jelátviteli kinázokat (pl. Akt) is gátolhatnak. Napjainkban a harmadik generációs gátlók vizsgálatai is zajlanak. A jelenlegi klinikai eredmények szerint azonban az mTOR gátlók önmagukban nem elég hatásosak, de más kezelésekkel kombinációban jobb hatékonyság várható. Tesztelik pl. a törzskönyvezett aromataz inhibitor kombináció mellett a trastuzumab (HER2+ ellenes terápiát) mTOR-gátló kombinációkat (pl. everolimus, ridaforolimus). A kombinációk a rezisztencia problémák áttörésében lehetnek sikeresek a jövőben, de ezek felhasználását a mellékhatás profilok és az egyéni érzékenység is befolyásolhatja.

Vizsgálatainkban – terápiás és mTOR hiperaktivitás szempontból is jelentős – két tumortípussal a magas malignitású, rossz prognózisú gliomákkal és az emlő adenocarcinomák eltérő molekuláris szubtypusaival foglalkoztunk.

A központi idegrendszer rosszindulatú daganatainak legnagyobb csoportját felnőttkorban a gliomák alkotják. Megkülönböztethetünk astrocytomákat, oligodendrogliomákat és ependymomákat. A grade I/II-es típusú astrocytomák jobban kezelhető, lassan növekvő tumorok, de transzformálódhatnak magasabb malignitású formákba. A grade III anaplasticus astrocytomák és a glioblastomák (grade IV) gyors, agresszív növekedésük

miatt nehezen kezelhetőek. A grade IV glioblastoma multiforme a leggyakoribb elsődleges agytumor, rendkívül agresszív, igen rövid túléléssel (átlagosan 15 hónap). Az előbbi csoportok molekuláris vizsgálatokkal további prognosztikai szempontból is fontos alcsoportra oszthatók. A gliomák 2016-os osztályozásának fontos tényezője az izocitrát-dehidrogenáz (IDH) gének funkciónyeréses mutációja, ami D-2-hidroxi-glutarát (2-HG) onkometabolit termeléshez vezet (tumornövekedést segítő epigenetikai és egyéb anyagcsere-változások). Az IDH mutáció grade II astrocytomákban és oligodendrogliomákban gyakran kimutatható, a primer glioblastomák (grade IV) esetében jelenléte jobb prognózissal társul. A jobb prognózisú IDH mutáns gliomákból pedig a progresszió során magasabb grádusú szekunder glioblastomák alakulhatnak ki. Ezekben egyes jelátviteli útvonalak fokozott aktivitása (PI3K/Akt/mTOR) és bizonyos gének amplifikációja (*MYC*, *MET*, *EGFR*) is megjelent.

Jelenleg a gliomák terápiájában sebészi, sugár- és kemoterápia (temozolomide) szerepel. A terápiás lehetőségek elég korlátozottak, az utóbbi évek fejlesztései (pl. bevacizumab és mTOR-gátló fázisvizsgálatok) ellenére sincs igazi áttörés. A gliomákban több metabolikus változást is megfigyeltek – a fokozott aerob glikolízis (Warburg-effektus) mellett, a glutaminolízist is. Az mTORC1/2 aktivitás a glikolízis és glutaminolízis szabályozásában is részt vesz. Számos *in vitro* és *in vivo* kísérlet is bizonyítja a dual, a harmadik generációs mTOR-inhibitorok és a temozolomide kombinációk potenciális tumornövekedés-gátló hatását glioma sejtekben. A PFKFB3 és a PDK1 a legígéretesebb glikolízis célpontok a glioblasztómákban.

A glioblasztoma sejtek metabolikus plaszticitása, a glikolitikus folyamatok OXPHOS irányú átrendeződése azonban sokszor gátat szabhat a metabolikus gátlószerek sikerének. A glutaminhasznosítási útvonalak jelentősége még kevésbé feltárt. A glutaminhasznosítás jelentősége az IDH1 mutáns daganatokban jól jellemzett, ezzel magyarázható a glutaminázgátlás kimutatott növekedésgátló hatása. Az is jól ismert, hogy az új sejtek keletkezését támogató *de novo* lipidszintézis mellett a glioma sejtek a mikrokoznyezetből exogén lipideket is képesek felvenni, lebontani és hasznosítani a mitokondriumban  $\beta$ -oxidációval. Előbbiek jelentőségét az is megerősíti, hogy az acetát, az ACSS2 expresszió fokozódás mellett szintén hasznosítható szénforrás lehet glioma sejtekben. Összefoglalva, a gliomákban a glikolízis fokozott, a glioma sejtek azonban képesek glutamin-, zsírsavak- és acetátfelhasználásra is, ami nagyfokú metabolikus alkalmazkodó képességet és további adaptációs mechanizmusokat jelent.

Az emlődaganatok kezelése sokat változott és fejlődött az elmúlt években. A rossz prognózisú, terápiarezisztens emlődaganatok kezelése azonban további fejlesztéseket és erőfeszítéseket kíván. Klinikai szempontból a hormonreceptor (HR) expresszió – ösztrogén- (ER) és progeszteronreceptor (PR) – és a humán epidermális növekedési faktor receptor 2 (HER2) expresszió alapján három nagy csoport különböztethető meg: HR-pozitív (HER2-negatív, kb. 70%), HER2-pozitív (ER-negatív vagy pozitív 10-20%) és tripla negatív (ER-, PR-, HER2-negatív 10-20%). Génexpressziós profil alapján azonban négy molekuláris altípust különíthetünk el: luminális A, luminális B, HER2-pozitív és bazális típus. Az emlőtumrok patomorfológiai jellemzésében és klinikai viselkedésében

fontos szempont a tumorsejtek és a bazális membrán egymáshoz viszonyított elhelyezkedése is. Ez alapján *in situ* (DCIS, LCIS), és invazív carcinomákat különíthetünk el. Prognosztikai szempontból a tumorstádium meghatározás fontos, ami függ a tumor méretétől (T), a környező nyirokesomók érintettségétől (N) és a távoli metasztázisok jelenlététől (M).

Az emlődaganatok gyógyszeres kezelésében a hagyományos kemoterápiás készítmények (pl. taxánok, antraciklinek) mellett a HER2-ellenes célzott kezelés és a hormonterápia kiemelt fontosságú.

Az emlődaganatok anyagcsere-útvonalainak vizsgálata alapján megfigyelhetők altípusoktól függő és független metabolikus jellegzetességek. Ezeknek az eredményeknek a rendszerezése és az emlődaganatok metabolikus szubtípusok szerinti osztályozása azonban még nem ismert. Egyes adatok alapján az ER+ emlődaganatokban fontos szerepe van a metabolikus szimbiózisnak, a reverz Warburg-effektusnak, ami oxidatív foszforilációs (OXPHOS) aktivitással függ össze. Gyakori, hogy az ER+ daganatos betegen endokrin terápia rezisztencia alakul ki. Az ER útvonal befolyásolhatja a glikolízist, a glutaminolízist és az OXPHOS-t szabályozó géneket. A HER2+ és tripla negítv (TN) emlőtumorokban általánosan magas a GLUT1 expresszió, amivel párhuzamosan fokozott az LDHA és MCT1 expresszió is megfigyelhető. A HER2+ tumorokra inkább a zsírsavak előállítása, míg a TN tumorokra a fokozott lipidfelvétel jellemző. A szöveti vizsgálatok az emlődaganatok glutamináz expressziójával kapcsolatban ellentmondásosak, nem lehet egyértelműen bizonyos altípusokhoz kötni a glutaminhasznosítást. Az eddigi megfigyelések alapján, a trastuzumab kezelés csökkenti a glükózfelvételt és a



laktát leadást, a Warburg-effektus intenzitását, illetve a lapatinib a GLUT1 és GLUT4 transzporterek kifejeződését. Ezek az aerob glikolízist gátló indirekt hatások összefüggnek a glikolízis gátlók (pl. GLUT1 inhibitor) esetében is megfigyelt *in vitro* tumornövekedés-gátló hatásokkal. A glutamináz inhibitorok csökkenthetik a tripla negatív sejtvonalak *in vitro* és *in vivo* növekedését. Zsírsavanyagcsere-gátlással (pl. FASN gátlás) eddig tumortípusfüggő és ellentmondó eredményeket is közöltek. A  $\beta$ -oxidáció gátlók sugárterápia rezisztens esetekben azonban nyújthatnak új lehetőségeket. Mitokondriális funkciókat gátló szerek pl. a metformin vagy bizonyos antibiotikumok (pl. doxycycline) off-target tumornövekedést csökkentő hatását is leírták már daganatokban. A metabolikus gátlószer kezelések monoterápiában nem, de a jelenlegi terápiák kiegészítéseként kombinációban segíthetik a terápiás fejlesztéseket.

## 2. Célkitűzés

Humán gliomák, emlődaganatok és sejtvonalak mTOR aktivitásának és metabolikus különbségeinek jellemzését, valamint glioma és emlőcarcinoma sejtvonalak mTOR és metabolikus gátlószerekkel szembeni érzékenységének vizsgálatát végeztük el.

Humán gliomás mintákban és sejtvonalakban az mTOR aktivitás és egyes metabolikus enzim fehérjék mennyiségi változásainak vizsgálata és összehasonlítása mellett tanulmányoztuk sejtvonalakban az intracelluláris metabolitkoncentráció különbségeket is. A glioma sejtvonalak mTOR inhibitor, temozolomide és metabolikus gátlószer érzékenységének és kombinációs kezelések *in vitro* hatásának vizsgálata.

Különböző szubtípusú humán emlődaganat sejtvonalak mTOR aktivitásának, metabolikus fehérje expresszió és intracelluláris metabolit koncentráció különbségeinek jellemzése. Előbbiek összehasonlítása az emlődaganat sejtvonalak *in vitro* mTOR inhibitor és metabolikus gátlószer érzékenységével. Alapozva az előbbi vizsgálatokra immunhisztokémiai markerek kiválasztása klinikai szövetminták metabolikus és mTOR aktivitás jellemzéséhez és a szöveti jellemzők összehasonlítása a betegek klinikopatológiai adataival. Emlődaganat modellekben mTOR és metabolikus gátlószer kombinációk hatásának vizsgálata *in vitro* és *in vivo*.

### 3. Módszerek

***In vitro* vizsgálatok** – a vizsgált sejtvonalak: U87 MG, U373-U MG, *IDH1* vad U251 MG és *IDH1* mutáns U251 MG humán high grade glioma sejtvonalak; MCF7, T47D (LumA); ZR75.1, BT474 (LumB); SKBR3, MDA-MB453 (HER2+); és MDA-MB231, MDA-MB468, BT549, HS578T (TN) emlő adenocarcinoma sejtvonalak. Az mTOR útvonal (rapamycin (Rapa), NVP-BEZ235, PP242, GDC-0068 (GDC)) és egyéb metabolikus folyamat gátlókat (BMS-303141, etomoxir, 3-brómpiruvát (3BP), BPTES doxycycline (Doxy) és chloroquine) teszteltünk. Kemoterápiás szerként a glioma sejtvonalak esetében temozolomide-ot (TMZ), míg az emlőcarcinoma sejtek vizsgálatában doxorubicint (Doxo) használtunk. A sejtkultúrák proliferációját Alamar Blue vagy szulforodamine B tesztekkel vizsgáltuk.

***In vivo* vizsgálatok:** a ZR75.1 xenograftokat SCID egerekben szubkután oltással hoztuk létre. Rapamune-, doxorubicin- és doxycycline-monoterápiás, Rapamune + doxorubicin és Rapamune + doxycycline kombinációs kezelések esetében a tumorméretet és a végleges tumortömegeket hasonlítottuk össze.

**Fehérjeszintű expressziós vizsgálatok:** formalinban fixált, paraffinba ágyazott biopsziás minták immunhisztokémiai (IHC) vizsgálata p-mTOR (Ser2448), p-S6 (Ser 235/236); Rictor; p-Akt-(Ser473), GLS, LDHA, CPT1A, FASN, ACSS2.

Az *in vitro* sejtvonalak fehérje expressziós vizsgálatához Western blot és WES Simple technikát is felhasználtunk. A Western blot analízisben anti- $\beta$ -aktint (mint loading kontrollt), és p-mTOR, p-S6, Rictor, Raptor, mTOR, S6, LDHA, GLS, GLUT1,  $\beta$ -F1-ATP-áz, GAPDH, pan-Akt,

p-(Ser473)-Akt, PFKP, HK2, ASCT2, LDHB, CPT1A, FASN, ACSS2, PDH, p-Acly, COXIV, LC3 és anti-p-AMPK elsődleges ellenanyagokat használtunk.

**Metabolitok meghatározása folyadékkromatográfia-tömegspektrometria módszerrel:** laktát-, piruvát-, citrát-,  $\alpha$ -KG-, szukcinát-, fumarát-, malát-, glutamát- és aszpartát-koncentrációkat kalibrációs görbék segítségével ng/10<sup>6</sup> sejt koncentrációban határoztuk meg

**Kaplan-Meier plotter adatainak elemzése:** a Kaplan-Meier Plotter adatbázis (KM-plotter; <http://www.kmplot.com>) segítségével hasonlítottuk össze/elemeztük az mTOR és a metabolikus útvonalak egyes enzimeinek mRNS-expressziós adatait emlőcarcinomás betegek adatai esetében.

**Statisztikai analízis:** Mann-Whitney U-tesztet, Fisher-tesztet, log-rank tesztet és Kaplan-Meier-görbe analízist használtunk a prognosztikai vizsgálatokhoz (IBM SPSS Statistics szoftver). A Hazard Ratio-t Cox regressziós és Student t-próbát is használtunk. A  $p \leq 0,05$ -öt tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## 4. Eredmények

### Humán glioma vizsgálatok

Az immunhisztokémiai vizsgálataink alapján a normál peritumorális cerebrumban (n=4), illetve az IDH vad és mutáns humán glioma mintákban (n=10 és n=8) a normál agyszövet alacsony mTOR aktivitásával szemben az IDH mutáns gliomák közepesen, míg az IDH vad típusú gliomák jelentősen emelkedett p-mTOR, p-S6 és (p-Ser473)-Akt fehérjemennyiséget mutattak. Az IDH vad típusú gliomákat – a GLS expresszió kivételével – kifejezetten magas általános metabolikus enzimexpresszió jellemezte (CPT1A, ACSS2, LDHA, FASN), ami szubsztrát felhasználásuk sokoldalúságára utal. Az emelkedett mTOR aktivitást jellemző fehérjék mennyiségével összefüggésben az mTORC1/C2 és dual mTOR inhibitorok szignifikánsan nagyobb proliferációgátlást mutattak, mint a rapamycin (Rapa) és a temozolomide (TMZ) a vizsgált négy glioma sejtvonalban. Az U87 és a genetikailag módosított IDH mutáns U251 sejtek bizonyultak a legkevésbé TMZ és mTORI érzékenynek *in vitro*. Az mTOR inhibitor kezeléseket a metabolikus folyamatok aktivitásváltozását jellemző enzimek közül a HK2, FASN és a GLS mennyiségét csökkentették, míg párhuzamosan a CPT1A és ACSS2 expresszióját fokozták. A TMZ metabolikus átrendeződést eredményező hatásai kevésbé voltak jellegzetesek és jelentősebb egyedi különbségeket mutattak a sejtekben. Az U251 vad és mutáns sejtvonalak alacsonyabb glikolitikus (HK2, LDHA) aktivitást és párhuzamosan magasabb GLS expressziót mutattak a másik két sejtvonalhoz képest. Az U251 vad és IDH mutáns sejtvonalak között jelentős különbséget a

metabolikus fehérjék expressziójában nem figyeltünk meg. A HK2 és LDHA mennyiségi különbségeivel összefüggésben a laktát/malát arány az U87 sejtekben volt a legmagasabb. A Rapa és chloroquine kezelések sejtvonalfüggő növekedés gátló hatásokat okoztak. A BPTES, a doxycycline (Doxy) és az etomoxir monoterápia kezelések sem proliferációs hatásokat sem jelentős fehérje vagy foszfo-protein expresszió változást nem mutattak. A TMZ rezisztencia esetében mTORC2 aktivitás eltolódást (fokozódó p-(Ser473)-Akt és Rictor expresszió), CPT1A és LC3 expresszió fokozódást figyeltünk meg. Rapa kezelést követően a várt mTOR aktivitás, mTORC2 aktivációt és a TMZ esetében is tapasztalt CPT1A és LC3 expresszió emelkedést tapasztaltuk. A chloroquine anti-proliferatív hatását más gátlószer, illetve a TMZ kombináció is fokozta. A Rapa hatásosabbnak bizonyult a kombinációkban, mint monoterápiában. Az U251 és U373-U sejtekben szinergista, az U87-ben additív volt a Rapa+TMZ hatása, illetve a Rapa+Doxy kombináció is sikeres volt. Fehérje szinten a FASN mennyisége csökkent, viszont párhuzamosan nem emelkedett a CPT1A szintje. A TMZ indukált mTORC1 aktivitás emelkedését a Rapa teljesen felfüggesztette, sőt az mTORC2 aktivitás – p-(Ser)-Akt – emelkedés is elmaradt. Az OXPHOS aktivitáshoz szükséges  $\beta$ -F1-ATP-áz mennyiségét is jelentősen csökkentette az egyébként igen hatékony Rapa+TMZ kombináció, a terápiás szempontból is érdekes TMZ rezisztencia áttörésében.

## Humán emlőcarcinoma vizsgálatok

Tíz emlőcarcinoma sejtvonala mTOR és metabolikus fehérje expresszió változását is vizsgáltuk

mTOR és más metabolikus gátlószerekkel *in vitro*. Az mTOR aktivitással összefüggő fehérjék változásait és a gátlószerek (Rapa, PP242, GDC) proliferációs hatását együtt értékeltük. A leghatékonyabb proliferációgátló hatást a PP242, mTORC1 és C2 gátló kezelések után tapasztaltunk. A metabolikus gátlószerek közül a 3BP glikolízisgátló bizonyult a leghatásosabbnak. A tíz sejtvonalból három tripla negatív (MDA-MB468, BT549, HS578T) bizonyult a leginkább Warburg-fenotípusúnak az intracelluláris laktát/malát arány alapján. Az összes sejtvonalban jellemzően magas LDHA fehérje expressziót figyeltünk meg, míg az LDHB mennyisége jelentősebb egyedi különbségeket mutatott. A FASN inkább a nem-tripla negatív csoportokban volt magasabb, míg a magas CPT1A és az ACS2 mennyisége valamennyi sejtvonaltípust jellemezte. Ezek alapján altípustól függetlenül az emlőcarcinoma sejtvonalak jelentős egyedi metabolikus eltéréseket mutatnak.

Az emlődaganatok mTOR és metabolikus aktivitásának *in situ* szöveti jellemzéséhez közel 100 humán biopsziás mintában, a p-S6, a Rictor, az LDHA, a GLS, a CPT1A, a FASN fehérjék szöveti mennyiségét, eloszlását vizsgáltuk összevetve a klinikopatológiai adatokkal. A normál szövetekhez hasonlóan magas Rictor szint volt megfigyelhető a tumorsejtekben is, viszont fokozott p-S6, FASN és CPT1A expresszió csak a vizsgált daganatsejteket jellemezte. Intra- és intertumorális különbség a p-S6 IHC festésekben volt a legjellemzőbb. Homogén citoplazmatikus LDHA és granuláris, mitokondriális GLS expresszió jellemezte a normál és a tumoros szöveteket is. A betegeket alacsony és magas H-score értékű csoportokba osztottuk az adott festésekhez tartozó medián H-score értékek alapján. A Warburg-glikolízis, az emelkedett LDHA expresszió a

HR-, míg a magas CPT1A és FASN expresszió a HR+ státusszal mutatott szignifikáns összefüggést. A magas p-S6 a távoli metasztázis kialakulásával és a betegek korával szubtípustól függetlenül a rövidebb metasztázismentes, valamint rövidebb teljes túléléssel függött össze. Míg az LDHA a szubtípusokkal, a grádussal és a stádiummal mutatott szignifikáns összefüggést. Tendenciában jelentős különbséget mutatott a CPT1A és FASN H-score értékek és túlélési adatok elemzése is. A magasabb CPT1A a rosszabb, míg a FASN a jobb prognózissal függött össze. Kombináltan is értékeltük az mTOR aktivitást és a többi metabolikus útvonal markereket. Jó metabolikus alkalmazkodási képességűnek értékeltük azokat az eseteket, amelyeknél az emelkedett mTOR aktivitással összefüggő H-score érték mellett még legalább két másik metabolikus útvonal enzim expressziójának H-score értéke magas volt. Ezek alapján a jó metabolikus alkalmazkodási képesség a rövidebb távoli metasztázismentes és teljes túléléssel függött össze. A KM-plotter adatbázis mRNS expressziós, túlélési és klinikai adatainak elemzésével is megerősítettük eredményeinket.

A gliomák esetében a leghatásosabbnak bizonyult kezeléseket teszteltük a ZR75.1 LumB humán emlőtumor sejteken *in vitro* és *in vivo*. A vizsgált három kombináció (Rapa+Doxy, Rapa+Doxo, Doxo+Doxy) szignifikánsan csökkentette a sejtek proliferációját a monoterápiákhoz képest *in vitro* vizsgálatainkban. *In vivo* leghatásosabbnak a Rapa+Doxy kezelés bizonyult, ami az első *in vivo* eredmény a rapamycin és a doxycycline *in vivo* tumornövekedés-gátló hatásával kapcsolatban.



## 5. Következtetések

*Humán glioma szövetek és sejtvonalak mTOR aktivitásával és metabolikus jellegzetességeivel kapcsolatos eredmények:*

1. A normál agyszövet alacsonyabb mTOR aktivitásához képest a gliomák progressziójával összefüggő mTORC1 és mTORC2 komplex aktivitás emelkedést figyeltünk meg. IDH mutáns gliomákban mérsékelten, míg az IDH vad típusú gliomákban jelentősen emelkedett mTOR aktivitást írtunk le.

2. Az mTOR aktivitásokkal párhuzamosan a CPT1A és ACSS2 fehérjék szöveti mennyisége is emelkedett a gliomákban. Előbbiek mellett az IDH vad típusú szövetekben jelentős általános metabolikus enzim expresszió emelkedést tapasztaltunk. Ezek az eredmények a high grade gliomák nagyfokú bioenergetikai alkalmazkodóképességére és a glükóz mellett egyéb tápanyaghasznosítási útvonalak jelentőségére hívják fel a figyelmet.

3. A glioma sejtvonalak monoterápiás temozolomide, mTOR inhibitor és egyéb metabolikus gátlószerekkel szembeni alacsony érzékenysége összefügg az *in vitro* kimutatott metabolikus enzim expressziós változásokkal (metabolikus plaszticitás) és az mTOR komplex aktivitás átrendeződésekkel, az mTORC2 aktivitás irányú eltolódással.

4. Egyszerre több gátlószer, anti-metabolikus kezelés kombinációk, az előbbi metabolikus átrendeződéseket meggátolva jelentősen fokozzák a tumornövekedést gátló hatásokat glioma sejtvonalakban. A temozolomide+rapamycin mellett más rapamycin+antimetabolikus gátlószer kombinációk (pl.

rapamycin+doxycycline vagy rapamycin+chloroquine kezelések) komplex additív, szinergista hatásai jelentősen növelik a tumornövekedés gátló hatásokat, növelhetik a jelenlegi kezelések hatékonyságát.

*Különböző szubtypusú emlődaganat sejtvonalak és humán biopsziás minták mTOR és metabolikus jellemzésével kapcsolatos eredmények:*

1. A vizsgált emlődaganat sejtvonalakat egyedi, szubtypustól független mTOR aktivitás és metabolikus enzimexpresszió és ezzel összefüggő *in vitro* inhibitor érzékenység különbségek jellemzik.

2. A vizsgált sejtvonalak metabolikus enzim expressziós profilja és intracelluláris metabolit koncentrációi alapján a Warburg-fenotípus jobb prognózisú szubtypusokban is lehet jellemző.

3. *In vitro* vizsgálataink alapján kiválasztott hat IHC festés (p-S6, Rictor, GLS, LDHA, CPT1A, FASN) segítségével az emlődaganatok mTOR aktivitása és metabolikus plaszticitása alapján:

a. A magas mTOR aktivitás, magas p-S6 H-score érték szubtypustól független összefüggést mutat a betegek rövidebb metasztázismentes és teljes túlélésével.

b. Az LDHA expresszió (Warburg-glikolízis) jellegzetesebb a HR- szubtypusokban.

c. A magas CPT1A expresszió a rosszabb, míg a magas FASN expresszió az emlődaganatos betegek jobb prognózisával függ össze.

d. A vizsgált hat festés együttes, a metabolikus plaszticitás értékelése segítheti a szubtypus alapján jó prognózisú HR+ emlődaganatok esetében a szorosabb követést igénylő betegek meghatározását vagy jövőbeni terápiájuk, a relapszust követő kezelés átgondolását.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények:

- 1.) 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. Targeting cellular metabolism using rapamycin and/or doxycycline enhances anti-tumour effects in human glioma cells. *Cancer Cell Int.* 2018 Dec 19; 18:211. doi: 10.1186/s12935-018-0710-0. eCollection 2018. IF: 3,439
- 2.) Petővári G, Dankó T, Krencz I, Hujber Z, Rajnai H, Vetlényi E, Raffay R, Pápay J, Jeney A, Sebestyén A. Inhibition of Metabolic Shift can Decrease Therapy Resistance in Human High-Grade Glioma Cells. *Pathol Oncol Res.* 2019 Jun 11. doi: 10.1007/s12253-019-00677-2. [Epub ahead of print]. IF: 2,433
- 3.) Petővári G, Dankó T, Tőkés AM, Vetlényi E, Krencz I, Raffay R, Hajdu M, Sztankovics D, Vellai-Takács K, Jeney A, Kulka J and Sebestyén A. In situ metabolic characterisation of breast cancer and its potential impact on therapy. Under review
- 4.) 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
- 5.) 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

A disszertációtól független saját közlemények:

1.) Hujber Z, Jeney A, Oláh J, Szoboszlai N, Baranyai L, Környei J, Petővári G, Sebestyén A. (2015) Measuring <sup>14</sup>C-glucose and <sup>14</sup>C-acetate oxidation in tumour cells and tumorous host organism. *Magyar Onkol*, 59 (4); 292-301.

2.) Sticz T, Molnár A, Dankó T, Hujber Z, Petővári G, Nagy N, Végső G, Kopper L, Sebestyén A. The Effects of Different mTOR Inhibitors in EGFR Inhibitor Resistant Colon Carcinoma Cells. *Pathol Oncol Res*. 2019 Oct; 25 (4):1379-1386. doi: 10.1007/s12253-018-0434-4. Epub 2018 Jun 7. IF: 2,433

## **7. Köszönetnyilvánítás**

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Sebestyén Annának, aki a Ph.D. hallgatói munkámban mindvégig mellettem állt, tanított, támogatott, és biztosította fejlődésemhez és kutatásomhoz a szükséges feltételeket.

Köszönöm Dr. Matolcsy András intézetvezetőnek, hogy Ph.D. kutatásaimat az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben végezhettem.

Köszönöm a Ph.D. munkámban nyújtott segítséget a Tumorbiológiai labor jelenlegi és volt munkatársainak, az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet munkatársainak és azoknak, akik ötleteikkel és tanácsaikkal mindvégig támogattak.

Köszönettel tartozom Dr. Krenács Tibornak, hogy elvállalta dolgozatom házi bírálatát.