

**SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA**

Ph.D. értekezések

3155.

SZTANKOVICS DÁNIEL

Onkológia
című program

Programvezető: Dr. Bödör Csaba, egyetemi tanár
Témavezetők: Dr. Sebestyén Anna, kutatóprofesszor

Az mTOR-hiperaktivitás és *RICTOR*-amplifikáció célzott terápias jelentősége rosszindulatú daganatokban

Doktori értekezés

Sztankovics Dániel

Semmelweis Egyetem
Patológia és Onkológia Doktori Tagozat



Témavezető: Dr. Sebestyén Anna, DSc, kutatóprofesszor

Hivatalos bírálók: Dr. Bugyik Edina, PhD, tudományos munkatárs
Dr. Szebeni Gábor János, PhD, tudományos
főmunkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Losonczy György, DSc, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Komlósi Zsolt István, PhD, egyetemi docens
Rubovszkyné Dr. Gallai Mónika, PhD, biológus

Budapest
2024

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS	9
1.1. A daganatok jellegzetességei mint potenciális terápiás célpontok	9
1.2. A PI3K/Akt/mTOR-hiperaktivitás szabályozó szerepe és jelentősége a daganatokban	10
1.2.1. Az mTOR-kináz felfedezésének története.....	10
1.2.2. Az mTOR-komplexek szerepe és szerkezeti felépítése.....	12
1.2.3. Az mTOR-kináz hiperaktivitása és a háttérben álló genetikai eltérések	14
1.2.4. Az mTOR-hiperaktivitás <i>in situ</i> karakterizálása	19
1.3. A Rictor szerepe a daganatprogresszióban és a metasztázisok kialakulásában	20
1.3.1. A Rictor jelentősége a tumorsejtek epithelialis-mesenchymalis átmenetében és migrációjában.....	23
1.3.2. További Rictor-asszociált fehérjekomplexek	24
1.3.3. A <i>RICTOR</i> -amplifikáció, a Rictor-expresszió és az mTORC2-aktivitás vizsgálatának módszerei	24
1.4. Tüdődaganatok kialakulásának, progressziójának genetikai háttere és az ezzel összefüggő mTOR-aktivitást érintő változások.....	25
1.4.1. A tüdődaganatok incidenciája	25
1.4.2. A tüdődaganatok típusai, osztályozásai.....	26
1.4.3. A tüdődaganatok leggyakoribb „ <i>driver</i> ” mutációi és az mTOR jelátviteli útvonalat érintő genetikai eltérései	27
1.4.4. A kissejtes tüdőcarcinoma jellegzetességei, új molekuláris szubtípus besorolásai és célzott terápiás lehetőségei.....	30
1.5. Célzott terápiás lehetőségek mTOR-hiperaktivitás és/vagy <i>RICTOR</i> -amplifikáció jelenlétében.....	34
1.5.1. Az mTOR-gátlók fejlesztése tüdődaganatokban	37
2. CÉLKITŰZÉSEK	39
3. MÓDSZEREK	40
3.1. Vizsgált betegcsoportok.....	40

3.1.1.	Az újgenerációs szekvenálási vizsgálatokba bevont betegek – NGS-kohorsz	40
3.1.2.	Kissejtes tüdődaganatos betegek – SCLC-kohorsz	40
3.1.3.	Szöveti multiblokkok készítése az agyi metasztatikus SCLC-mintákból	41
3.2.	Molekuláris genetikai vizsgálatok	41
3.2.1.	Újgenerációs szekvenálás és bioinformatikai elemzés	41
3.2.2.	<i>RICTOR</i> -amplifikáció vizsgálata fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizációval	42
3.2.3.	<i>RICTOR</i> -kópiaszám-változás vizsgálata Droplet Digital PCR-rel	43
3.3.	Fehérjeexpressziós vizsgálatok	44
3.3.1.	Az mTOR- és molekuláris szubtípus markerek immunhisztokémiai vizsgálata	44
3.3.2.	Az immunhisztokémiai festések értékelése	45
3.3.3.	Az mTOR-markerek vizsgálata Wes TM Simple módszerrel	46
3.4.	<i>In vitro</i> vizsgálatok humán SCLC-sejtvonalakon	47
3.4.1.	Sejt- és szövettenyésztés	47
3.4.2.	Kemoterápiás és mTOR-gátló kezelések proliferációgátló hatásainak vizsgálata az SCLC-sejtvonalakon <i>in vitro</i>	48
3.4.3.	<i>In vitro</i> proliferációs tesztek	49
3.4.4.	Sejtblokk-készítés	49
3.5.	Xenograft vizsgálatok és <i>in vivo</i> kezelések	50
3.6.	Statisztikai analízis	50
3.7.	Vizsgálatainkhoz szükséges engedélyek	51
4.	EREDMÉNYEK	52
4.1.	A <i>RICTOR</i> -amplifikáció előfordulásának vizsgálata a különböző daganatokban és SCLC-kben	52
4.1.1.	A TSO500 NGS-sel kimutatott <i>RICTOR</i> gén kópiaszám-változások háttérben álló feltételezett amplifikáció validálása és vizsgálata különböző daganatokban	52

4.1.2. <i>RICTOR</i> -kópiaszám és az mTOR-aktivitás változásának vizsgálata párosított betegmintákban az SCLC progressziójával összefüggésben.....	59
4.2. Az mTOR-aktivitás és a molekuláris szubtypus markerek vizsgálata primer és agyi metasztatikus SCLC-kben	61
4.2.1. mTORC1- és mTORC2-markerek <i>in situ</i> expressziójának vizsgálata primer és agyi metasztatikus SCLC betegmintákban.....	61
4.2.2. Molekuláris szubtypus markerek és az mTOR-aktivitás <i>in situ</i> expresszióinak összefüggései primer és agyi metasztatikus SCLC betegmintákban	65
4.3. Az mTOR-aktivitás, a <i>RICTOR</i> -amplifikáció, valamint az mTOR-gátlókkal szembeni érzékenység vizsgálata humán SCLC-sejtvonalakban	68
4.3.1. PI3K/Akt/mTOR-gátlók <i>in vitro</i> proliferációgátló hatásainak vizsgálata a <i>RICTOR</i> -amplifikáció és más az mTOR-jelátvitelt érintő genetikai eltérésekkel összefüggésben	68
4.3.2. <i>In vivo</i> humán SCLC xenograft tumorok mTOR-aktivitásának, illetve <i>RICTOR</i> -kópiaszám változásának vizsgálata kemoterápiás kezelés és hosszútávú fenntartás során.....	73
5. MEGBESZÉLÉS	76
5.1. Újonnan validált, <i>RICTOR</i> -amplifikációval rendelkező daganattípusok.....	76
5.2. Az mTOR-markerek expressziójának változásai és összefüggései a molekuláris szubtypus markerekkel primer és agyi metasztatikus SCLC betegmintákban.....	79
5.3. Az mTOR-aktivitás és <i>RICTOR</i> -amplifikáció vizsgálata humán SCLC-sejtvonalakban <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i>	81
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	83
7. ÖSSZEFOGLALÁS	85
8. SUMMARY	86
9. IRODALOMJEGYZÉK	87
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	120
10.1. A disszertáció alapját képező saját közlemények	120
10.2. A disszertációtól független saját közlemények.....	120
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	124

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

4EBP1 – *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*

AB – alamarBlue™

AC – atípusos carcinoid, *atypical carcinoid*

AGC – *protein kinase A, G, and C families*

Akt – *protein-kináz B, protein kinase B*

AKT1-3 – *AKT serine/threonine kinase 1-3 (gene)*

ALK – *anaplastic lymphoma kinase (gene)*

AMPK – *5' AMP-activated protein kinase*

ASCL1 – *achaete-scute homologue 1*

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATG13 – *autophagy-related protein 13*

ATG14L – *autophagy-related protein 14L*

ATP – *adenozin-trifoszfát, adenosine triphosphate*

BCL – *binary base call*

Bcl-2 – *B-cell leukemia/lymphoma 2*

BRCA1 – *breast cancer 1 (gene)*

CCND1-E1 – *cyclin D1-E1 (gene)*

CDK4/6 – *cyclin-dependent kinase 4 and 6*

CDKN2A – *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (gene)*

CHK1 – *checkpoint kinase 1*

Chr5 – *5. kromoszóma, chromosome 5*

CI – *kombinációs index, combination index*

CNV – *kópiaszám-változás, copy number variation*

COVID-19 – *koronavírus-betegség 2019, coronavirus disease 2019*

DDIT4 – *DNA damage inducible transcript 4 (gene)*

ddPCR – *Droplet Digital PCR*

Deptor – *DEP domain containing mTOR-interacting protein*

DLL3 – *delta-like ligand 3*

DNS – *dezoxiribonukleinsav, deoxyribonucleic acid*

EDTA – *etilén-diamin-tetraecetsav, ethylenediaminetetraacetic acid*

EGFR – epidermális növekedési faktor receptor; *epidermal growth factor receptor*
 EGFR-TKI – EGFR tirozin-kináz-gátló, *EGFR tyrosine kinase inhibitor*
 eIF4B-E – *eukaryotic translation initiation factor 4B-E*
 EMT – epithelialis-mesenchymalis átmenet, *epithelial-mesenchymal transition*
 ER – ösztrogénreceptor, *estrogen receptor*
 ERBB2-3 – *Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2-3 (gene)*
 ERCC1-2 – *excision repair cross-complementation group 1-2 enzyme (gene)*
 Erk5 – *extracellular signal regulated kinase 5*
 ESR1 – ösztrogénreceptor 1 (gén), *estrogen receptor 1 (gene)*
 FAT domén – *FRAP, ATM, TRRAP*
 FATC domén – *C-terminal FAT domain*
 FBXW7 – *F-box/WD repeat-containing protein 7*
 FDA – Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala, *U.S. Food and Drug Administration*
 FFPE – formalin-fixált és paraffinba ágyazott, *formalin-fixed paraffin-embedded*
 FGF3-19 – *fibroblast growth factor 3-19 (gene)*
 FGFR1-4 – *fibroblast growth factor receptor 1-4 (gene)*
 FIP200 – *FAK family-interacting protein of 200 kDa*
 FISH – fluoreszcens *in situ* hibridizáció, *fluorescence in situ hybridisation*
 FKBP – *FK506 binding protein*
 FKBP12 – *12-kDa FK506-binding protein*
 FOXO1 – *Forkhead box protein O1*
 FRB domén – *FKBP12-rapamycin binding*
 GAPDH – gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
 Grb10 – *growth factor receptor-bound protein 10*
 H&E – hematoxilin és eozin, *haematoxylin and eosin*
 HEAT – *Huntingtin, elongation factor 3 (EF3), protein phosphatase 2A (PP2A), TOR1*
 HER2 – *human epidermal growth factor receptor 2 (gene)*
 HIF1α – *hypoxia inducible factor 1 alpha (gene)*
 HPV – humán papillomavírus, *human papillomavirus*
 H-score – *histochemical scoring*

ICC – immuncitokémia, *immunocytochemistry*
 IDH – izocitrát-dehidrogenáz, *isocitrate dehydrogenase*
 IDO – *indoleamine 2,3-dioxygenase*
 IGF1 – inzulinszerű növekedési faktor 1, *insulin-like growth factor 1*
 IGF1R – IGF1-receptor
 IHC – immunhisztokémia, *immunohistochemistry*
 ILK – *integrin-linked kinase*
 INSM-1 – *insulinoma-associated protein 1*
 IRS1 – inzulin receptor szubsztrát 1, *insulin receptor substrate 1*
 JAK2 – *Janus kinase 2 (gene)*
 KEAP1 – *Kelch-like ECH-associated protein 1 (gene)*
 Ki67 – Kiel 67
 KRAS – *Kirsten rat sarcoma virus (gene)*
 LCNEC – nagysejtes neuroendokrin tüdőcarcinoma, *large cell neuroendocrine carcinoma*
 MAPK/ERK – *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*
 MDM2-4 – *mouse double minute 2-4 homolog (gene)*
 MEK – *mitogen-activated protein kinase kinase*
 MET – mesenchymalis-epithelialis átmenet, *mesenchymal–epithelial transition*
 MGMT – *O6-methylguanine-DNA methyltransferase (gene)*
 mLST8 – *mammalian lethal with sec-13 protein 8*
 mSin1 – *mammalian stress-activated MAP kinase-interacting protein 1*
 mTOR – *mechanistic target of rapamycin*
 mTORC1 – mTOR-komplex 1, *mTOR complex 1*
 mTORC2 – mTOR-komplex 2, *mTOR complex 2*
 NCCN – National Comprehensive Cancer Network
 NE – neuroendokrin, *neuroendocrine*
 NeuroD1 – *neurogenic differentiation factor 1*
 NF1 – *neurofibromatosis type 1 (gene)*
 NGS – újgenerációs szekvenálás, *next-generation sequencing*
 NOS – *not otherwise specified*
 NSCLC – nem-kissejtes tüdőcarcinoma, *non-small cell lung carcinoma*

NST – *no special type*

p – foszforilált, *phosphorylated*

PARP – *poly (ADP-ribose) polymerase (gene)*

PBS – foszfátpuffer, *phosphate buffered saline*

PCR – polimeráz-lánreakció, *polymerase chain reaction*

PDCD4 – *programmed cell death protein 4*

PDGFRA – *platelet-derived growth factor receptor alpha (gene)*

PK1 – *phosphoinositide-dependent kinase-1 (gene)*

PD-L1 – programozott halál-ligandum 1, *programmed death-ligand 1*

PI3K – *phosphoinositide 3-kinase*

PIK3CA-B – *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha-beta (gene)*

PIP2 – foszfatidilinozit-4,5-biszfoszfát, *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*

PIP3 – foszfatidilinozit (3,4,5)-triszfoszfát, *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*

PKC α - ζ – *protein kinase C alpha-zeta*

POU2F3 – *POU class 2 homeobox 3*

PPAR γ – *peroxisome proliferator-activated gamma*

PR – progeszteronreceptor, *progesteron receptor*

PRAS40 – *proline-rich Akt substrate of 40 kDa*

Protor 1/2 – *protein observed with rictor 1 and 2*

PTEN – *phosphatase and tensin homolog (gene)*

Raf – *rapidly accelerated fibrosarcoma*

RAG – *recombination-activating genes*

rapalógok – rapamycin és származékai

Raptor – *regulatory-associated protein of mTOR*

Ras – *rat sarcoma virus*

RB1 – *retinoblastoma protein 1 (gene)*

Rheb – *Ras homolog enriched in brain*

RhoA – *Ras homolog family member A*

Rictor – *rapamycin-insensitive companion of mTOR*

RPS6KB1 – *ribosomal protein S6 kinase beta-1 (gene)*

RPTOR – *regulatory-associated protein of mTOR (gene)*

Rsk – *ribosomal S6 kinase*

RTK – receptor tirozin-kináz, *receptor tyrosine kinase*

S6 – *ribosomal protein S6*

S6K1 – *ribosomal protein S6 kinase beta-1*

SCID – súlyos kombinált immundeficientia, *severe combined immunodeficiency*

SCLC – kissejtes tüdőcarcinoma, *small cell lung carcinoma*

SDHA – *succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (gene)*

SGK1 – *serum/glucocorticoid regulated kinase 1*

siRNS – kis interferáló RNS, *small interfering RNA*

SKAR – *S6 kinase Aly/REF-like target*

SRB – *sulforhodamine B*

SREBP1 – *sterol regulatory element-binding protein 1*

SSC – *saline-sodium citrate*

STK11 – *serine/threonine kinase 11 (gene)*

TC – típusos carcinoid, *typical carcinoid*

TC% – tumorsejtek százalékos aránya, *percentage of tumour cells*

TCGA – *The Cancer Genome Atlas*

TERT – *telomerase reverse transcriptase (gene)*

TFE3 – *transcription factor binding to IGHM enhancer 3*

TFEB – *transcription factor EB*

TFRC – *transferrin receptor (gene)*

TGFβ1 – transzformáló növekedési faktor béta 1, *transforming growth factor beta 1*

TMA – szöveti multiblokk, *tissue microarray*

TOR1-2 – *target of rapamycin 1-2 (gene)*

TSC1/2 – *tuberous sclerosis complex 1 and 2 (gene)*

TSO500 – Illumina TruSight Oncology 500 High Throughput assay

TTF-1 – *thyroid transcription factor 1*

ULK1 – *Unc-51-like kinase 1*

UVRAG – *ultraviolet radiation resistance-associated (gene)*

WHO – Egészségügyi Világszervezet, *World Health Organization*

Wnt – *wingless-related integration site*

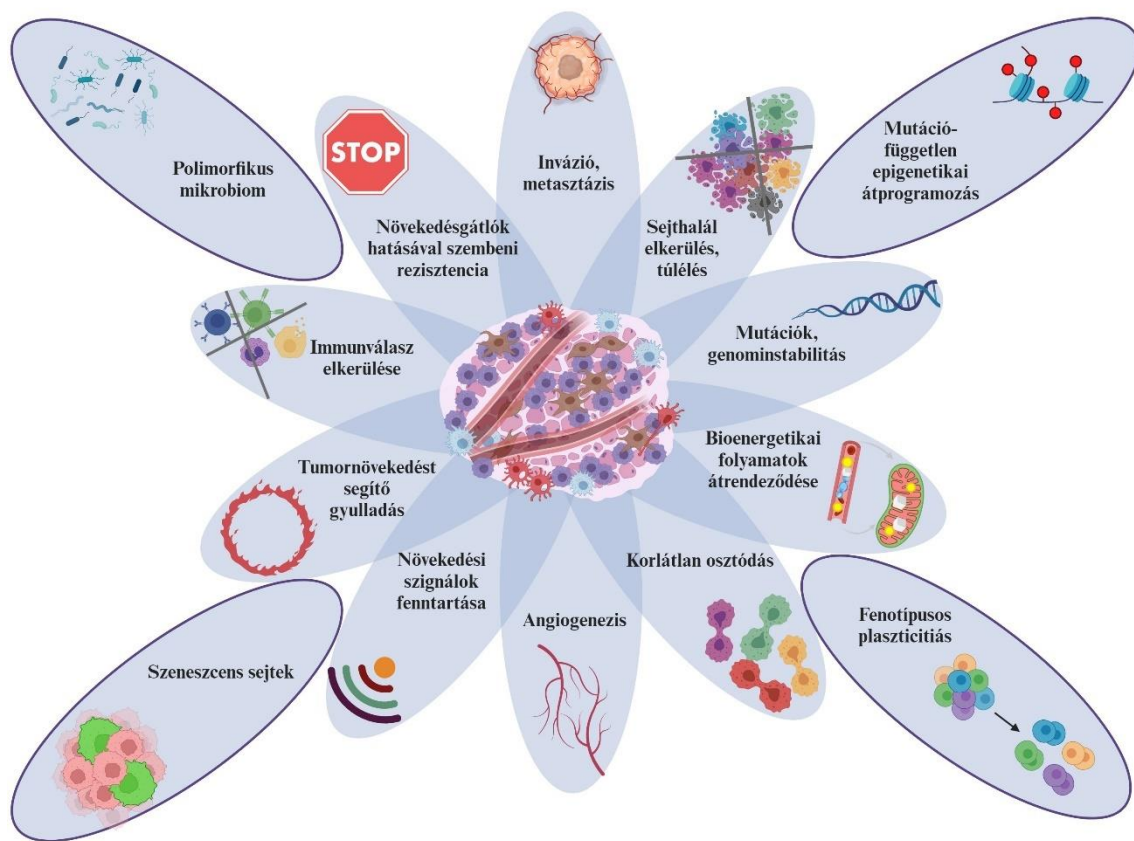
YAP1 – *yes-associated protein 1*

1. BEVEZETÉS

1.1. A daganatok jellegzetességei mint potenciális terápiás célpontok

Hanahan és Weinberg először 24 évvel ezelőtt, 2000-ben foglalta össze azokat a jellegzetességeket, amelyek a daganatos sejtekre, szövetekre jellemzők. Ezek közé tartoznak a proliferáció korlátlan fenntartása, a folyamatos túlélés biztosítása, az apoptózis gátlása, az angiogenezis, valamint az invázió és a metasztázisképződés támogatása [1]. Az elmúlt évtizedek kutatási eredményei alapján a felsorolt jellemzők több alkalommal is kiegészültek (**1. ábra**). 2011-ben négy új elemmel bővültek, melyek a következők voltak: a daganatsejtek bioenergetikai folyamatainak átprogramozása, a tumorelles immunválasz elkerülése, a daganatot támogató gyulladásos folyamatok kialakulása és fenntartása, valamint a genominstabilitás és a mutációk megjelenése [2]. *Hanahan* 2022-ben újabb négy tényezővel egészítette ki a korábban összefoglalt tulajdonságokat. Kiemelte a mutációktól független epigenetikai változásokat, a szeneszscens sejtek kialakulását, a daganatsejtek fenotípusos plaszticitását, valamint a szövetekben, szervezetben megváltozó mikrobiom-összetételt [3].

A tumorsejtek korlátlan osztódását a jól ismert mutációs változások mellett, azokkal összefüggésben, a jelátviteli és anyagcsere-útvonalak változásai is segítik. A katabolikus és anabolikus útvonalak átprogramozása biztosítja a sejtek túlélését és proliferációját a gyakran tápanyagszegény, fizioiogiástól eltérő („stresszes”) környezetben is. Ezek szabályozásában és működésében számos központi szabályozó molekulának és kulcsfontosságú metabolikus enzimnek van szerepe. A *mechanistic* (korábban *mammalian*) *target of rapamycin* (mTOR) komplexeknek központi szerepe van a sejtek jelátviteli útvonalainak és anyagcseréjének (pl.: a fokozott glükóz- vagy aminosavfelvétel) szabályozásában, a sejtek növekedésének és túlélésének fenntartásában, valamint a stresszhelyzetekre adott válaszok irányításában is. A tumorszövet anyagcsere-változásai és az mTOR jelátviteli útvonal aktivitása közötti kapcsolat megértése elengedhetetlen új, célzott terápiás stratégiák kifejlesztéséhez [4].



1. ábra A daganatos sejtek jellegzetességei. Hanahan és Weinberg által 2000-ben összefoglalt, majd 2011-ben kiegészített, daganatokra jellemző egyedi tulajdonságok láthatók az ábra központi részén [1, 2]. A korábban leírt jellegzetességek 2022-ben 4 új tényezővel bővültek, amelyek körvonallal vannak jelölve [3].

1.2. A PI3K/Akt/mTOR-hiperaktivitás szabályozó szerepe és jelentősége a daganatokban

1.2.1. Az mTOR-kináz felfedezésének története

Az mTOR szerin-treonin protein-kináz azonosítása jelentős mérföldkőnek számított a sejtek proliferációjának és anyagcseréjét szabályozó mechanizmusok jobb megértésében. Az 1960-as években egy kanadai expedíció indult Halifaxból a chilei (a sziget őslakosai által *Rapa Nui* névre keresztelt) Húsvét-szigetre azzal a céllal, hogy feltérképezze annak egyedülálló élővilágát. Az expedícióban részt vevő dr. Stanley Skoryna és a magyar származású Georges Nogrady mikrobiológus munkájuk során talajmintákat gyűjtöttek. Arra keresték a választ, hogy a talajban található antibakteriális

vegyületek magyarázatot adhatnak-e arra, hogy a mezítláb járó őslakosok között miért volt olyan alacsony a tetanuszos megbetegedések száma [5].

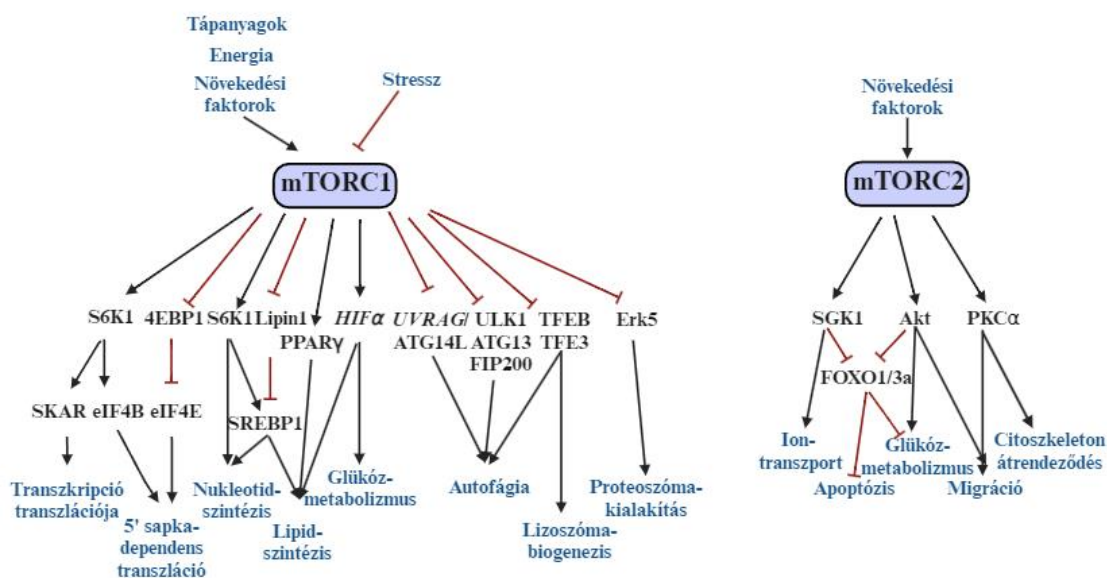
A talajmintákat *Suren Sehgal* a montreáli Ayerst Laboratórium (a későbbi Wyeth-Ayerst gyógyszercég) kutatója vizsgálta tovább. *Sehgal* 1972-ben a megtisztított mintában azonosított egy a *Streptomyces hygroscopicus* talajbaktériumból származó gombaellenes hatású makrolid molekulát, melyet rapamycinnek nevezett el a *Rapa Nui* sziget után [6, 7]. Az 1980-as években a Wyeth-Ayerst gyógyszercég is támogatni kezdte a rapamycin immunrendszerre gyakorolt hatásának vizsgálatait, ami elősegítette a hatóanyag immunszuppresszív és citosztatikus tulajdonságainak felfedezését, majd későbbi klinikai alkalmazását [6, 8].

Az mTOR-kináz felfedezése csak az 1990-es évek elején történt meg több kutatócsoport független vizsgálatainak eredményeként. 1991-ben *Michael N. Hall* és munkatársai élesztőben azonosították a *TOR1* és a *TOR2* (*target of rapamycin 1-2*) géneket [9], majd 1993-ban leírták, hogy a rapamycin intracellulárisan egy specifikus fehérjéhez, az FKBP12-höz kötődik [10]. 1994-ben több, egymástól független kutatócsoport is leírta az mTOR-kinázt emlős szövetekben, amelynek működését a rapamycin közvetlenül gátolta [11, 12]. Ezek a kutatások vezettek ahhoz, hogy 1999-ben az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (FDA) jóváhagyta a rapamycin alkalmazását, először immunszuppresszív gyógyszerként vesetranszplantált betegek kezelésének részeként. Később, vesetranszplantált betegek vesedaganataiban figyelték meg a rapamycin-kezelés tumornövekedést gátló hatásait [13, 14]. Ennek eredményeként a rapamycint különböző onkológiai betegségek kezelésére is elkezdték alkalmazni, és 2007-ben az FDA jóváhagyta a temsirolimus alkalmazását előrehaladott vesesejtes carcinomában.

Az elmúlt két évtizedben számos kutatás hívta fel a figyelmet a daganatok fokozott mTOR-aktivitására, valamint az mTOR-útvonál szerepére az öregedési folyamatokban és különböző anyagcsere- és idegrendszeri megbetegedésekben (pl.: inzulinrezisztencia, Alzheimer-kór), hangsúlyozva a rapamycin és a később kifejlesztett mTOR-kináz gátlók széleskörű alkalmazását [15].

1.2.2. Az mTOR-komplexek szerepe és szerkezeti felépítése

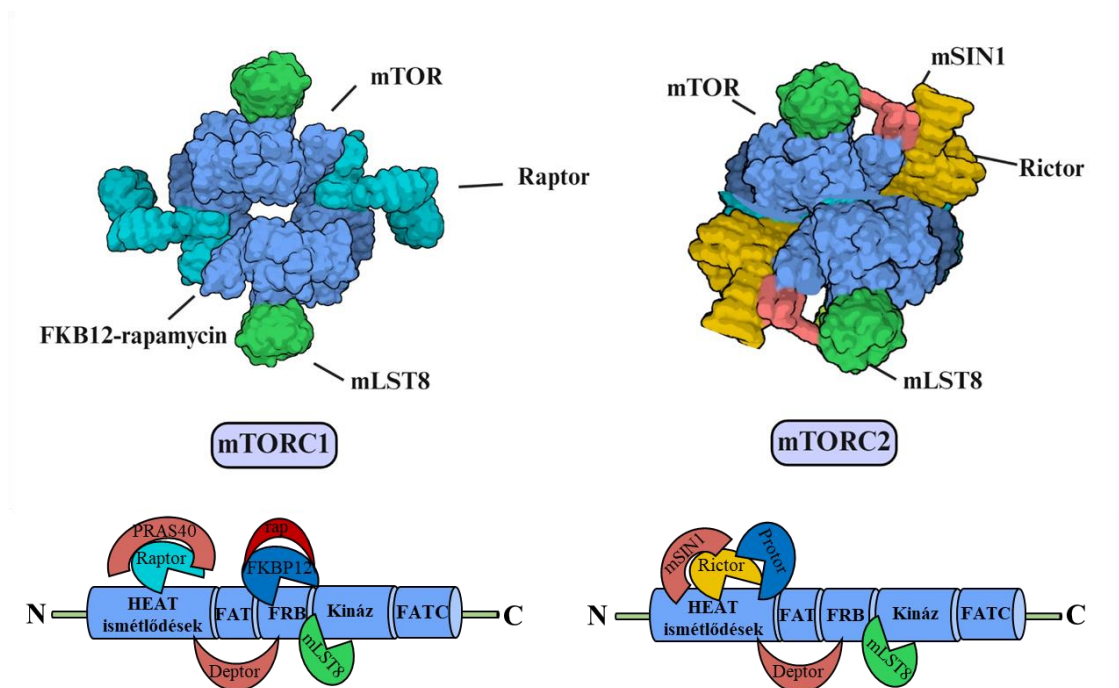
Az mTOR-kináz a sejtek aktuális állapotától függően elősegíti a szöveti környezetből érkező jelek integrálását, befolyásolva a sejtek növekedését és túlélését, valamint a különböző sejt folyamatokat (pl.: proliferáció, motilitás, migráció, metabolizmus, fehérjeszintézis, transzkripció). Az mTOR-kináz jelátviteli útvonal szabályozó csomópontként szerepet játszik az anyagcsere újraprogramozásában, az anabolikus és katabolikus folyamatok közötti egyensúly fenntartásában, beleértve a stresszválaszokat követő metabolikus adaptációt és a tumorsejtek túlélését is (2. ábra). Ennek megfelelően növekedési faktorok, tápanyagok vagy más energiaforrások (pl.: oxigén) hiányában az mTOR-aktivitás csökkenése gátolja a sejtnövekedést, és olyan túlélést elősegítő sejt folyamatokat indít el mint az autofágia [15].



2. ábra Az mTORC1 és mTORC2 komplexek szabályozó szerepe és legfontosabb effektor molekulái [16]. Az ábrán az aktiváló hatásokat fekete színnel (↑), a gátló hatásokat pedig piros színnel (⊥) jelöltük. A rövidítések magyarázata a *Rövidítések jegyzéke* című fejezetben található.

Az mTOR-kináz a sejtekben két különböző komplexben – az mTOR-komplex 1-ben (mTORC1) és az mTOR-komplex 2-ben (mTORC2) – fordul elő. Ezek a komplexek eltérő katalitikus alegységekből épülnek fel és funkcionálisan is különböznek egymástól.

A komplexek felépítésében részt vesznek azonos és jellegzetesen különböző elemek is (3. ábra). Mindkét mTOR-komplexben részt vevő közös alegységek az mTOR-kináz, az mLST8 és a Deptor. Az mTORC1 felépítésében szerepet kap még a PRAS40 és a Raptor, az utóbbi a komplex vázfehérjeként működik. Az mTORC2-re jellemző fehérjék közé tartozik az mSin1, a Protor 1/2, valamint a Raptor helyett a Rictor vázfehérje [17].



3. ábra Az mTORC1 és az mTORC2 szerkezete. Az ábrán az mTOR-komplexek röntgenkristallográfiás térszerkezetei (felső sor), illetve a sematikusan ábrázolt mTOR-kináz doméneken a specifikus partnermolekulák kötődésének helyei láthatók (alsó sor) [16]. A rövidítések magyarázata a *Rövidítések jegyzéke* című fejezetben található.

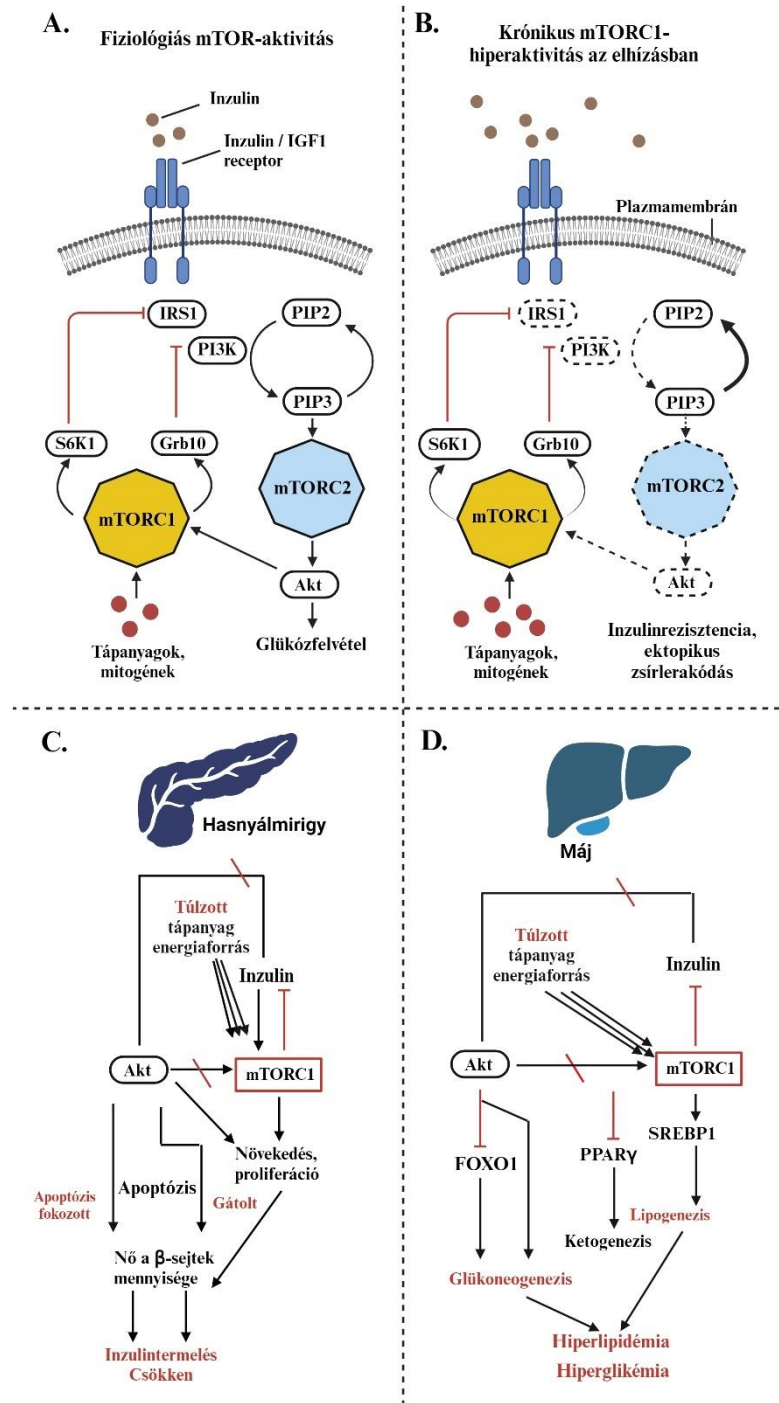
Az aktív mTORC1 számos felépítő folyamatban játszik szerepet mint például a fehérje-, lipid- és nukleotidszintézis, valamint a riboszóma-biogenezis. Ezzel szemben az mTORC2-nek kiemelt jelentősége van a sejtek túlélésének, differenciációjának, növekedésének és migrációjának szabályozásában, valamint az aktin citoszkeletális rendszer fenntartásában. Az mTORC2 szabályozó szerepe elsősorban az Akt, az SGK1 és a PKC α foszforilációján keresztül valósul meg [18].

1.2.3. Az mTOR-kináz hiperaktivitása és a háttérben álló genetikai eltérések

Az mTOR-kináz diszfunkciója (túl- vagy alulműködése) hozzájárulhat a jelátviteli/metabolikus útvonalakban bekövetkező szabályozási zavarok, illetve különböző betegségek (pl.: anyagcserezavarok, neurodegeneratív és kardiovaszkuláris betegségek, öregedés, daganatok) kialakulásához és progressziójához [19, 20].

Az mTOR jelátviteli útvonal kulcsszerepet játszik a szénhidrát- és lipidanyagcsere szabályozásában, továbbá az útvonal zavarai hozzájárulhatnak olyan anyagcserebetegségek kialakulásához mint a 2-es típusú cukorbetegség vagy az elhízás [20]. Túlzott tápanyagbevitel esetén a növekedési faktorok és/vagy a tápanyagok túlsúlya miatt az mTORC1 tartósan aktív állapotban marad. Ez a jelátviteli hálózatban negatív visszacsatoláshoz vezet, az S6K1-kinázon és a Grb10 fehérjén keresztül az IGF1-receptor (IGF1R) és a PI3K-útvonal szétkapcsolódik. A két célfehérje az IRS1 foszforilációján és lebomlásán keresztül gátolja az inzulin hatását, ami negatívan befolyásolja az mTORC2-aktivitást, csökkentve az Akt foszforilációját. Ennek eredményeként csökken a glükózfelvétel, fokozódik a glükoneogenezis, nő a glikémiás terhelés, elősegítve az ektopikus zsírlerakódást és a glükózintoleranciát. Végül az inzulinigény növekedése és a krónikus tápanyagtúlsúly inzulinrezisztenciához, majd az inzulintermelő sejtek kimerüléséhez és pusztulásához vezethet (**4. ábra**) [17].

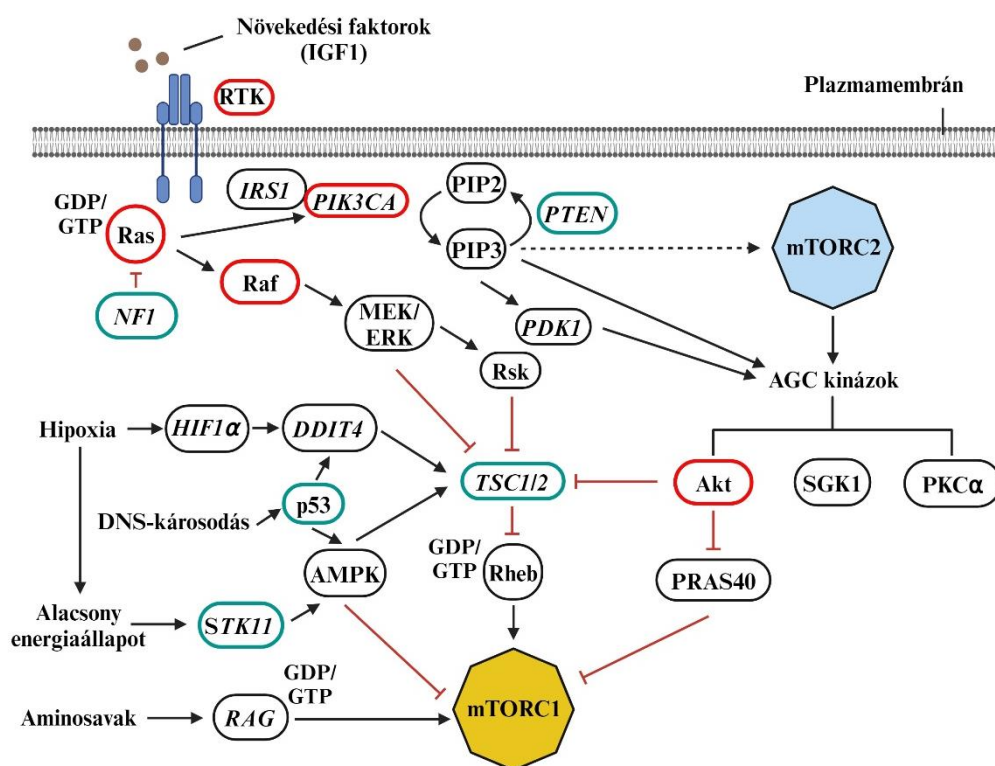
Az mTORC1-útvonal szabályozási zavarai számos neurológiai megbetegedés és neurodegeneratív rendellenesség kialakulásával is összefüggésbe hozhatók. Ezek közé tartozik az epilepszia, a fokális agykérgi dysplasia, a microcephalia és a megalencephalia, az Alzheimer-kór, a Huntington-kór, a Parkinson-kór, a frontotemporalis demencia, továbbá a szociális és kognitív rendellenességek. Az mTORC1 fokozott aktivitása ezeknél a betegségeknél gátolja az autofágiát, ami toxikus anyagok felhalmozódását eredményezi az idegsejtekben, végül neuronpusztuláshoz, valamint a kognitív és motoros funkciók romlásához vezet [17].



4. ábra Az mTOR-útvonal szabályozási zavarainak szerepe a metabolikus szindrómában, a glükózanyagcsere és az inzulinrezisztencia folyamataiban. **(A.)** Normál fiziológias körülmények között az mTORC1 és az IRS1 közötti negatív visszacsatolás egyensúlyban tartja az inzulin-közvetített hatásokat, ami a PI3K keresztül gátolja az mTORC2-aktivitást is [17]. **(B.)** Táplálék- és mitogéntúlsúly az mTORC1 krónikus hiperaktivitását eredményezi, továbbá az IRS1 és a PI3K gátlásával megakadályozza az mTORC2-

jelátvitelt [17]. **(C.)** Magas tápanyagszint esetén a hasnyálmirigy inzulintermelő sejtjei kezdetben fokozott inzulintermeléssel reagálnak. Az Akt jelátviteli útvonal zavarai miatt azonban a sejtek idővel kimerülnek és elpusztulnak, ami tovább rontja az inzulintermelést, és végül 2-es típusú cukorbetegség kialakulásához vezet [21]. **(D.)** A májban az mTORC1 túlzott aktivitása zsírfelhalmozódást okoz, miközben az inzulinrezisztencia növekedése fokozza a glükoneogenezist és hiperglikémiát eredményez [21]. Az ábrán az aktiváló hatásokat fekete színnel (↑), a gátló hatásokat pedig piros színnel (⊥) jelöltük. A rövidítések magyarázata a *Rövidítések jegyzéke* című fejezetben található.

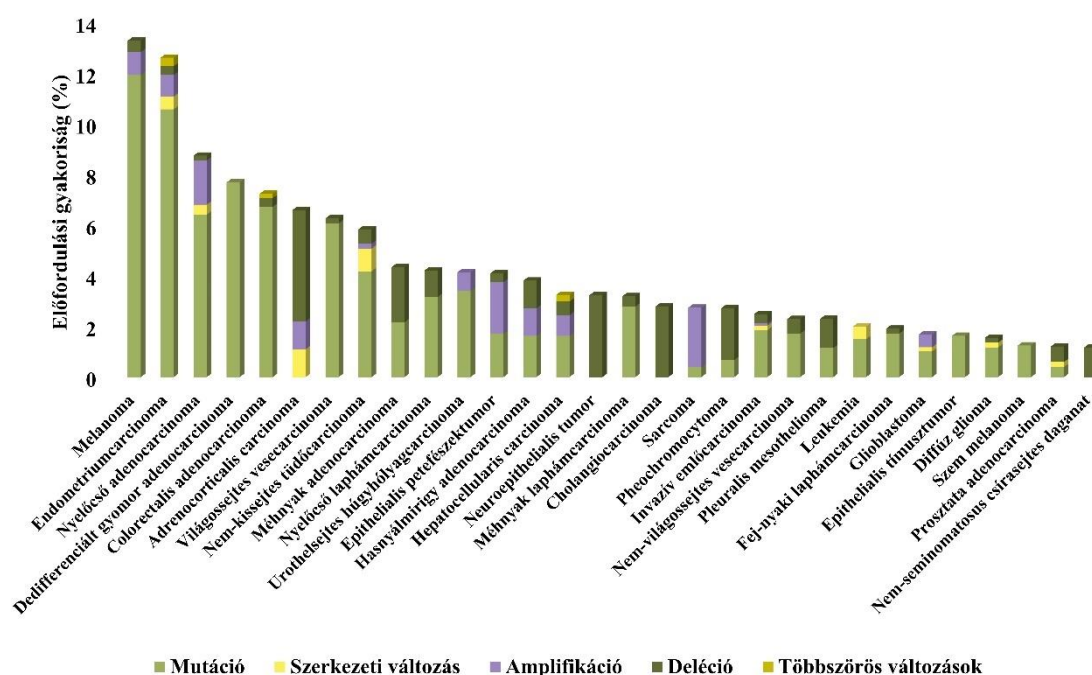
Az mTOR-komplexek hiperaktivitását összefüggésbe hozták a rosszindulatú daganatok kialakulásával és progressziójával is. Ennek hátterében az mTOR-kinázt érintő génmutációk, az mTOR-komplex aktivitását közvetlenül szabályozó fehérjék mutációi vagy a jelátviteli hálózat egyéb változásai (pl.: onkogén vagy tumorszuppresszor gének mutációi) állhatnak (**5. ábra**) [16].



5. ábra Az mTOR-aktivitás zavaraihoz hozzájáruló leggyakoribb onkogén mutációk [21, 22]. Színmagyarázat: piros – onkogének; zöld – tumorszuppresszor gének. Az ábrán az

aktiváló hatásokat fekete színnel (↑), a gátló hatásokat pedig piros színnel (⊥) jelöltük. A rövidítések magyarázata a *Rövidítések jegyzéke* című fejezetben található.

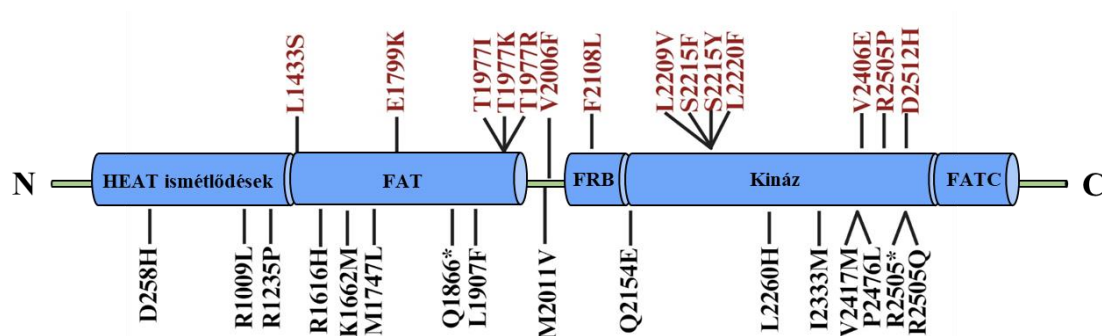
A szolid tumorok közel 5%-a hordozhat mTOR-kinázt aktiváló mutációkat, amelyek gyakoriak melanoma, endometrium-, gasztrointesztinális, vese-, emlő- és tüdődaganatok esetében. A nyilvánosan elérhető adatbázisok alapján az mTOR-kinázzal kapcsolatos genetikai eltérések előfordulásának gyakoriságát a különböző malignitásokban a **6. ábra** foglalja össze.



6. ábra Az *MTOR* génmutációinak, amplifikációjának, delécioinak és egyéb genetikai eltéréseinek gyakorisága humán daganatokban (TCGA PanCancer Atlas Studies adatbázisadatok alapján) [16].

Az mTOR-kináz enzimaktivitását és onkogén szerepét a kináz különböző régióit érintő szomatikus mutációk is befolyásolhatják. A leggyakrabban előforduló funkcionyerő mutációk (pl.: E1799K, T1977R, V2006F, S2215Y és R2505P) aminosavcserét eredményeznek (**7. ábra**). Ezek az aktiváló mutációk nem befolyásolják az mTOR-komplex összeszerelődését, de csökkenthetik a Deptor nevű gátló molekula kötődését, és növelhetik a célmolekulák (pl.: S6K1, 4EBP1) foszforilációját [23, 24]. Egyes funkcionyerő mutációk megváltoztatják a komplex

szerkezetét, megakadályozva az allosztérikus mTOR-gátlók (pl.: rapamycin) kötődését. Ilyen mutáció például az F2108L aminosavcserét okozó pontmutáció, amely az mTOR FKBP-kötő FRB doménjében fordul elő, ahol az FKB12-rapamycin kötőhely is található [25].



7. ábra Az mTOR-kináz gyakori mutációi [16]. Az mTOR-kináz szerkezetének megváltozásáért felelős leggyakoribb mutációk piros színnel vannak jelölve. A rövidítések magyarázata a *Rövidítések jegyzéke* című fejezetben található.

A leggyakrabban előforduló onkogén mutációk (pl.: *PIK3CA*, *PTEN*, *TSC1/2*, *STK11*, *AKT1*) a jelátviteli hálózat hiperaktivitását, illetve az útvonal negatív szabályozóinak kiesését okozhatják. A *PIK3CA*-mutációk az emlő-, nőgyógyászati és colorectalis tumorokban is gyakoriak (~20%). A *PTEN*-mutációk a központi idegrendszeri és az endometrium-daganatok 10%-ában, a *TSC1*-mutációk a húgyúti és az endometrium-daganatok 5-6%-ában, míg a *TSC2*-mutációk a nőgyógyászati, a máj- és a tüdődaganatok 4-7%-ában fordulnak elő. Az *STK11*-mutációk a méhnyak-, a vékonybél és a tüdődaganatok 10-15%-ában, míg az *AKT1*-mutációk a daganatok 3-5%-ában jelennek meg. Sok esetben a receptor tirozin-kinázokat (RTK) és a növekedési faktor receptorokat kódoló gének (pl.: *EGFR*, *HER2*) mutációi is mTOR-hiperaktivitáshoz vezetnek [26].

Az mTOR-kinázt és az mTOR-útvonalat érintő egyéb mutációkon kívül az mTOR-komplex további alegységeiben is előfordulhatnak mutációk. A leggyakoribb ilyen genetikai eltérés a *RICTOR* génamplifikáció, amely a Rictor fehérje fokozott expresszióját okozza, növelve az mTORC2 és az Akt-kináz aktivitását, elősegítve a tumorsejtek növekedését és túlélését [27] (lásd 1.3. alfejezet).

1.2.4. Az mTOR-hiperaktivitás *in situ* karakterizálása

Az mTOR-hiperaktivitás hátterében álló specifikus molekuláris változások (pl.: az mTOR-hiperaktivitásért felelős onkogén mutációk vagy fokozottan expresszáldott fehérjék) a személyre szabott kezelések során terápiás célpontok lehetnek [28, 29]. Az első generációs allosztérikus mTOR-gátlók hatékonyak lehetnek az mTORC1 hiperaktivitása esetén, azonban bizonyos ismert FRB-domén mutációk vagy magas mTORC2-aktivitás jelenlétében hatástalannak bizonyulhatnak [30].

Az első generációs rapamycin származékok (rapalógok) alacsony hatékonyságának hátterét megismerve indult el az újgenerációs, az mTORC1-et és mTORC2-t is gátló kettős, illetve további, például duál-inhibitorok (az mTOR-kinázon kívül más kinázokat is gátló) fejlesztése. Célzott terápiák megkezdése előtt fontos lehet az mTOR-aktivitás *in situ* jellemzése, mivel a komplexek aránya befolyásolhatja a kezelések eredményességét.

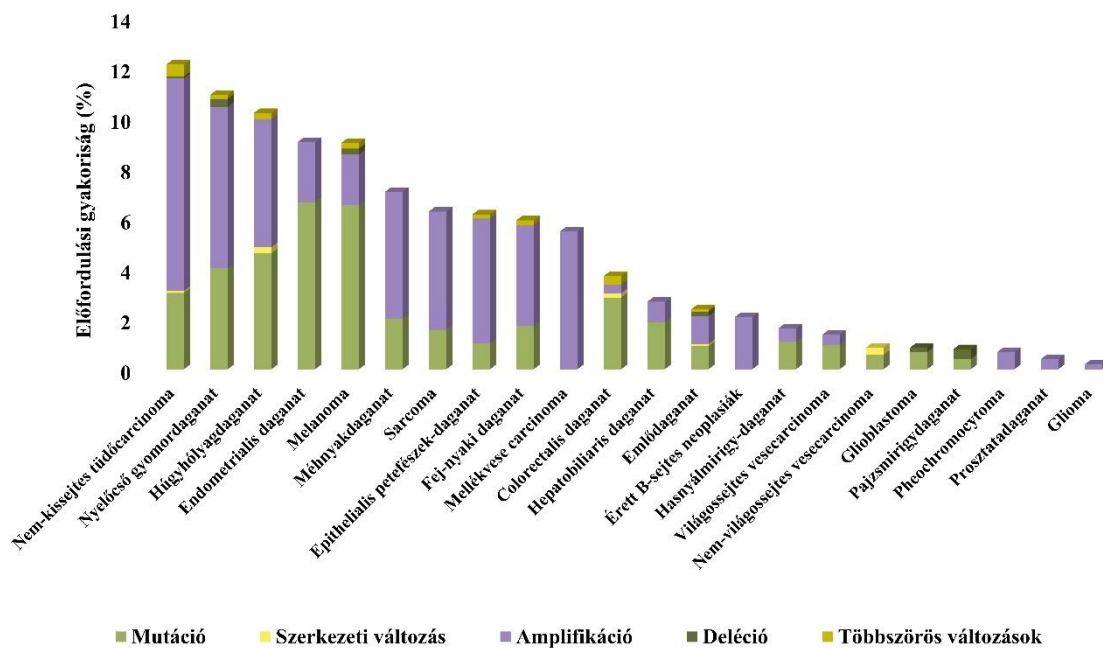
Az mTORC1-aktivitás *in situ* jellemzését a különböző sejtvonalakban és tumorszövetekben az mTOR-kináz aktív, foszforilált formájának (p-mTOR) és foszforilált direkt és indirekt célmolekuláinak (pl.: p-4EBP1, p-S6K1, p-S6) immunhisztokémia (IHC)/immuncitokémia (ICC) vizsgálatával végezhetjük. Az irodalmi adatok és korábbi vizsgálataink alapján az mTORC2 aktivitásának nyomon követésére a legmegfelelőbb marker az Akt-kináz foszforilált 473-as szerin aminosavának (p-Akt (Ser473)) kvantitatív és *in situ* kimutatása, mivel ezt csak az aktív mTORC2 képes foszforilálni [31, 32]. A gyors és megfelelő mintafeldolgozás, az azonnali fixálás kiemelten fontos a p-Akt (Ser473) fehérje kimutatásakor, mivel a formalin-fixált és paraffinba ágyazott (FFPE) szövetmintákban ennek a foszforilált fehérjének stabilitása alacsony, kimutatása megbízhatatlan lehet, különösen a nagyobb szövetminták esetében, ha a formalin penetráció nem megfelelő [33].

A két mTOR-komplex mennyiségi összehasonlítása a specifikus vázfehérjék (Raptor az mTORC1 és Rictor az mTORC2 esetében) arányából is meghatározható. Mindezek alapján az optimális *in situ* markerpanel a p-mTOR, a két komplex vázfehérje (Raptor és a Rictor), illetve a két komplex specifikus célfehérjéinek (pl.: p-S6, p-S6K1, p-4EBP1 az mTORC1 esetén; p-Akt (Ser473) az mTORC2 esetén) kombinációját alkalmazza [31, 34-36].

1.3. A Rictor szerepe a daganatprogresszióban és a metasztázisok kialakulásában

A *RICTOR* gént és fehérjét először 2004-ben azonosították az mTORC2 elemeként, vázfehérjéjeként [37]. Elsődleges funkciója a komplex összeszerelésének irányítása és szerkezeti integritásának fenntartása. A jelenlétében az mTOR-kináz FKBP-kötő FRB-régiója a komplexen belül helyezkedik el, megakadályozva a legismertebb és legszélesebb körben alkalmazott első generációs allosztérikus mTOR-gátlók (pl.: rapamycin és rapalógok) hozzáférését a komplexhez. Ennek következményeként ezek a gátlószerek nem befolyásolják közvetlenül az mTORC2 aktivitását [20, 38].

Az mTOR-útvonalat befolyásoló legismertebb onkogén mutációk egyike a *RICTOR* génamplifikáció, mely a Rictor fehérje fokozott expressziójához, az mTORC2-aktivitás emelkedéséhez, valamint az mTORC1- és mTORC2-komplexek arányának eltolódásához vezethet. A *RICTOR*-amplifikáció jelentős szerepet játszik a daganatok progressziójában és az áttétképződésében különböző jelátviteli útvonalak (pl.: MAPK/ERK, Wnt/ β -katenin) szabályozásán keresztül [39]. A további, *RICTOR* gént érintő genetikai eltérések gyakoriságát a különböző malignitásokban a **8. ábra** foglalja össze.



8. ábra A *RICTOR* génmutációinak, amplifikációjának, delécióinak és egyéb genetikai eltéréseinek gyakorisága humán daganatokban (TCGA PanCancer Atlas Studies adatbázisadatok alapján) [16].

Számos tanulmány kimutatta a *RICTOR* génamplifikációt és a fokozott Rictor fehérjeexpressziót különböző daganattípusokban [38, 40], többek között tüdő- [31, 32, 41], nyelőcső [42], emlő- [43], hasnyálmirigy [44] és májdaganatokban [45], illetve melanomában [46]. Az előbbieket mellett a *RICTOR*-amplifikáció és/vagy a fokozott Rictor-expresszió rosszabb prognózissal és rövidebb teljes túléléssel társult több daganattípus esetében is [38, 47, 48]. Az **1. táblázat** részletesen összefoglalja az mTORC2-hiperaktivitás és/vagy *RICTOR*-amplifikáció előfordulását a különböző daganattípusokban.

1. táblázat A Rictor-expresszió és/vagy a *RICTOR*-amplifikáció előfordulása, prognosztikus és terápiás vonatkozásai különböző daganattípusokban [16].

Daganattípus		Rictor-expresszióra és/vagy <i>RICTOR</i> -amplifikációra vonatkozó adatok	Prognosztikus és terápiás vonatkozások	Releváns publikációk
Bórdaganatok	Melanoma	-	Májmetasztázis jelenléte korrelál a fokozott Rictor-expresszióval, az mTORC2 gátlása csökkentheti a metasztázisképzést.	[46, 49]
Emésztőrendszeri daganatok	Gyomordaganat	46–78% expresszió (IHC), 38% amplifikáció (FISH)	Fokozott Rictor-expresszió összefügg a terápiarezisztenciával, a rosszabb prognózissal és a rövidebb teljes túléléssel. Az mTOR-gátló kezelések előnyök lehetnek más kezelőszerek kombinációjával (pl.: EGFR-gátlók, platinaalapú kemoterápia).	[40, 50, 51]
	Hasnyálmirigy-daganat	-		[44, 49]
	Hepatocellularis carcinoma, cholangiocarcinoma	40–43% expresszió (IHC)		[40, 52, 53]
	Nyelőcső laphámcarcinoma	70% expresszió (IHC)		[42]
	Vastagbél-daganat	58% expresszió (IHC)		[40, 54–57]
Emlődaganatok	Her2+, Luminal A/B, tripla negatív emlőcarcinoma	37–50% expresszió (IHC)	Fokozott mTORC2-aktivitás emelkedett metasztázisképződéssel és rosszabb prognózissal asszociált.	[34, 58–60]
	Metasztatikus emlődaganat (nyirokcsomó)	-		[61]
Fej-nyaki daganatok	-	70% expresszió (IHC)	-	[62–64]
	HPV-vel összefüggő szájüregi laphámcarcinoma	-	Fokozott Rictor-expresszió a rosszabb prognózissal asszociált	[65]
Húgyúti és férfi genitális traktus daganatok	Húgyhólyagdaganat	-	Fokozott mTORC2-aktivitás hatással lehet a húgyhólyag daganatsejtek inváziós képességére.	[66]
	Vesedaganat	47% expresszió (IHC)	Rapalógokkal szembeni rezisztencia és a fokozott mTORC2-aktivitás összefügg.	[36, 40, 67, 68]
Központi idegrendszeri daganatok	Glioma, glioblastoma	-	mTORC2 potenciális terápiás célpont lehet.	[69–73]
Lágyrész- és csontdaganatok	-	28% expresszió (IHC), 20% expresszió (Western blot)	Magas mTORC2-aktivitás kedvezőtlen prognózissal asszociált.	[40, 74]
	Myxofibrosarcoma	-		[75]
	Osteosarcoma	25% expresszió (IHC)		[76]
	Rhabdomyosarcoma	82% expresszió (IHC)		[35]
Mellkasi daganatok	Kissejtes tüdőcarcinoma	14% expresszió (IHC), 6–15% amplifikáció (szekvenálás)	-	[32, 77–79]
	Lymphangioleiomyomatosis	55% expresszió (IHC)	-	[80]
	Metasztatikus tüdődaganat	66% expresszió (IHC)	-	[31]
	Nem-kissejtes tüdőcarcinoma	37% expresszió (IHC)	-	[31, 40]
Női genitális traktus daganatok	Endometrium-daganat	44% expresszió (IHC)	Fokozott Rictor-expresszió korrelál a betegség stádiumával, a metasztázisképződéssel és a rosszabb prognózissal.	[81]
Vérképző- és nyirokszervi daganatok	Leukemia és lymphoma (akut myeloid leukemia, akut lymphoid leukemia, krónikus lymphoid leukemia, krónikus myeloid leukemia, diffúz nagy B-sejtes lymphoma)	43–63% expresszió (IHC)	Magas mTORC2-aktivitás rosszabb prognózissal asszociált, az mTORC2 gátlása eredményes lehet.	[82–87]
Egyéb daganatok	Phaeochromocytoma	80% expresszió (IHC)	-	[88]

Az amplifikáción kívül más mechanizmusokat (pl.: glükózfüggő acetiláció vagy DNS-metiláció) is leírtak, amelyek szabályozzák a Rictor-expressziót és ezáltal az mTORC2-aktivációt is [48, 89]; azonban ezek pontos feltárásához további vizsgálatok szükségesek.

1.3.1. A Rictor jelentősége a tumorsejtek epithelialis-mesenchymalis átmenetében és migrációjában

Az epithelialis-mesenchymalis átmenet (EMT) során az epithelialis sejtek fenotípusa megváltozik, és mozgékony, invazív mesenchymalis sejtekké alakulnak. Az EMT folyamatát a citoskeletonális struktúrák, valamint a sejtek alakját és mozgékonyágát szabályozó génexpressziós és jelátviteli hálózatok változásai támogatják [90]. A mesenchymalis-epithelialis átmenet (MET) ennek a folyamatnak a fordítottja, melyben a sejtek visszanyerik epithelialis tulajdonságaikat. Az EMT elősegíti a tumorsejtek disszociációját, migrációját és invázióját, lehetővé téve számukra, hogy távoli szervekbe eljutva metasztatizisokat képezzenek, ahol a MET során visszaállítják az eredeti, növekedésre képes epithelialis fenotípusukat [91, 92].

A Rictor és az mTORC2 központi szerepet játszik ezekben a folyamatokban, az aktin citoskeleton átrendeződésének szabályozásán keresztül, befolyásolva a sejtek migrációját [49, 54, 91, 93, 94]. Glioblastoma sejtekben kimutatták, hogy a *RICTOR* kiütése és ezáltal az mTORC2 inaktiválása jelentősen csökkentette a tumorsejtek migrációját [95]. Továbbá az mTORC2 által szabályozott riboszóma-biogenezis, valamint a Rictor nukleáris relokalizációja is fontos szerepet játszik az EMT folyamatában [96].

A TGF β 1 a növekedés, a differenciálódás és az epithelialis átalakulás kulcsfontosságú szabályozója a tumorigenezisnek, többek között kölcsönhatásba lép a PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonallal is [90, 93]. Egyre több adat áll rendelkezésre, miszerint a TGF β 1-indukált EMT folyamatában az ILK is alapvető szerepet játszik, a β -integrinek citoplazmatikus doménjének és az aktin citoskeleton kapcsolatának kialakításában. Az ILK a Rictorral kölcsönhatásba lépve egy ILK/Rictor-komplexet alkot, továbbá képes foszforilálni a Rictor 1135. treonin aminosavát, aminek eredményeként a foszforilált Rictor reagálni tud a növekedési faktor stimulusokra [93, 97-99]. Az *ILK* és a *RICTOR* gének kiütése gátolja a TGF β 1-indukált EMT-t tumorsejtekben *in vitro*, ami kiemeli az ILK/Rictor-komplex alapvető szerepét az EMT folyamatában. Az ILK/Rictor-komplexet eddig csak daganatos sejtekben írták le, normál sejtekben nem, így ígéretes célpontot jelenthet a jövőbeni célzott terápiák számára [38, 93].

1.3.2. További Rictor-asszociált fehérjekomplexek

A legújabb kutatások szerint a Rictor az mTORC2 mellett más fehérjekomplexek része is lehet, amelyek potenciálisan onkogén vagy tumorszuppresszor tulajdonságokkal rendelkeznek. A már említett ILK/Rictor-komplex mellett a Rictor további partnermolekulái közé tartozik a Culin-1, amely komplex formában növeli az E3 ubiquitin-ligáz aktivitását, elősegítve a mTORC2 által szabályozott SGK1 lebomlását [100]. Egy másik Rictor-asszociált komplexet humán glioma sejtekben azonosítottak, amely a tetraspanin 8 és az integrin $\alpha 3$ fehérjékkel kapcsolódik. Az eredmények alapján ez a komplex kulcsfontosságú az mTORC2 összeszereléséhez, aktivációjához és a glioblastoma sejtek migrációjához [101]. A Rictor/FBXW7-komplexet, amely tumorszuppresszor tulajdonságokkal rendelkezik, vastagbél-daganat sejtekben azonosították. Ezek a komplexek onkológiai jelentőségű szabályozó fehérjék (pl.: c-Myc, ciklin E) lebontásában vesznek részt [102]. További Rictor partner fehérje lehet a Myo1c miozin is, ami a paxillin aktiválásával befolyásolja a kortikális aktin filamentumok átrendeződését [103]. Vesedaganatok esetében írták le, hogy a Rictor kölcsönhatásba léphet a PDCD4 fehérjével is, ami gátolhatja az mTORC2-t, ezáltal szabályozva a tumorsejtek inváziós képességét [104]. A Rictor és a PKC ζ együttes lokalizációjáról is beszámoltak emlődaganatokban; komplexük kulcsfontosságú szerepet játszik a tumorsejtek kemotaxisában és metasztázisok kialakulásában [105]. A fentiek megerősítik, hogy a Rictor multifunkcionális vázfehérjeként működhet, így az mTORC2-től függetlenül is befolyásolhat biológiai folyamatokat [27, 38]. További vizsgálatok szükségesek azonban ezen fehérjekomplexek klinikai jelentőségének tisztázásához.

1.3.3. A *RICTOR*-amplifikáció, a Rictor-expresszió és az mTORC2-aktivitás vizsgálatának módszerei

Az elmúlt évtizedben az mTOR-út vonal elemeit érintő genetikai eltérések között jellemzésre került a *RICTOR*-amplifikáció, melynek jelenléte magas mTORC2-aktivitással függhet össze és a PI3K/mTOR/Akt-út vonal hatékony gátlásának egyik prediktív markere lehet. A diagnosztikai folyamatban jelenleg a *RICTOR*-amplifikáció „gold standard” validálási módszere a fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH). A gén

kópiaszámában bekövetkező esetleges változásokra azonban a szekvenálással (pl.: újgenerációs szekvenálás – NGS) vagy a Droplet Digital PCR-rel (ddPCR) végzett vizsgálatok eredményei is felhívhatják a figyelmet. Az amplifikációval összefüggésben a fokozott Rictor fehérjeexpressziót IHC és ICC módszerekkel is értékelhetjük. Az Akt fehérje 473-as szerinjének foszforilálásáért kizárólag az aktív mTORC2 felelős, így a p-Akt (Ser473) fehérje mennyiségének emelkedése egyértelmű jele és egyben kiváló markere is a fokozott mTORC2-aktivitásnak [32, 106].

1.4. Tüdődaganatok kialakulásának, progressziójának genetikai háttere és az ezzel összefüggő mTOR-aktivitást érintő változások

1.4.1. A tüdődaganatok incidenciája

A tüdődaganat világszerte az egyik leggyakrabban diagnosztizált daganatos megbetegedés, magas morbiditási és mortalitási rátával [107]. A tüdődaganatok gyakoribb megjelenése a gazdaságilag fejlettebb régiókban főként a kockázati tényezők, például a dohányzás és a légszennyezettség, nagyobb arányú jelenlétének tulajdonítható. Egyéb rákkeltő anyagok mint az azbeszt, a radon, a berillium és a kadmium, illetve bizonyos légúti betegségek (pl.: krónikus obstruktív tüdőbetegség, asztma) is elősegíthetik a tüdődaganatok kialakulását [108].

A GLOBOCAN (www.gco.iarc.fr/en) legfrissebb adatai szerint 2022-ben több mint 2,4 millió új tüdődaganatos esetet regisztráltak, ami az összes daganatos megbetegedés 12,4%-át és a daganatos megbetegedések miatti halálozások 18,7%-át jelenti. Magyarországon is a tüdődaganatok vezetnek a daganatok okozta halálozási statisztikát (26,1%); 2022-ben a körülbelül 66 000 új daganatos megbetegedés 14,9 %-a tüdődaganat volt [109].

A magyarországi adatok vonatkozásában leginkább az Országos Korányi Pulmonológiai Intézet 2024-es évkönyve, a *Korányi Bulletin* tekinthető mérvadónak, amely a 2023-as epidemiológiai adatokat foglalja össze. 2023-ban 3 646 volt az új esetek száma, míg az összes regisztrált betegszám közelített a 20 000-hez. Az új esetek száma évek óta folyamatos csökkenést mutat, ami nem a tényleges országos betegszám csökkenését jelzi, hanem továbbra is a COVID-19 pandémia hatásait tükrözi. A

mortalitási adatok esetében a 2022-es év adatai érhetőek el, ebben az évben a tüdőrák 7 760 beteg halálát okozta. A tüődaganatos betegségek jelentős része elsősorban az idősebb korosztályban fordult elő, az incidencia 40 év felett indul és 60-70-es korban éri el a maximumot. Az újonnan regisztrált betegek több mint 40%-a IV-es stádiumba volt sorolható. A daganattípusok megoszlása az utóbbi években nem változott jelentősen; a betegek közel felénél adenocarcinómát, közel negyedénél laphámcarcinómát, és 15%-ánál kissejtes tüdőcarcinómát (SCLC) diagnosztizáltak. A terápiás beavatkozások aránya sem változott az utóbbi években; a kemoterápia (46%), a reszekció (29%) és a sugárkezelés (22%) jelentik a fő kezelési irányvonalat, azonban az immunterápia és a célzott kezelések száma növekvő tendenciát mutat [110].

1.4.2. A tüődaganatok típusai, osztályozásai

Korábban a tüődaganatok osztályozása elsősorban patomorfológiai eltérések alapján történt, a jelenlegi klasszifikációban azonban genetikai és fehérjeexpressziós eltérések is fontos szerepet kapnak. A 2021-ben frissített WHO klasszifikáció (*Thoracic Tumours – WHO Classification of Tumours, 5th Edition, Volume 5*) összhangban van a genetikai jellegzetességek daganatok kezelését befolyásoló jelentőségével, továbbá figyelembe veszi az új célzott terápiákhoz szükséges molekuláris eltéréseket is [111].

A tüődaganatok többsége epithelialis eredetű, ezek leggyakoribb altípusai a következők: adenocarcinómák, laphámcarcinómák, nagysejtes carcinómák, sarcomatoid carcinómák és nyálmirigy tumorok. A tüődaganatok másik nagyobb csoportját a neuroendokrin (NE) tumorok alkotják, melyek közé tartoznak a kissejtes tüdőcarcinómák (SCLC) is [111].

A korábbi klasszifikációk külön csoportokba sorolták a nem-kissejtes tüdőcarcinómákat (NSCLC) és az SCLC-ket. Bár a legfrissebb klasszifikáció már nem használja ezeket az alcsoport-megnevezéseket, a gyakorlatban még mindig sokan alkalmazzák őket, mivel fontos szerepet játszanak a mindennapi klinikai döntéshozatalban. Az NSCLC-k az összes tüődaganat ~80%-át teszik ki, közöttük az adenocarcinómák aránya ~60%, míg a laphámcarcinómák aránya további ~40%, az esetek kis hányada a nagysejtes carcinómák közé sorolható [112-114]. A tüődaganatok közel 20%-át az NE-daganatok alkotják, amelyek négy fő altípusba sorolhatók: típusos

carcinoid (TC), atípusos carcinoid (AC), SCLC és nagysejtes (LCNEC) neuroendokrin tüdőcarcinoma [115, 116]. A carcinoid tüdődaganatok alacsonyabb malignitásúak, az SCLC-k és a LCNEC-k magasabb malignitásúak és kedvezőtlenebb prognózissal társulnak [117]. Az NE-eredet chromogranin A, a synaptophysin, a CD56 és az INSM-1 immunfestésekkel igazolható [118, 119]. Továbbá az NE-tumorsejtek grade-jének meghatározásában fontos szerepet játszik a mitotikus aktivitás (mitózisok száma) és a nekrozisok értékelése. Kis biopsziás minták esetében, amikor a morfológiai jellemzők vizsgálata nehézségekbe ütközik, a Ki67 proliferációs marker használata is javasolt, azonban nem ez képezi a szövettani diagnózis alapját [120].

1.4.3. A tüdődaganatok leggyakoribb „driver” mutációi és az mTOR jelátviteli útvonalat érintő genetikai eltérései

A célzott terápiák a daganatok specifikus onkogén mutációira fókuszálva, a genetikai változásokkal összefüggő, elsősorban fehérjeszintű molekuláris célpontok támadását teszik lehetővé. Az előbbieket gyors tumorregressziót eredményezhetnek, és az esetek többségében a mellékhatások is könnyebben tolerálhatók. Ennek eredményeként a daganatkezelési stratégiák az egyéni mutációk azonosítására és azok specifikus célzására összpontosítanak [121]. A célzott terápiák térhódítása szorosan összefüggött a molekuláris alapú diagnosztikai (pl.: NGS, FISH) és patológiai (pl.: IHC) eljárások fejlődésével is [122, 123]. Az NGS-sel végzett mutációs profil feltérképezése számos daganat esetében vált standard diagnosztikai eszközzé [124]. A legtöbb daganattípus esetében (beleértve a tüdődaganatokat is) specifikusan szűkített diagnosztikai NGS génpaneleket dolgoztak ki, racionalizálva a költségeket. Az alábbiakban bemutatásra kerülnek a tüdődaganatokban leggyakrabban előforduló mutációk, amelyek egyben a diagnosztikai génpanelek fontos elemei is.

A tüdődaganatok progressziójában kulcsfontosságú a „driver” mutációk következtében akitválódó onkogének és inaktiválódó tumorszuppresszorok hatása. A tüdődaganatok 46%-ban előforduló *TP53* gén inaktiváló mutációja az SCLC-kben a legjellemzőbb, de a rosszabb prognózissal összefüggésben az *EGFR*-mutáns NSCLC-ben is gyakran kimutatható (pl.: összefüggést mutat az EMT fokozódásával és a betegség progressziója során megjelenő terápiarezisztenciával). A p53 tumorszuppresszor

fehérjének szerepe van a DNS-javító mechanizmusok aktiválásában, a sejtciklus gátlásában, valamint számos metabolikus folyamat szabályozásában is [125-128]. A mutáns p53 a rezisztenciamechanizmusok kialakulásával összefüggésben fokozza a *KRAS*-mutáció vezérelt onkogén folyamatokat (pl.: mikrokörnyezeti hatásoktól függő autofágiás mechanizmusokat), segítve a daganatsejtek túlélését és a tumorprogressziót [129].

Az NSCLC-k egyik leggyakoribb mutációja a *KRAS*-mutáció (25-30%), amely kizárja az *EGFR*-mutáció jelenlétét. A *KRAS*-mutáció döntő többségében a 12-es kodont (90%), a 13-as kodont (2-6%) és ritkábban a 61-es kodont érinti [130, 131]. Fiziológiai körülmények között a *KRAS* gén által kódolt Ras guanozin-trifoszfátáz fehérje aktív formája kulcsszerepet játszik az RTK-k intracelluláris hatásainak (pl.: MAPK/ERK, PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonalak) továbbításában. Amennyiben ez az aktív állapot a mutációk következtében tartóssá válik, az útvonalak folyamatos ligand-független aktivitását eredményezi, amely fokozza a proliferációt, elősegíti a progressziót, az anyagcsere-változásokat, a migrációs és az anti-apoptotikus folyamatokat [130, 132].

A *BRAF* szerin-treonin protein-kinázt kódoló gén mutációja, a *KRAS*-hoz hasonlóan, a MAPK/ERK-útvonal aktiválásában játszik szerepet. Az NSCLC-k körülbelül 3-5%-ában írtak le *BRAF*-mutációkat, szinte kizárólag adenocarcinomákban, ahol leggyakrabban a V600E mutáció jelenik meg [133].

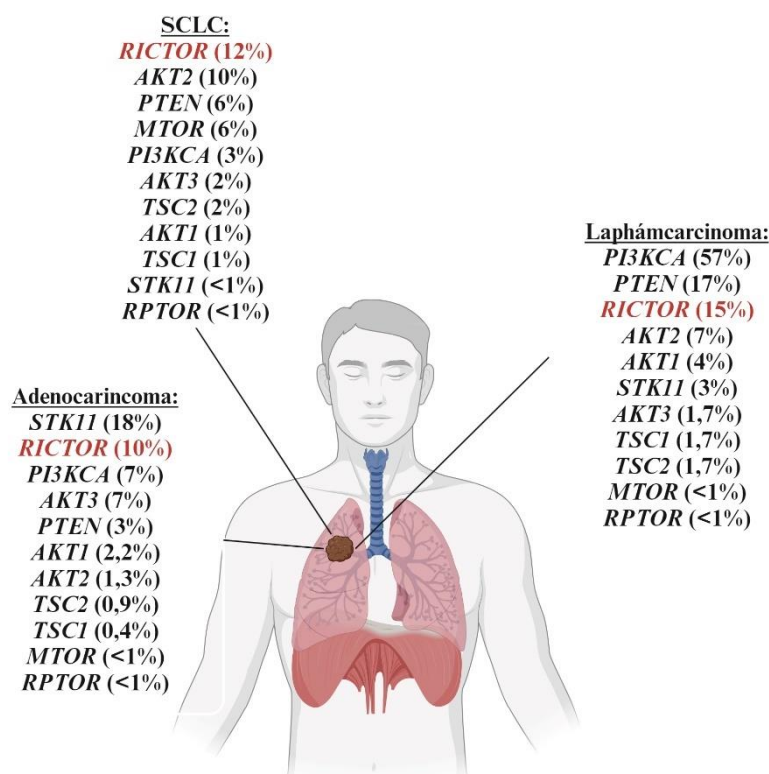
Az *EGFR* aktiváló mutációi (leggyakoribb az L858R és a T790M pontmutáció) az NSCLC-k 11%-ában fordulnak elő; a *KRAS*-hoz hasonlóan hozzájárulnak a MAPK/ERK és PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonalak fokozott aktiválódásához. Az előbbi mutációk meghatározásának kiemelt jelentősége van az EGFR tirozin-kináz-gátlók (EGFR-TKI) alkalmazásában, amelyeket elsőként NSCLC-s betegek személyre szabott terápiájának részeként vezettek be (pl.: gefitinib). Azonban a T790M mutáció jelenléte csökkentheti az EGFR-TKI-k hatékonyságát, hosszútávon az úgynevezett szerzett terápiarezisztencia kialakulásához vezethet [134-137].

Az *ERBB2*, más néven *HER2* onkogén mutációja (az NSCLC-k 2-4%-ában fordul elő, főként nem dohányzó nőkben) az *EGFR*-hez hasonlóan a növekedési faktor receptor fokozott autofoszforylációja és dimerizációja révén folyamatos növekedési szignál aktivitást eredményez, ami kontrollálatlan proliferációt vált ki a daganatsejtekben [138, 139].

Az adenocarcinomák esetében további fontos „driver” mutációk a *ROS1*- és az *ALK*-transzlokációk (kevesebb mint 5%), az *RB1* (7%), az *NF1* (11%), az *STK11* (15%), a *KEAP1* (19%) és a *CDKN2A* (43%) gének inaktiváló, illetve a *MET* (7%) aktiváló mutációi [124]. Az SCLC-re jellemző további fontosabb genetikai eltérések közé tartoznak a sejtciklust szabályozó gének (pl.: *RB1*), az anti-apoptotikus fehérjéket kódoló gének (pl.: *BCL2*), valamint a DNS-hibajavításban részt vevő gének (pl.: *MYC*, *PARP*) mutációi, amelyek összefüggésben állnak a rosszabb prognózissal és a terápiarezisztenciával [126, 140-144].

A jelátviteli hálózatban, növekedési faktor útvonalakban egyéb onkogén vagy tumorsuppresszor mutációk is megjelenhetnek. A *PTEN* funkcióvesztő mutációja (laphámcarcinomák 17%-ában, az SCLC-k 6%-ában fordul, ritka tüdődaganatokban gyakoribb lehet) a rosszabb prognózissal és fokozott recidíva előfordulással jár együtt [28, 145]. A TGFβ-jelátvitelben részt vevő *SMAD4* gén mutációi is előfordulhatnak egyes tüdődaganatokban (pl.: NSCLC-kben), befolyásolva a tumorsejtek migrációját és a metasztázisok képzését [146].

A PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonal szabályozási zavarai a tüdődaganatok patogenezisében is fontos szerepet töltenek be [28, 147]. Az mTOR-hiperaktivitás a jelátviteli útvonalak genetikai eltérései (pl.: *EGFR*- vagy a *KRAS*-mutáció), onkogén (pl.: *PIK3CA*, *RICTOR*, *AKT1/3*, *TSC1/2*, *MTOR*), valamint egyéb tumorsuppresszor (pl.: *PTEN*, *STK11*) gének mutációja révén is kialakulhat [148-150]. Az mTOR-útvonal eltéréseinek előfordulási gyakorisága az adenocarcinomákban 90%, a laphámcarcinomákban 40% és az SCLC-kben 36% (**9. ábra**) [27, 28]. A *RICTOR* génamplifikáció az egyik leggyakoribb genetikai eltérés az összes szövettani altípusban. Előfordulását az adenocarcinomák 10%-ában, a laphámcarcinomák 15%-ában, illetve az SCLC-k 12%-ában figyelték meg [77, 79].



9. ábra Az mTOR-útvonal genetikai eltéréseinek gyakorisága a tüdődaganatokban. A RICTOR-amplifikáció (piros szín) az egyik leggyakoribb genetikai eltérés az összes szövettani altípusban. Az adenocarcinomák és a laphámcarcinomák esetében a mutációs adatokat a cBioPortal (www.cbioportal.org) adatbázis TCGA Firehose Legacy adatkészletéből gyűjtöttük. Az SCLC-re vonatkozó adatok különböző közleményekből [28, 78, 126, 151-153], illetve a cBioPortal adatbázisból származnak [27]. A rövidítések magyarázata a *Rövidítések jegyzéke* című fejezetben található.

1.4.4. A kissejtes tüdőcarcinoma jellegzetességei, új molekuláris szubtípus besorolásai és célzott terápiás lehetőségei

A leggyakoribb NE-tüdődaganatok az SCLC-k (a tüdődaganatok 15%-a) [154], megjelenésük erős összefüggést mutat a dohányzással [155]. Az SCLC magas proliferációs rátával, korai metasztázisképződéssel és rossz prognózissal jellemezhető, a betegek túlélése hónapokban mérhető (az 5 éves túlélés 5% alatti). Az SCLC-k esetében az agyi áttétek gyakoriak, és már a betegség korai szakaszában kialakulhatnak [156, 157].

Az SCLC-k kezelésekor műtetre csak nagyon ritkán kerül sor, leginkább a korai stádiumokban (T1-2, N0), nyirokcsomóérintettség hiányában [158], mivel a betegek

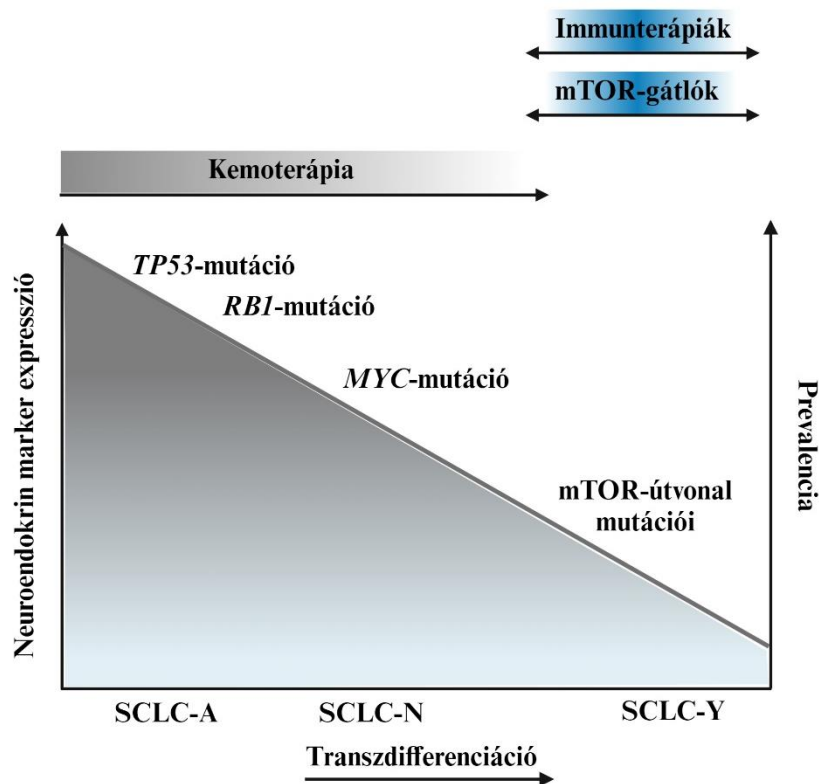
többségében a diagnózis időpontjában már kialakult metasztázis (pl.: agy, máj, csont, mellékvese) figyelhető meg [159, 160]. Az SCLC-k kezelésében az elmúlt három évtizedben nem történt jelentős előrelépés, az elsővonalbeli kezelés továbbra is a kemo-radioterápia (6 ciklus adjuváns platina-etoposide kezelés sugárterápiával kombinálva), amivel átlagosan 10 hónapos túlélés érhető el [161, 162]. A legújabb irányelvek szerint immunterápia alkalmazására is van lehetőség, melynek köszönhetően a 3 éves túlélés 15%-ra emelkedett [163]. A betegek kezdetben jól reagálnak a citotoxikus kemoterápiára, azonban néhány hónapon belül a betegek többségében terápiareszisztencia alakul ki, ennek következtében a betegség progressziója felgyorsul [164, 165]. Számos klinikai vizsgálatban tesztelték az újabb típusú, második generációs kemoterápiás szerek (pl.: docetaxel, paclitaxel, vinorelbine) hatékonyságát, azonban ezek egyike sem váltotta be a hozzájuk fűzött reményeket [162]. A kezelésekkal szembeni rezisztencia kialakulásának hátterében álló molekuláris mechanizmusok feltérképezése és prediktív markerek azonosítása továbbra is jelentős kihívást jelent a kutatók számára [166].

Az elmúlt években számos, célzott és immunellenőrzőpont-gátló terápián alapuló klinikai vizsgálat ígéretesnek bizonyult az SCLC-k kezelésében, néhány kivételtől (pl.: bevacizumab, sunitinib) eltekintve [167, 168]. A legtöbb esetben a sikertelen eredmények hátterében a prediktív markerek, valamint a betegek specifikus szelekciójának hiánya állt [162, 169]. A legígéretes eredmények a PARP- (pl.: veliparib, olaparib), a Bcl-2- (pl.: obatoclox, AT-101), az auróra-kináz- (pl.: alisertib) és a DLL3-inhibitorok (pl.: rovalpituzumab tesirine, tarlamatab) kemoterápiával kombinált hatásairól érkeztek [170-177]. Továbbá számos klinikai vizsgálatot végeznek immunellenőrzőpont-gátlókkal (pl.: durvalumab, pembrolizumab) monoterápiában és kombinációban kemoterápiával és egyéb célzott terápiás kezelőszerekkel [178, 179].

A közelmúltban négy fő molekuláris szubtypust azonosítottak az ASCL1 (SCLC-A szubtypus), a NeuroD1 (SCLC-N szubtypus), a POU2F3 (SCLC-P szubtypus) és a YAP1 (SCLC-Y szubtypus) transzkripciós faktorok fokozott expressziója alapján [180]. Az SCLC-A és SCLC-N szubtypusok az NE-markerek magas expressziójával együttesen fordulnak elő, míg az SCLC-P és SCLC-Y szubtypusokat az NE-markerek alacsony expressziója jellemzi [181]. Továbbá leírtak egy ötödik SCLC-szubtypust (SCLC-I) is, amelyet gyulladásos mikrokörnyezet és a citotoxikus T-limfocitákkal kapcsolatos gének fokozott expressziója [182], valamint alacsony ASCL1-, NeuroD1- és POU2F3-

expresszió jellemez [183]. A transzkripciós faktorok alapján történő szubtypus besorolás lehetőséget teremthet az NSCLC-ékhez hasonló, célzott terápiás készítmények ajánlására.

A célzott terápiák hatékonyságát jelentősen befolyásolhatja az adott daganat molekuláris szubtypus besorolása, mivel a különböző molekuláris szubtypusok sajátos terápiás sebezhetőséggel rendelkeznek [184, 185]. Azonban számos vizsgálat leírja, hogy az SCLC-kben a progresszió során egy állandó domináns szubtypus helyett, a *TP53*, az *RB1* és a *MYC* mutációi által vezérelt dinamikus térbeli-időbeli evolúció történik, ami összefüggésbe hozható a kialakuló terápiarezisztenciával (**10. ábra**). A kemoszenzitívebb, kevésbé agresszív SCLC-A szubtypusból, az egyre agresszívabb és kemorezisztensebb, metasztatikus jellemzőkkel rendelkező SCLC-N és SCLC-Y szubtypusok felé haladva történik a transzdifferentiáció [185-187].



10. ábra Terápiás célpontok és kezelési lehetőségek az SCLC-k transzdifferentiálódása során. A transzdifferentiáció fordítottan korrelál az esetek prevalenciájával és a NE-markerek expressziójával. A kemoterápiával szembeni rezisztencia (szürkével jelölve) szinte minden esetben kialakul; azonban a párhuzamosan megjelenő metabolikus és az mTOR-útvonalt érintő változások további terápiás célpontokat jelenthetnek (kékkel

jelölve) [185]. A rövidítések magyarázata a *Rövidítések jegyzéke* című fejezetben található.

A célzott terápiák a különböző szubtypusokra specifikusan alkalmazhatók. Az SCLC-A szubtypusban magas Bcl-2- és DLL3-expressziót figyeltek meg, ami kiemeli a célzott gátlószerek terápiás jelentőségét ebben a szubtypusban [157, 188]. Az SCLC-N szubtypusnál a fokozott Myc-expresszió következtében hatásos kezelés lehet az auróra-kináz- és a CHK1-inhibitorok alkalmazása [175, 189]. Az IGF1R-t esszenciális kinázként azonosították az SCLC-P szubtypusban, és az IGF1R-gátló linsitinib kezelés jelentős anti-proliferatív hatást mutatott a magas POU2F3 expressziójú SCLC-sejtvonalakon [190]. Az SCLC-P szubtypus továbbá érzékeny lehet a PARP-gátlókra is [182]. Az alacsony NE-marker expressziójú SCLC-szubtypusokra (SCLC-P, SCLC-Y) a fokozott immunsejt-infiltráció, valamint az emelkedett PD-L1-, CD155- és IDO-expresszió jellemző, amelyek potenciális célpontokat jelentenek a különböző célzott és egyéb immunterápiák számára [182, 191, 192]. Az utolsóként leírt SCLC-I szubtypus az SCLC-Y szubtypushoz hasonlóan érzékenyebb az immunterápiára [192].

Annak ellenére, hogy a PI3K/Akt/mTOR-út vonal eltérései gyakoriak az SCLC-kben, csak korlátozott adatok állnak rendelkezésre az mTOR-aktivitás és az újonnan leírt molekuláris szubtypusok közötti összefüggésekről. A fokozott proliferációs, inváziós és metasztatikus tulajdonságokkal rendelkező SCLC-Y szubtypusba tartozó sejtvonalakról leírták, hogy magas érzékenységet mutatnak az mTOR-gátló rapamycinre [193]. Továbbá ebben a szubtypusban jellemzően magasabb az mTOR-út vonal eltéréseinek gyakorisága is [185]. A közelmúltban a POU2F3-at a PI3K/AKT/mTOR jelátviteli út vonal egyik potenciális „upstream” szabályozójaként írták le [194]. A POU2F3- és/vagy a YAP1-pozitív, kemorezisztens, erősen metasztatikus tumorok és az mTOR-út vonal eltéréseket mutató SCLC-k közötti összefüggések azonban még nem teljesen tisztázottak.

1.5. Célzott terápiás lehetőségek mTOR-hiperaktivitás és/vagy *RICTOR*-amplifikáció jelenlétében

Az elmúlt évtizedekben számos PI3K/Akt/mTOR-gátló hatásosságát vizsgálták különböző daganatokban, azonban a klinikai vizsgálatok eredményei gyakran elmaradtak a várttól. Ennek egyik lehetséges oka a megbízható prediktív markerek hiánya és ennek következtében a nem megfelelő betegszelekció. Az mTOR-gátlókkal szembeni érzékenységet a jelátviteli útvonal specifikus genetikai eltérései (pl.: *PIK3CA*-mutációk, *PTEN* funkcióvesztéses mutáció, *AKT*-mutációk, *RICTOR*-amplifikáció), valamint az útvonal elemeinek és aktív célmolekuláinak (pl.: Rictor, p-S6, p-Akt) fokozott expressziója jelezheti. Ezek a markerek szöveti szinten jól értékelhetők, és jelenlétüket vagy hiányukat figyelembe kell venni célzott terápiák tervezésekor [150, 195].

A jelenleg elérhető mTOR-gátlók hatásmechanizmusuk alapján három fő kategóriába sorolhatók: 1.) az allosztérikus mTOR-gátlók, 2.) ATP-vel kompetitív, kettős mTORC1- és mTORC2-gátlók; 3) duál kináz-gátlók, amelyek nemcsak az mTOR-kináz aktivitását, hanem más kinázok aktivitását is gátolják a jelátviteli útvonalban [16].

Az allosztérikus mTOR-gátlók közé tartozik a legismertebb mTOR-gátló, a rapamycin (más néven sirolimus) és származékai (pl.: temsirolimus, everolimus), melyeket a 2010-es évektől számos daganattípusban (pl.: emlő-, vese-, lágyrész és központi idegrendszeri daganatok) alkalmaznak változó eredménnyel [196-198]. A rapalógok az FKBP12 fehérjén keresztül kötődve mTOR-kináz FRB doménjéhez gátolják az mTORC1-aktivitását. A két mTOR-komplex közötti szerkezeti különbségek miatt (lásd 1.2.2. fejezet) a rapamycinnek és a rapalógoknak nincs közvetlen hatása az mTORC2-re. Az mTORC1-gátlók azonban megszakíthatják az mTORC1/S6K1 által irányított negatív visszacsatolást, így közvetett módon a PI3K-n és az mTORC2-n keresztül a komplex „downstream” aktivációját okozhatják [199].

A rapalógok mellett az ATP-vel kompetitív, kettős mTORC1- és mTORC2-gátlók (pl.: sapanisertib, vistusertib) fejlesztése is zajlik. Folyamatosan jelennek meg olyan duál kináz-gátlók, amelyek nemcsak az mTOR-kinázt, hanem más kinázokat (pl.: PI3K) is gátolnak a jelátviteli hálózatban (pl.: paxalisib, samatolisib). Specifikus Akt-gátlók (pl.: capivasertib, afuresertib) hatásainak vizsgálata is zajlik fázis II-es és III-as klinikai vizsgálatokban. Az előbbieken túl harmadik generációs mTOR-gátlókat (pl.: RapaLink-

1) is fejlesztenek, melyeket különböző előrehaladott daganatokban (pl.: vese-, emlődaganatok, köpenysejtes és egyéb „*high grade*” lymphomák) tesztelnek [16, 200]. A jelenleg használatban és klinikai fázisvizsgálatokban lévő PI3K/Akt/mTOR-gátlókat 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat A PI3K/Akt/mTOR-gátlók alkalmazása különböző daganattípusokban a GlobalData adatbázis (www.globaldata.com, lekérdezés dátuma: 2024.07.29.) alapján.

Célpont	Hatóanyag	Daganattípus	Legelőrehaladottabb klinikai vizsgálati fázis és azonosító	Státusz
PI3K-gátlók				
Nem alegység-specifikus PI3K-gátlók	AZD8186	Szolid tumor	Fázis II — NCT04001569	Aktív
	buparlisib (NVP-BKM120)	Fej-nyaki daganat	Fázis III — NCT04338399	Aktív
	duvelisib	Leukemia, lymphoma	-	Forgalmazva
	copanlisib	Lymphoma	-	Forgalmazva
	MEN1611 (CH5132799)	Colorectalis daganat	Fázis II — NCT04495621	Aktív
	tenalisib (RP6530)	Emlődaganat	Fázis II — NCT05021900	Aktív
	TQB-3525	Emlő-, endometrium-daganat, leukemia, lymphoma, petefészek-daganat	Fázis II — NCT04324879, NCT04355520, NCT04398953, NCT04610970, NCT04615468, NCT04808570, NCT04836663	Aktív
PI3K α -gátlók	alpelisib (BYL-719)	Emlődaganat	-	Forgalmazva
	CYH-33 (HHCYH-33)	Szolid tumor	Fázis I — NCT04586335, NCT04856371	Aktív
	inavalisib (GDC-0077)	Emlődaganat	Fázis III — NCT04191499	Aktív
	serabelisib (INK-1117)	Szolid tumor	Fázis II — NCT04073680	Aktív
	taselisib	Lymphoma, myeloma, szolid tumor	Fázis II — NCT02465060	Aktív
PI3K β -gátlók	GSK2636771	Lymphoma, myeloma, szolid tumor	Fázis II — NCT02465060	Aktív
PI3K γ -gátlók	eganelisib (IPI-549)	Emlő-, vesedaganat	Fázis II — NCT03961698	Aktív
PI3K δ -gátlók	amdizalisib (HMPL-689)	Lymphoma	Fázis II — NCT04849351	Aktív
	idelalisib	Leukemia, lymphoma	-	Forgalmazva
	IOA-244	Lymphoma, melanoma, szolid tumor	Fázis I — NCT04328844	Aktív
	linperlisib (YY-20394)	Lymphoma	Fázis II — NCT04370405, NCT04379167, NCT04500561, NCT04705090, NCT04948788	Aktív
	parsaclisib (INCB50465)	Lymphoma, myelofibrosis	Fázis III — NCT04551053, NCT04551066, NCT04796922, NCT04849715	Aktív
	SHC014748 (SH-748)	Lymphoma	Fázis II — NCT04431089, NCT04470141	Aktív
	umbralisib	Lymphoma	-	Forgalmazva
	zandelisib (PWT-143)	Lymphoma	Fázis III — NCT04745832	Aktív
Különböző célpontok	AMG319 (ACP-319), AZD-8835, dezapelisib (NCB-040093), nemiralisib (GSK2269557), pictilisib (GDC-0941), pilaralisib, SAR260301, seletalisib (UCB-5857), sonolisib, ZSTK-474 stb.			Ismeretlen/felfüggesztett

Célpont	Hatóanyag	Daganattípus	Legelőrehaladottabb klinikai vizsgálati fázis és azonosító	Státusz
mTOR-gátlók				
Allosztérikus mTOR- gátlók	everolimus	Emlő-, endokrin-, központi idegrendszeri, vesedaganat	-	Forgalmazva
	sirolimus	Lymphangioleiomyomatosis	-	Forgalmazva
	temsirolimus	Vesedaganat	-	Forgalmazva
ATP-vel kompetitív, kettős mTORC1- és mTORC2-gátlók	CC-115	Központi idegrendszeri daganat	Fázis II — NCT02977780	Aktív
	onatasertib (ATG-008)	Szolid tumor	Fázis II — NCT03591965, NCT04337463, NCT04518137, NCT04998760	Aktív
	sapanisertib (MLN0128)	Lymphoma, myeloma, szolid tumor	Fázis II — NCT02465060	Aktív
	vistusertib	Tüdődaganat	Fázis II — NCT02664935, NCT03334617	Aktív
Különböző célpontok	AZD8055, ridaforolimus (MK-8669) stb.			Ismeretlen/ felfüggesztett
Akt-gátlók				
Pan-Akt-gátlók	afuresertib	Petefészek-, prosztatadaganat	Fázis II — NCT04060394, NCT04374630	Aktív
	capiasertib	Emlő-, prosztatadaganat	Fázis III — NCT03997123, NCT04305496, NCT04493853, NCT04862663,	Aktív
	ipatasertib	Emlő-, prosztatadaganat	Fázis III — NCT03072238, NCT03337724, NCT04060862, NCT04177108, NCT04650581	Aktív
	MK-2206	Emlő-, tüdődaganat, thymoma	Fázis II — NCT01042379, NCT01306045	Aktív
	TAS-117	Szolid tumor	Fázis II — NCT04770246	Aktív
	tricitiribine (PTX-200)	Leukemia	Fázis II — NCT02930109	Aktív
	uprosertib	Myeloma, szolid tumor	Fázis II — NCT01902173, NCT01989598	Aktív
Különböző célpontok	COTI-2, LY-2503029, perifozine stb.			Ismeretlen/ felfüggesztett
Duál kináz-gátlók				
Duál PI3K-, mTOR- kináz-gátlók	gedatolisib	Emlődaganat	Fázis II — NCT03698383, NCT03911973	Aktív
	paxalisib	Központi idegrendszeri daganat	Fázis III — NCT03970447	Aktív
	samotolisib	Lymphoma, szolid tumor	Fázis II — NCT03155620, NCT03213678,	Aktív
Különböző célpontok	apitolisib, bimiralisib (PQR309), dactolisib, SF1126, voxalisib stb.			Ismeretlen/ felfüggesztett

Az mTORC1-aktivitás megőrzését biztosító specifikus, hatékony és szelektív mTORC2-gátlók fejlesztése továbbra is kihívást jelent. Ezek közül csak néhány, siRNS-technológián alapuló inhibitor (pl.: Rictor si-NP, JR-AB2-011) van preklinikai vizsgálatokban [60, 201].

A PI3K/Akt/mTOR-út vonal hiperaktivációja és a kedvezőtlen prognózis közötti összefüggés ellenére, a monoterápiaként alkalmazott mTOR-gátlók hatékonysága nagyon alacsony. Az mTOR-gátlók hagyományos kemoterápiával/sugárterápiával vagy más célzott terápiákkal való kombinálása segítheti a daganatok érzékenyítését és a kezeléssel szembeni rezisztenciamechanizmusok leküzdését. Számos kombinációs klinikai vizsgálat

van folyamatban [202], azonban ezek alkalmazását súlyos egyéni mellékhatások korlátozhatják, amelyek enyhítése körültekintő onkológiai kezelést igényel [30, 203].

1.5.1. Az mTOR-gátlók fejlesztése tüdődaganatokban

A különböző mTOR- és kináz-gátlók tesztelése tüdődaganatok klinikai fázisvizsgálataiban is megkezdődött (**3. táblázat**). A PI3K-gátlók közül az NSCLC-ben jelenleg az α -alegység-specifikus alpelisib (BYL-719) és egyéb β -alegység-specifikus gátlószer tesztelése zajlik [204]. Számos további PI3K-gátlót (pl.: pictilisib (GDC-0941), sonolisib) vizsgáltak tüdődaganatokban, azonban ezek a kezelőszerek nem mutattak szignifikáns javulást a progressziómentes túlélésben. Jelenleg a duál PI3K-, mTOR-kináz-gátló gedatolisibet a CDK4/6-gátló palbociclibbel, illetve immunellenőrzőpont-gátlókkal kombinálva tesztelik NSCLC-ben. A MEK-gátló selumetinibet kombinációban vizsgálják a vistusertibbel és a temsirolimussal NSCLC-ben és SCLC-ben, továbbá a vistusertibet paclitaxellel kombinálva is tanulmányozzák laphámcarcinomában [27, 205].

Fontos kiemelni a **3. táblázatban** felsoroltak közül egy markeralapú „ernyővizsgálatot” (*umbrella study*) (NCT03106155), amely ígéretes stratégiát kínál a célzott terápiák tervezéséhez és értékeléséhez. A vizsgálatba a *RICTOR*-amplifikációs státuszuk alapján vonták be a betegeket, és a beválogatott, *RICTOR*-amplifikációval rendelkező négy SCLC-s beteg közül kettőnél a vistusertib monoterápia közel egy évvel meghosszabbította a túlélést [206].

3. táblázat A PI3K/Akt/mTOR-gátlók klinikai vizsgálatait tüdődaganatokban a GlobalData adatbázis (www.globaldata.com, lekérdezés dátuma: 2024.07.29.) alapján.

Célpont	Hatóanyag (+ kombináció)	Daganattípus	Legelőrehaladottabb klinikai vizsgálati fázis és azonosító	Státusz
PI3K-gátlók	alpelisib	NSCLC	Fázis II — NCT04591431	Aktív
	eganelisib (IPI-549) + nivolumab	NSCLC	Fázis I — NCT02637531	Ismeretlen
	GSK2636771	Tüdődaganat	Fázis II — NCT02465060	Aktív
	idelalisib + pembrolizumab	NSCLC	Fázis I/II — NCT03257722	Felfüggesztett
	serabelisib (INK-1117) + canagliflozin	Tüdődaganat	Fázis I/II — NCT04073680	Ismeretlen
	taselisib	Tüdődaganat	Fázis II — NCT02465060	Aktív
Allosztérikus mTOR-gátlók	everolimus	NSCLC	Fázis II — NCT04591431	Aktív
	everolimus	Neuroendokrin tüdőcarcinoma	Fázis II — NCT02687958	Aktív
	everolimus + ceritinib	NSCLC	Fázis I — NCT02321501	Aktív
	everolimus + trametinib + lenvatinib	Tüdődaganat	Fázis II — NCT04803318	Aktív
	everolimus + VS-6766	Tüdődaganat	Fázis I — NCT02407509	Aktív
	nab-rapamycin + adagrasib	NSCLC	Fázis I/II — NCT05840510	Aktív
	RAPA-201	Tüdődaganat	Fázis I/II — NCT05144698	Aktív
	sirolimus + epacadostat	NSCLC	Fázis I — NCT03217669	Aktív
ATP-vel kompetitív, kettős mTORC1- és mTORC2-gátlók	sapanisertib (MLN0128) + osimertinib	NSCLC	Fázis I — NCT02503722	Aktív
	vistusertib	NSCLC	Fázis II — NCT02664935, NCT03334617	Aktív
	vistusertib	SCLC	Fázis II — NCT03106155	Felfüggesztett
	vistusertib + durvalumab	NSCLC	Fázis II — NCT03334617	Aktív
	vistusertib + selumetinib	NSCLC	Fázis I/II — NCT02583542	Ismeretlen
Akt-gátlók	capiasertib	Tüdődaganat, NSCLC	Fázis II — NCT02117167, NCT02465060, NCT02664935	Aktív, elkészült
	ipatasertib	Tüdődaganat	Fázis II — NCT02465060	Aktív
	ipatasertib + atezolizumab	NSCLC	Fázis I/II — NCT03337698	Aktív
	ipatasertib + docetaxel	NSCLC	Fázis II — NCT04467801	Aktív
	MK-2206 + gefitinib	NSCLC	Fázis I — NCT01147211	Ismeretlen
Duál PI3K-, mTOR-kináz-gátlók	gedatolisib + palbociclib	Laphámcarcinoma	Fázis I — NCT03065062	Aktív

Összefoglalva, számos PI3K/Akt/mTOR-gátló van fejlesztés alatt. A korábbi standard kezelési protokollok sikertelenségének egyik oka az empirikus alapú terápiák alkalmazása volt. A jövőbeni terápiák hatékonyságának javítása érdekében elengedhetetlen a terápiás döntéshozatalt segítő prediktív markerek azonosítása és a betegek markeralapú szelekciója a vizsgálatokba történő beválasztás során.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A személyre szabott kezelések fejlődésével, a molekuláris rutin diagnosztikai módszerek elérhetőségével kiemelt fontosságúvá vált a terápiás célpontok feltérképezése és validálása a gyakori és a ritka daganattípusokban egyaránt. A mTOR jelátviteli útvonal szabályozási zavarai, köztük a *RICTOR*-amplifikáció, számos humán daganattípusban megfigyelhetők, különösen a tüdődaganatok esetében. Az mTOR-gátlók klinikai felhasználásának elősegítéséhez elengedhetetlen az mTOR-aktivitás jellemzése, valamint további lehetséges prediktív markerek azonosítása. Ezeknek megfelelően célkitűzéseink a következők voltak:

1. A *RICTOR*-amplifikáció előfordulásának vizsgálata különböző daganatokban és SCLC-kben.
 - a. Rutin diagnosztikai 500 génes NGS-sel kimutatott *RICTOR* gén kópiaszám-változások háttérben álló feltételezett amplifikáció validálása és fehérjeszintű vizsgálata FISH, ddPCR és IHC módszerekkel.
 - b. *RICTOR*-kópiaszám és mTOR-aktivitás változásának vizsgálata párosított betegmintákban az SCLC progressziójával összefüggésben.
2. Az mTOR-aktivitás, az egyre szélesebb körben elfogadott molekuláris szubtípus markerek és a klinikopatológiai adatok összefüggéseinek vizsgálata primer és agyi metasztatikus SCLC-kben.
3. Humán SCLC-sejtvonalakban az mTOR-aktivitás, valamint a *RICTOR*-amplifikáció szerepének kísérletes vizsgálata.
 - a. PI3K/Akt/mTOR-gátlók *in vitro* proliferációgátló hatásainak vizsgálata a *RICTOR*-amplifikáció és más az mTOR-jelátvitelt érintő genetikai eltérésekkel összefüggésben.
 - b. *In vivo* humán SCLC xenograft tumorok mTOR-aktivitásának, illetve *RICTOR*-kópiaszám változásának vizsgálata kemoterápiás kezelés és tumorevolúció modellezése során.

3. MÓDSZEREK

3.1. Vizsgált betegcsoportok

3.1.1. Az újgenerációs szekvenálási vizsgálatokba bevont betegek – NGS-kohorsz

Retrospektív vizsgálatunkban 420 esetet elemeztünk, amelyek 2018 és 2022 között érkeztek intézetünkbe (Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest, Magyarország), 500 génes rutin diagnosztikai NGS-vizsgálatok elvégzése céljából. A vizsgálatba bevont daganattípusok eloszlását bemutató táblázat az *Eredmények* részben (lásd 4.1.1. *alfejezet*) található.

3.1.2. Kissejtes tüdődaganatos betegek – SCLC-kohorsz

Az SCLC-vel kapcsolatos vizsgálataink során primer (N = 50), agyi metasztatikus (N = 50), valamint ugyanazon SCLC-s betegek párosított mintáit (N = 14 × 2; primer/primer, primer/agyi metasztázis vagy agyi metasztázis/agyi metasztázis mintapárok szövetmintákból és tüdő/nyirokcsomó, nyirokcsomó/hasnyálmirigy, nyirokcsomó/rekeszizom, máj/máj mintapárok sejtblokk-mintákból) elemeztük. A legtöbb primer SCLC-minta biopsziás mintavétel során készült; vizsgálatunkba csak olyan mintákat vontunk be, amelyek tumorfelülete legalább 3 mm² volt. Az agyi metasztázisok sebészileg eltávolított tumorok, vagy az esetek kisebb részében, nagyobb méretű biopsziás minták voltak. A szövetminták 2006 és 2020 között érkeztek intézetünkbe. A sejtblokkból készült mintapárok esetében a mintavétel 2018-ban történt a Mayo Klinikán (Jacksonville, FL, USA). A diagnózist a legtöbb esetben cytokeratin AE1/AE3, TTF-1, synaptophysin és chromogranin A IHC festések erősítették meg.

3.1.3. Szöveti multiblokkok készítése az agyi metasztatikus SCLC-mintákból

A vizsgált SCLC-esetek agyi metasztázisaiból (N = 50) szöveti multiblokkokat (TMA) készítettünk TMA Master (3DHistech Kft.; Budapest, Magyarország) segítségével. Az FFPE blokkokból a hematoxin és eozin (H&E) festés alapján választottuk ki a reprezentatív területeket. A tumorminta méretétől függően 2-3 db 2 mm átmérőjű szövethengert szúrtunk ki, amelyeket a recipiens blokkokba helyeztünk, így összesen 54 szövethengert tartalmaztak (6 × 9) az elkészült TMA blokkok. Az orientációt segítő nem neoplasztikus májparenchimán kívül, normál szöveti kontrollként agy, bőr és endometrium szövetmintákat is használtunk.

3.2. Molekuláris genetikai vizsgálatok

3.2.1. Újgenerációs szekvenálás és bioinformatikai elemzés

Az NGS-kohorsz (N = 420) komprehenzív genomi profilozása előtt az FFPE szövettani mintákban a tumorsejtek százalékos arányát (TC%) patológusok határozták meg. Azokat a mintákat, ahol a TC% < 20 volt kizártuk a molekuláris vizsgálatokból. A genomi DNS izolálása a QIAmp DNA FFPE Tissue Kit-tel (QIAGEN GmbH; Hilden, Németország) történt. Az Illumina TruSight Oncology 500 High Throughput assay-hez (TSO500 – Illumina; San Diego, CA, USA) a könyvtárkészítést és a szekvenálást intézetünk molekuláris laboratóriumában végezték az Illumina NextSeq 2000 platformon, 101 ciklusos „pair-end” szekvenálással, a gyártó utasításai szerint. A bioinformatikai elemzéshez az Illumina TruSight Oncology 500 Local App (2.1 verzió) alkalmazást használták. A nyers BCL fájlok letöltése után a FASTQ generálása a BCL Convert (3.8.2 verzió) szoftverrel történt. A hg19 referencia genomhoz a szekvenciaillesztést a Burrows-Wheeler Aligner és a SAMtools segédprogramokkal végezték. A duplikált leolvasásokat leolvasás-összevonó elemzéssel eltávolították, a kópiaszám-változás (CNV) meghatározását pedig a CRAFT (Illumina) segítségével végezték bioinformatikusaink.

További vizsgálatainkhoz és a *RICTOR*-amplifikáció validálásához azokat az eseteket választottuk ki, amelyekben a normalizált *RICTOR* CNV-érték 3 vagy annál

nagyobb volt (a normalizált CNV-érték 2 az amplifikáció nélküli sejtek és a „normál”, nem amplifikált, 2 génmásolatot tartalmazó szomatikus sejtek esetében).

3.2.2. *RICTOR*-amplifikáció vizsgálata fluoreszcens *in situ* hibridizációval

Az NGS-kohorsz $3 \leq \text{RICTOR CNV}$ eseteinek ($N = 37$), az SCLC-kohorsz párosított mintáinak ($N = 14 \times 2$), a humán SCLC-sejtvonalakból ($N = 8$) készült sejtblokkok és xenograft szövetblokkok (lásd 3.4.1. és 3.5. alfejezetek) 2-3 μm vastag FFPE-metszetein végeztük a „gold standard” validációs módszernek számító FISH-reakciókat.

Az első *RICTOR* FISH-vizsgálatok a Mayo Klinikán készültek az SCLC-kohorsz párosított mintáin, illetve a humán SCLC-sejtvonalakból készült sejtblokkokon a következő protokoll szerint. A metszeteket először deparaffináltuk és előkezeltük (79°C, 25 perc; Vysis IntelliFISH Pretreatment SSC Solution – Abbott Molecular; Abbott Park, IL, USA) majd emésztettük (38°C, 25 perc; Vysis IntelliFISH Protease – Abbott Molecular). Ezt követően a metszeteket a *RICTOR* gén (#RICTOR-20-OR – Empire Genomics; Williamsville, NY, USA) és az 5. kromoszóma (*Chr5*) kontroll gén (#CHR05-10-GR – Empire Genomics) próbákkal és a hibridizációs pufferrel (37°C, 2 óra; Vysis IntelliFISH Hybridization Buffer – Abbott Molecular) inkubáltuk. A hibridizációt követően a metszeteket mostuk (73°C, 3 perc; Vysis IntelliFISH Post-Hybridization Buffer – Abbott Molecular), végül DAPI (Abbott Molecular) háttérfestést alkalmaztunk.

Később intézetünkben is beállítottuk a *RICTOR* FISH-vizsgálatot az NGS-kohorsz $3 \leq \text{RICTOR CNV}$ esetein, továbbá a humán SCLC-sejtvonalból indított xenograft kísérletek szövetmintáin a következő protokoll szerint. A deparaffinálást és citrátos előkezelést (79°C, 25 perc) követően a mintákat 10% pepszinnel emésztettük (37°C, 15 perc). Ezt követően a hibridizációt 85°C-on 10 percig, majd 37°C-on egy éjszakán át végeztük a ZytoLight SPEC *RICTOR/5q31.1* Dual Color Probe (ZytoVision GmbH; Bremerhaven, Németország) FISH-próbával. A mosási lépéseket (0,4 $\times$ SSC puffer/0,1% NP-40 detergens, 72°C, 5 perc és 2 $\times$ SSC puffer/0,1% NP-40 detergens, szobahőmérséklet, 5 perc) követően DAPI (Vector Laboratories, Inc.; Newark, CA, USA) háttérfestést alkalmaztunk.

A reprezentatív területek kiválasztása a H&E metszetek alapján patológus bevonásával történt. A FISH-reakciók értékelése a kiválasztott terület legalább két régiójában 30-30 sejtmag megszámlálásával történt két független vizsgáló által, fluoreszcens mikroszkóp (Leica DM5500 B – Leica Biosystems; Buffalo Grove, IL, USA és Nikon Eclipse E600 – Nikon Corporation; Tokió, Japán), valamint Lucia Cytogenetics Software (Laboratory Imaging, Prága, Csehország) használatával. Az értékelés során a sejtmagonkénti jelszámok átlagát és a *RICTOR*/*Chr5* vagy a *RICTOR*/*5q31.1* arányt határoztuk meg. Azokat az eseteket, ahol az arány 2 vagy annál nagyobb volt *RICTOR*-amplifikáltak tekintettük, míg azokat az eseteket, ahol az arány 2-nél kisebb, azonban a *RICTOR*-kópiaszám 4 vagy annál nagyobb volt bizonytalan esetként regisztráltuk.

3.2.3. *RICTOR*-kópiaszám-változás vizsgálata Droplet Digital PCR-rel

Az NGS-kohorsz $3 \leq \text{RICTOR CNV}$ eseteiben ($N = 37$) a *RICTOR*-kópiaszám változásának vizsgálatát ddPCR-rel is elvégeztük a korábban TSO500 NGS-analízishez felhasznált DNS-mintákkal (kb. 50 ng extrahált DNS). Továbbá humán SCLC-sejtvonalak (lásd 3.4.1. *alfejezet*) *RICTOR*-kópiaszámának meghatározásához is ddPCR-t alkalmaztunk. Ehhez sejtvonaltól függően $2-5 \times 10^6$ sejtől izoláltunk DNS-t a High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche; Basel, Svájc) használatával a gyártó utasításainak megfelelően.

A PCR-reakcióhoz a *RICTOR* FAM (Unique Assay ID: dHsaCNS608884235 – Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, CA, USA) és az *AP3B1* HEX (Unique Assay ID: dHsaCP2500348 – Bio-Rad Laboratories, Inc.) próbákat használtuk. A dropleteteket a Bio-Rad Automated Droplet Generator segítségével állítottuk elő, és az emulgeált PCR-reakciókat Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cyclerrel futtattuk meg (95°C 10 perc, 40 ciklus: 94°C 30 másodperc, 60°C 1 perc és 98°C 10 perc). A dropleteteket a Bio-Rad QX200 Droplet Reader és a QuantaSoft szoftver (1.7 verzió) segítségével olvastuk le és elemeztük. A kapott eredményeket az FFPE-minták TC%-ával normalizáltuk az alábbi képlettel (képletet 40%-os tumortartalom alatt nem használtuk a fals pozitív esetek kizárása érdekében) [207]:

$$\text{Normalizált } RICTOR/AP3B1 - \text{arány} = \frac{RICTOR/AP3B1}{TC\%} * 100$$

Azokat az eseteket, ahol a normalizált *RICTOR/AP3B1*-arány nagyobb mint 2 volt, *RICTOR*-amplifikált eseteknek definiáltuk (*RICTOR/AP3B1*-arány 1 az amplifikáció nélküli sejtek és a „normális”, nem amplifikált 2 génmásolatot tartalmazó szomatikus sejtek esetében).

3.3. Fehérjeexpressziós vizsgálatok

3.3.1. Az mTOR- és molekuláris szubtípus markerek immunhisztokémiai vizsgálata

Az IHC-festésekhez az FFPE-szövetminták és TMA-blokkok 2-3 µm vastagságú metszeteit használtuk. A deparaffinálást és endogén-peroxidáz blokkot (perjódsav, nátrium-borohidrid, majd 10% H₂O₂-t tartalmazó metanol) követően antigén-feltárást végeztünk kuktában, 30 percig 10 mM citrát pufferrel (pH 6). A blokkolást követően a mintákat az elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk (az alkalmazott antitestek teljes listáját a **4. táblázat** tartalmazza), majd Novolink Polymer (Leica Biosystems; Deer Park, IL, USA) másodlagos detektáló rendszert alkalmaztunk és a reakciót 3,3'-diaminobenzidinnel (Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System – Aligent Technologies, Inc.; Santa Clara, CA, USA) tettük láthatóvá. Háttérfestésként hematoxilint alkalmaztunk. A metszetek archiválását és kiértékelését a Pannoramic 1000 Digital Slide Scanner (3DHistech Kft.) és a CaseViewer 2.3 szoftver (3DHistech Kft.) segítségével végeztük.

4. táblázat Az IHC vizsgálatainkhoz használt ellenanyagok listája.

Primer antitest	Gyártó	Katalógusszám (klón)	Hígítás	Funkció, jelentőség	Vizsgálati kohorsz	
					NGS	SCLC
Anti-phospho-mTOR (Ser2448)	Cell Signaling	#2976 (49F9)	1:100	mTOR-kináz aktív formája	-	✓
Anti-phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser240/244)	Cell Signaling	#2215	1:100	mTORC1-aktivitás	-	✓
Anti-Rictor	Bethyl Laboratories	A500-002A (1G3P2C9)	1:500	mTORC2 mennyisége	✓	✓
Anti-Rictor	Cell Signaling	#2140	1:200	mTORC2 mennyisége	✓	-
Anti-phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling	#4060 (D9E)	1:100	mTORC2-aktivitás	✓	✓
Anti-ASCL1	GeneTex	GTX129189	1:1000	Transzkripciós faktor, molekuláris szubtypus marker	-	✓
Anti-NeuroD1	GeneTex	GTX134069	1:200	Transzkripciós faktor, molekuláris szubtypus marker	-	✓
Anti-POU2F3	Cell Signaling	#36135 (E5N2D)	1:100	Transzkripciós faktor, molekuláris szubtypus marker	-	✓
Anti-YAP1	GeneTex	GTX129151	1:200	Transzkripciós faktor, molekuláris szubtypus marker	-	✓

3.3.2. Az immunhisztokémiai festések értékelése

Az mTOR- (p-mTOR, p-S6, Rictor, p-Akt) és a molekuláris szubtypus markerek (ASCL1, NeuroD1, POU2F3, YAP1) IHC-festéseinek szemikvantitatív értékeléséhez a 0-300-ig terjedő „*histochemical scoring*” (H-score) módszert alkalmaztuk. A H-score érték a festés intenzitásának (0, 1+, 2+, 3+) és az adott intenzitással festődő tumorsejtek százalékos arányainak szorzataként adható meg az alábbi képlettel:

$$\begin{aligned}
 \text{H – score} = & (1 \times \text{gyenge intenzitással festődő sejtek \% – os aránya}) \\
 & + (2 \times \text{közepes intenzitással festődő sejtek \% – os aránya}) \\
 & + (3 \times \text{erős intenzitással festődő sejtek \% – os aránya})
 \end{aligned}$$

A H-score értékek meghatározása két független patológus bevonásával történt. A TMA-k esetében az ugyanazon esethez tartozó szövethengerek H-score értékeit

átlagoltuk. A *cut-off* értékeket a H-score értékek alapján állapítottuk meg vizsgálatonként külön-külön, hogy az adott vizsgálaton belül a különböző fehérjék expressziós szintjei jobban összehasonlíthatóvá váljanak.

Az NGS-kohorsz esetében a két Rictor (Bethyl, Cell Signaling) és a p-Akt festéseket $100 \leq$ H-score értéknél tekintettük magas expressziójúnak. Az SCLC-kohorsznál az mTOR-markerek *cut-off* értékeit a különböző ellenanyagok medián (50. percentilis) H-score értékei alapján határoztuk meg. Az így meghatározott *cut-off* értékek szerint magas expressziót állapítottunk meg a következőknél: $71 \leq$ H-score a p-mTOR, $26 \leq$ H-score a p-S6, $72 \leq$ H-score a Rictor, illetve $15 \leq$ H-score a p-Akt esetében. Az SCLC-kohorsznál a molekuláris szubtípus markerek *cut-off* értékeit egy korábbi, az SCLC szubtípusairól szóló tanulmány alapján határoztuk meg [181]. Ennek alapján, magas expressziót állapítottunk meg mind a négy szubtípus marker esetében az $50 <$ H-score értéknél. Az eseteket a szubtípus markerek H-score értékei alapján ASCL1-domináns, NeuroD1-domináns, POU2F3-domináns, YAP1-domináns és négyszeresen negatív (olyan esetekben, ahol egyik szubtípus marker H-score értéke sem volt magasabb mint 50) alcsoportokba soroltuk.

3.3.3. Az mTOR-markerek vizsgálata WesTM Simple módszerrel

A fehérjeexpresszió mennyiségi elemzéséhez a humán SCLC-sejtvonalakból (lásd 3.4.1. *alfejezet*) a fehérjéket lízispufferrel (50 mM Tris, 10% glicerin, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40, 10 mM NaF, 1 mM fenilmetil-szulfonil fluorid, 0,5 mM Na₃VO₄, pH 7,5) extraháltuk. A minták fehérjekoncentrációját Bradford-módszerrel (Bio-Rad Laboratories, Inc.) határoztuk meg.

Kapilláris alapú WesTM Simple technikát (ProteinSimple; San Jose, CA, USA) alkalmaztunk, melyhez a mintákat mintapufferben (ProteinSimple) 0,2 vagy 1 µg/µl végkoncentrációra hígítottuk (az alkalmazott primer antitesttől függően), majd hozzáadtuk a Fluorescent Master Mixet (ProteinSimple). A mintákat inkubáltuk (95°C, 5 perc), majd az elsődleges antitestekkel (a vizsgált antitestek teljes listáját az **5. táblázat** tartalmazza), a másodlagos antitestekkel (Anti-Rabbit Detection Module és/vagy Anti-Mouse Detection Module – ProteinSimple) és a kemilumineszcens szubsztráttal (ProteinSimple) együtt a WesTM Simple kapilláris plate-re mértük. A vizsgált antitestek

molekulatömegének megfelelően a detektálást 12-230 kDa szeparációs modullal (ProteinSimple) végeztük. Az egyes lépések alapértelmezett paraméterbeállításai a következők voltak: szeparálás 395 V-on 30 percig; blokkolás 5 percig; inkubáció primer antitestekkel és szekunder detektáló készlettel 30-30 percig; és luminol/peroxidáz detektálás 15 percig. Az adatok kiértékelését a Compass szoftverrel (6.1 verzió; San Jose, CA, USA) végeztük. Az elektroferogramokat automatikus műszeres csúcsdetektálás beállításával számszerűsítettük, és amennyiben szükséges volt, manuális korrekciót végeztünk. A normalizált fehérjeexpressziós különbségek elemzéséhez anti-GAPDH-t használtunk.

5. táblázat A WesTM Simple vizsgálatainkhoz használt ellenanyagok listája.

Primer antitest	Gyártó	Katalógusszám (klón)	Hígítás	Funkció, jelentőség
Anti-phospho-mTOR (Ser2448)	Cell Signaling	#2976 (49F9)	1:50	mTOR-kináz aktív formája
Anti-mTOR	Cell Signaling	#2983 (7C10)	1:50	mTOR-kináz mennyisége
Anti-phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser240/244)	Cell Signaling	#2215	1:50	mTORC1-aktivitás
Anti-S6 Ribosomal Protein	Cell Signaling	#2317 (54D2)	1:50	S6 fehérje mennyisége
Anti-Rictor	Cell Signaling	#2140	1:50	mTORC2 mennyisége
Anti-phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling	#4060 (D9E)	1:50	mTORC2-aktivitás
Anti-Akt (pan)	Cell Signaling	#4691 (C67E7)	1:50	Akt fehérje mennyisége
Anti-GAPDH	Abcam	ab8245 (6C5)	1:50	GAPDH fehérje mennyisége

3.4. *In vitro* vizsgálatok humán SCLC-sejtvonalakon

3.4.1. Sejt- és szövettenyésztés

Az *in vitro* vizsgálatainkhoz nyolc humán SCLC-sejtvonalat választottunk ki, melyek a következők voltak: DMS 53 (ATCC-CRL-2062), DMS 153 (ATCC-CRL-2064), H146 (ATCC-HTB-173), H196 (ATCC-CRL-5823), H446 (ATCC-HTB-171), H841 (ATCC-CRL-5845), H1048 (ATCC-CRL-5853) és SHP-77 (ATCC-CRL-2195). A sejtvonalakat RPMI-1640 (Merck-Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) médiumban tenyésztettük, 10% foetalis borjúsavóval (Biosera; Nuaille, Franciaország), 2 mM L-glutaminnal (Biosera) és antibiotikummal (80 mg/2 ml gentamicin – Sandoz; Basel,

Svájc), 37°C-on, 5%-os CO₂ mellett. Az adherens és a szuszpenziós, illetve a kevert (adhéziós és szuszpenziós fázissal is rendelkező) sejteket az adott sejtvonal növekedési jellemzőinek megfelelően 4-6 naponta passzáltuk, foszfátpufferes (PBS-es) mosást követő 1x-es tripszin-EDTA-oldat (Biosera) hozzáadásával. A sejteket T25-ös sejttenyésztő flaskákban (TPP Techno Plastic Products; Trasadingen, Svájc) tartottuk fent sejtvonaltól függően különböző kiindulási sejtszámmal ($3-5 \times 10^5$ sejt/5 ml/T25). A proliferációs vizsgálatokhoz 96-well plate-eket (Sarstedt; Nümbrecht, Németország) használtunk ($5 \times 10^3-1 \times 10^4$ sejt/100 µl adherens és kevert sejteknél; $2-3 \times 10^4$ sejt/100 µl szuszpenziós sejteknél).

3.4.2. Kemoterápiás és mTOR-gátló kezelések proliferációgátló hatásainak vizsgálata az SCLC-sejtvonalakon *in vitro*

Az *in vitro* kezelések során a következő kezelőszereket alkalmaztuk mono- és kombinációs terápiában 72 órán keresztül: cisplatin (kemoterápiás szer; 3 µM – Accord Healthcare Limited; London, Egyesült Királyság), rapamycin (allosztérikus mTOR-gátló; 50 ng/ml – Merck-Sigma-Aldrich), PP242 (kettős mTORC1- és mTORC2-gátló; 1 µM – Tocris Bioscience; Bristol, Egyesült Királyság), vistusertib (kettős mTORC1- és mTORC2-gátló; 0,1 µM – Cayman Chemical Company; Ann Arbor, MI, USA), dactolisib (duál PI3K-, mTOR-kináz-gátló; 1 µM – Cayman Chemical Company) és ipatasertib (Akt-gátló; 1 µM – Selleck Chemicals; Houston, TX, USA). Az alkalmazott koncentrációkat korábbi vizsgálataink és különböző irodalmi adatok alapján választottuk ki [34, 36, 208-210]. A kombinációs kezelések hatásainak kvantitatív értékelésére a kombinációs index (CI) számítási módszert alkalmaztuk a következő képlet felhasználásával:

$$CI = \frac{Ea+Eb}{Eab},$$

ahol *Ea* és *Eb* az egyes monoterápiás kezelések proliferációgátló hatásai, *Eab* pedig a kombinált kezelések hatása. A kapott CI-értéktől függően a kombinációs kezelések hatását szinergista ($CI < 1$), additív ($CI = 1$) vagy nem hatásos ($1 < CI$) kezelésnek minősítettük [211].

3.4.3. *In vitro* proliferációs tesztek

A kezelések rövidtávú (72 óra) proliferációgátló hatásainak vizsgálatához alamarBlueTM (AB, 10 µl/well/96-well plate – Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) tesztet használtunk, amely a sejtek metabolikus aktivitását számszerűsíti. Az AB-ben található resazurin (kék) resorufinná (rózsaszín) redukálódik az élő sejtekben, ami kvantitatívan mérhető. A kezelés vége előtti 4. órában adtuk hozzá az AB-t a sejtekhez, majd az inkubációt (37°C, 4 óra) követően a fluoreszcencia változást fluoriméterrel (Fluoroskan Ascent FL és Ascent Software – Labsystems International; Vantaa, Finnország) mértük le 570-590 nm-en.

A sejtek teljes fehérjetartalmának meghatározására a sulforhodamine B (SRB – Merck-Sigma-Aldrich) tesztet használtunk, amely az AB-mérés után közvetlen alkalmazható. A sejteket hideg triklórecetsavval (10%, 50 µl/well) fixáltuk (4°C, 1 óra), majd a plate-et csapvízzel mostuk és szárítottuk. Ezt követően a sejteket SRB-vel (0,4 m/V%, 50 µl/well) inkubáltuk 15 percig szobahőmérsékleten, majd a nem kötött SRB-oldatot ecetsavval (1%) mostuk. A szárítást követően Tris-base oldatot (10 mM, 150 µl/well – Merck-Sigma-Aldrich) alkalmaztunk a sejtek fehérjéihez kötött SRB szolubilizálására. Az abszorbancia értékeket microplate olvasóval (Multiskan MS és Transmit Software – Labsystems International) mértük 570 nm-en.

Mindkét proliferációs tesztet 3 független kísérlet 6 párhuzamos mintájának értékelésével végeztük, az eredményeket a kezeletlen kontroll sejtek %-ában adtuk meg.

3.4.4. Sejtblokk-készítés

FISH- és IHC-vizsgálatok céljából sejtblokkokat készítettünk a nyolc humán SCLC-sejtvonalból. Ehhez $2-5 \times 10^6$ sejtet gyűjtöttünk össze, amelyeket PBS-sel mostuk, centrifugáltuk, majd a sejteket 96%-os etanolban fixáltuk (20 perc). A fixált sejteket tüllzacskóba, majd szövettani kazettába helyeztük. A sejtek utófixálását (4%-os paraformaldehid, 1 óra), majd víztelenítését (felszálló alkoholsor, majd xilol) követően a mintákat paraffinba ágyasztuk, és 2-3 µm-es metszeteket készítettünk.

3.5. Xenograft vizsgálatok és *in vivo* kezelések

Az *in vivo* xenograft kezelésekhez 1×10^7 H146 sejtet injektáltunk hím immunhiányos (SCID) egerek (8-10 hetesek) háti régiójába *subcutan*. Miután a daganat tapinthatóvá vált (3-5 hét alatt), az egereket randomizált módon két csoportba (7-9 egér/csoport) osztottuk. A humán NCCN irányelveinek (3.2023 verzió) megfelelő kezelési protokollt módosítottuk az egerek kezeléséhez: (1) kontroll sóoldat (intravénásan); (2) cisplatin (intravénásan 0,12 mg/egér; az 1. napon – Accord Healthcare Limited) és etoposide (intravénásan 0,24 mg/egér; az 1-3. napon – Sandoz). Ezt a ciklust két héttel később megismételtük, majd az egereket a 30. napon termináltuk. Az egerek testtömegének és a tumorok méretének változását a kezelés során folyamatosan regisztráltuk. A tumor térfogatát a következő egyenlettel számoltuk ki:

$$\frac{\pi}{6} \times \left(\frac{2 \times \text{rövidebb átmérő} + \text{hosszabb átmérő}}{3} \right)^3$$

Szintén SCID egereken végeztünk el egy további xenograft kísérletet, amely során 1×10^7 H146 sejtet injektáltunk *subcutan* 8-10 hetes hím egerekbe. Amint a tumorok tömege elérte az 1 cm^3 térfogatot, a tumorokat új állatokba ültettük át, közel 9 hónapon keresztül.

A kísérletek végeztével a terminált állatok tumorainak tömegét megmértük. Az eltávolított tumorokat formalinban fixáltuk és paraffinba ágyasztuk további vizsgálatokhoz.

3.6. Statisztikai analízis

A statisztikai analíziseket az IBM SPSS Statistics (25 verzió – SPSS Inc.; Chicago, IL, USA) szoftverrel végeztük. A parametrikus adatok esetében két csoport összehasonlítására kétmintás t-próbát, egyirányú ANOVA-t és Tukey-tesztet, míg a nem parametrikus adatok elemzésére a Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztuk. A kategorikus változók összehasonlítására a Khi-négyzet próbát és a Fisher-féle egzakt tesztet alkalmaztuk. A korreláció számításához a Spearman-féle rangkorrelációt, túlélési adatok

elemzéshez a Kaplan-Meier-módszert használtunk, a túlélési görbéket pedig a log-rank teszttel hasonlítottuk össze. A $P < 0,05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

3.7. Vizsgálatainkhoz szükséges engedélyek

Retrospektív vizsgálatainkat a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (SE KREB-216/2020) és az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának (No. 7/2006), valamint a Mayo Klinika Kutatásetikai Bizottságának (IRB#: 18-001887) jóváhagyásával végeztük.

Az *in vivo* xenograft kísérleteinket a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetének állatházában végeztük. Az *in vivo* kísérletekhez az alábbi hivatalos engedélyekkel rendelkezik intézetünk és munkacsoportunk: PE/EA/801-7/2020 – jóváhagyási dátum: 2020. szeptember 16., PEI/001/1733-2/2015 – jóváhagyási dátum: 2015. október 14

Az 1-5, 7, 9-10 ábrákat a BioRender (www.biorender.com) online képszerkesztő programmal készítettük, a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetének előfizetését használva.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A *RICTOR*-amplifikáció előfordulásának vizsgálata a különböző daganatokban és SCLC-kben

4.1.1. A TSO500 NGS-sel kimutatott *RICTOR* gén kópiaszám-változások háttérében álló feltételezett amplifikáció validálása és vizsgálata különböző daganatokban

Intézetünkben 2018 és 2022 között 420 esetben készült TSO500-vizsgálat, a vizsgálatba bevont daganattípusok eloszlását a **6. táblázat** részletezi. A tumorminták szövettani klasszifikációjának ellenőrzését a 4. és 5. kiadású *WHO Classification of Tumours* alapján végeztük.

6. táblázat A Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében 2018 és 2022 között szekvenált daganattípusok kategorizálása (*WHO Classification of Tumours*, 4. és 5. kiadás).

Főbb daganattípusok	Esetszám	Eloszlás
Emésztőrendszeri daganatok (pl.: colorectalis adenocarcinoma, hasnyálmirigy adenocarcinoma, gyomor adenocarcinoma, cholangiocarcinoma)	89	21,2%
Központi idegrendszeri daganatok (pl.: glioblastoma, astrocytoma, ependymoma, medulloblastoma)	82	19,5%
Lágyrész- és csontdaganatok (pl.: synovialis sarcoma, alveolaris rhabdomyosarcoma, angiosarcoma, Ewing-sarcoma)	69	16,4%
Női genitális traktus daganatok (pl.: tubo-ovariális „high-grade” serosus carcinoma, endometrioid endometrialis carcinoma, méhnyak laphámcarcinoma, choriocarcinoma)	52	12,4%
Endokrin szervek daganatai (pl.: papilláris és medulláris pajzsmirigy carcinoma, mellékpajzsmirigy carcinoma, mellékvese carcinoma, neuroblastoma)	35	8,3%
Mellkasi daganatok (pl.: tüdő adenocarcinoma, tüdő laphámcarcinoma, mesothelioma)	34	8,1%
Emlődaganatok (pl.: invazív emlőcarcinoma NST)	25	6,0%
Húgyúti és férfi genitális traktus daganatok (pl.: urachalis carcinoma, urothelialis carcinoma, prosztatata adenocarcinoma)	10	2,4%
Egyéb daganatok (pl.: ismeretlen eredetű mucinós adenocarcinoma, retinoblastoma)	8	1,9%
Vérképző- és nyirokszervi daganatok (pl.: diffúz nagy B-sejtes lymphoma)	6	1,4%
Fej-nyaki daganatok (pl.: szájüregi laphámcarcinoma, nyálmirigy adenoid cysticus carcinoma)	6	1,4%
Bőrdaganatok (pl.: melanoma)	4	1,0%
Összesen	420	100%

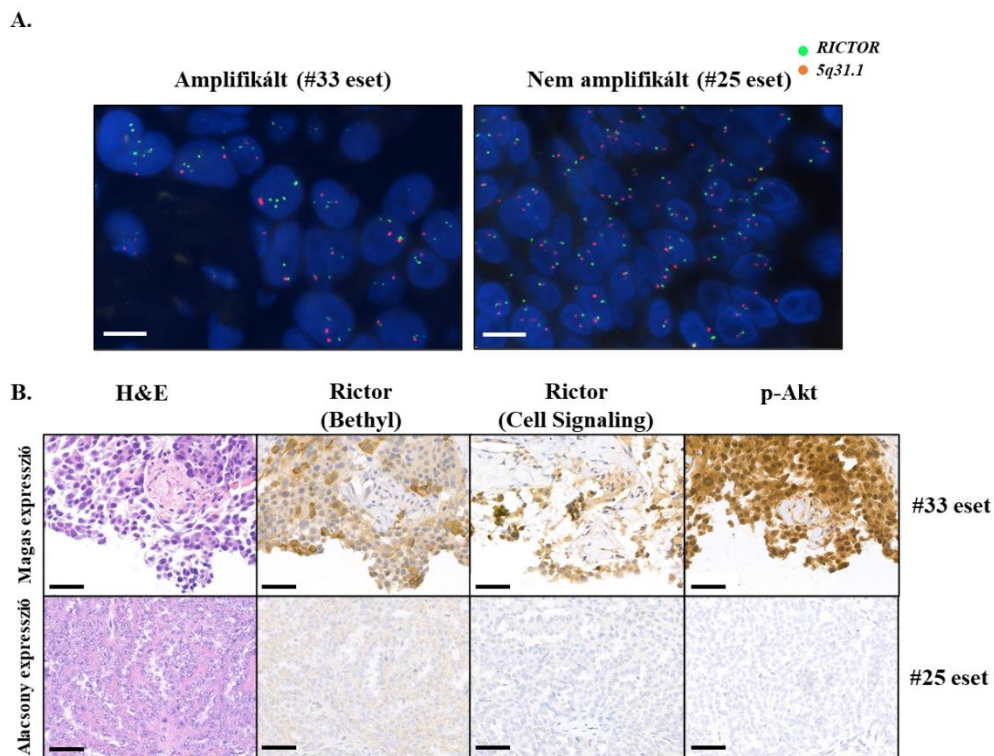
Az NGS-vizsgálatok eredményei alapján 420 esetből 37-ben (8,8%) feltételeztük a *RICTOR*-amplifikáció jelenlétét ($3 \leq \text{RICTOR CNV}$), és ezeket az eseteket választottuk ki további molekuláris és IHC-vizsgálatokhoz. A 37 kiválasztott eset klinikopatológiai jellemzői a következők voltak: 54% nő (20/37) és 46% férfi (17/37); 65% 65 évnél fiatalabb (24/37). A betegek részletes adatai, illetve a tumorminták származási helyei, diagnózisai és a főbb daganattípus besorolásai a **7. táblázatban** láthatók.

7. táblázat A 37 potenciálisan *RICTOR*-amplifikált eset részletes klinikopatológiai jellemzői és diagnózisai.

Eset	Nem	Életkor (év)	Minta származási helye	Diagnózis	Főbb daganattípusok
#1	F	39,0	Végbél	Colorectalis adenocarcinoma	Emésztőrendszeri daganatok
#2	N	53,1	Végbél		
#3	F	73,5	Végbél		
#4	N	66,3	Nyirokcsomó	Colorectalis neuroendokrin tumor	
#5	N	69,3	Epehólyag	Epehólyag adenocarcinoma	
#6	F	26,1	Gyomor	Gyomor adenocarcinoma	
#7	F	56,2	Máj	Hasnyálmirigy adenocarcinoma	
#8	N	56,6	Máj		
#9	F	63,0	Hasnyálmirigy		
#10	N	18,1	Hasnyálmirigy	Hasnyálmirigy neuroendokrin tumor	
#11	F	80,9	Máj		
#12	N	6,1	Agy	Astrocytoma, IDH-mutáns	Központi idegrendszeri daganatok
#13	F	16,3	Agy	Csírsejtes tumor	
#14	F	36,1	Agy	Embriónális tumor NOS	
#15	F	6,3	Agy	Glioblastoma	
#16	N	52,4	Agy		
#17	F	8,0	Agy	Medulloblastoma	
#18	N	49,7	Mellkas	Dedifferenciált liposarcoma	Lágyrész- és csontdaganatok
#19	F	67,8	Retroperitoneum		
#20	F	88,3	Retroperitoneum		
#21	N	0,1	Bőr	Infantil fibrosarcoma	Női genitális traktus daganatok
#22	N	71,7	Méh	Dedifferenciált endometrialis carcinoma	
#23	N	77,8	Méh	Endometrialis carcinosarcoma	
#24	N	43,7	Cseplesz	Méhnyak laphámcarcinoma	
#25	N	48,3	Agy	Tubo-ovariális „high-grade” serosus carcinoma	
#26	N	58,8	Cseplesz		
#27	N	66,8	Petefészek		
#28	N	76,3	Cseplesz		
#29	F	54,6	Mellékvese	Mellékvesekéreg carcinoma	Endokrin szervek daganatai
#30	F	54,3	Tüdő	Tüdő adenocarcinoma	Mellkasi daganatok
#31	N	68,0	Tüdő		
#32	N	70,4	Agy		
#33	F	75,7	Nyirokcsomó	Tüdő laphámcarcinoma	
#34	N	40,7	Emlő	Invazív emlőcarcinoma NST (Her2-, ER+, PR- és Her2+, ER-, PR-)	Emlődaganatok
#35	N	47,5	Csont		
#36	F	47,7	Fülmirigy	Nyálmirigy adenoid cysticus carcinoma	Fej-nyaki daganatok
#37	F	30,3	Nyelv	Szájüregi laphámcarcinoma	
Rövidítések: F. férfi; N. nő.					

Rövidítések: F, férfi; N, nő.

A feltételezett *RICTOR*-amplifikációt a „*gold standard*” validációs módszernek számító FISH-vizsgálattal validáltuk, és párhuzamosan a *RICTOR*-kópiaszám változását ddPCR-rel is vizsgáltuk. *RICTOR*-amplifikációt 16 esetben (16/37) validáltuk FISH-sel és 11 esetben (11/37) mutattuk ki ddPCR-rel. Továbbá a Rictor- és a p-Akt-expresszió értékelésére IHC-festéseket is végeztünk. Ehhez két különböző cégtől (Bethyl és Cell Signaling) származó Rictor antitestet is alkalmaztunk. Magas Rictor-expressziót 14 (14/37) esetben mutattunk ki a Bethyl és 12 esetben (12/37) a Cell Signaling antitesttel. Magas p-Akt-expressziót 7 esetben (7/37) mutattunk ki. A **11. ábrán** egy *RICTOR*-amplifikált és egy nem amplifikált eset FISH- és IHC-festéseinek fotódokumentációja látható.



11. ábra Reprezentatív képek egy *RICTOR*-amplifikált és egy nem amplifikált eset FISH-vizsgálatáról (A.) és IHC-festéseiről (B.). A bemutatott tüdő laphámcarcinoma eset (#33) *RICTOR*-amplifikációt mutatott magas Rictor- és magas p-Akt fehérjeexpresszióval. A tubo-ovariális „high-grade” serosus carcinoma esetben (#25) nem igazolódott *RICTOR*-amplifikáció és ezzel összefüggésben a Rictor és p-Akt immunfestések is negatívnak bizonyultak. A FISH-nél a zöld és a narancssárga jelek a *RICTOR* gént és a kontroll-lókuszt (5q31.1) jelzik. A méretskálák 5 µm-t (FISH), illetve 50 µm-t jelölnek (IHC).

4.1.1.1. Az *RICTOR* CNV NGS-, a FISH-, a ddPCR-, valamint a Rictor és p-Akt fehérjék *in situ* IHC-eredmények összehasonlító elemzése

Összehasonlítva a *RICTOR* amplifikációs és az ezzel összefüggő fehérjeexpressziós vizsgálatok eredményeit az NGS *RICTOR* CNV-adatokkal megállapítottuk, hogy: a.) az NGS-eredmények alapján az $5 \leq \text{RICTOR CNV-ének}$ van a legjobb prediktív értéke a *RICTOR*-amplifikáció jelzésében (4/5); b.) további 5 olyan esetben is validáltuk a *RICTOR*-amplifikációt FISH-sel, ahol NGS *RICTOR* CNV-érték

4 vagy annál nagyobb volt (9/12); c.) meglepő módon, az alacsonyabb NGS CNV-csoportba (3,00-3,99; 25/37) tartozó esetek között is sikerült FISH-sel validálni (7/25), vagy ddPCR-rel *RICTOR*-amplifikációt kimutatni (4/25); d.) a ddPCR csak 11 *RICTOR*-amplifikált esetet erősített meg a 16 FISH-validált eset közül; 4 eset ezek közül az alacsonyabb NGS CNV-csoportba tartozott (**8. táblázat**).

8. táblázat A FISH- és a ddPCR-eredmények összehasonlítása a $3 \leq \text{RICTOR CNV}$ -vel rendelkező esetekben.

NGS	FISH		ddPCR	
	Amplifikált	Nem amplifikált	Amplifikált	Nem amplifikált
25 eset 3,00-3,99 CNV értékkel (67,5%)	7 (28%)	18 (72%)	4 (16%)	21 (84%)
7 eset 4,00-4,99 CNV értékkel (19%)	5 (71%)	2 (29%)	4 (57%)	3 (43%)
5 eset CNV $\geq$ 5,00 értékkel (13,5%)	4 (80%)	1 (20%)	3 (60%)	2 (40%)
Összesen (N = 37)	16	21	11	26

Végezetül, erős pozitív korrelációt figyeltünk meg a FISH-sel kimutatott *RICTOR/5q31.1* és a ddPCR-rel kimutatott *RICTOR/AP3B1* arányok között ($R = 0,491$; $P = 0,004$). Továbbá a FISH-validált *RICTOR*-amplifikációs státusszal összehasonlítva mindhárom IHC-festés kombinált értékelése 81%-os (13/16) szenzitivitást és 67%-os (14/21) specificitást mutatott a vizsgált 37 esetben (**9. táblázat**). A különböző forgalmazóktól (Bethyl és Cell Signaling) származó Rictor antitestek H-score értékei is erős pozitív korrelációt mutattak egymással ($R = 0,639$; $P = 0,000$). Azonban, a p-Akt H-score értékei csak a Rictor antitest (Cell Signaling) H-score értékekkel korreláltak ($R = 0,528$; $P = 0,002$).

9. táblázat Mindhárom IHC-festés és a FISH-eredmények együttes értékelése.

FISH-eredmények	Magas Rictor-expresszió (Bethyl)	Magas Rictor-expresszió (Cell Signaling)	Magas Rictor-expresszió (Bethyl és/vagy Cell Signaling)	Magas p-Akt-expresszió	Magas Rictor- és/vagy p-Akt-expresszió (Bethyl és/vagy Cell Signaling)
Amplifikált esetek (N = 16)	9 (56%)	7 (44%)	10 (63%)	6 (38%)	13 (81%)
7 eset 3,00-3,99 CNV értékkel (28%)	3 (43%)	4 (57%)	4 (57%)	3 (43%)	5 (71%)
5 eset 4,00-4,99 CNV értékkel (71%)	4 (80%)	2 (40%)	4 (80%)	2 (40%)	5 (100%)
4 eset CNV $\geq$ 5,00 értékkel (80%)	2 (50%)	1 (25%)	2 (50%)	1 (25%)	3 (75%)
Nem-amplifikált esetek (N = 21)	5 (24%)	5 (24%)	7 (33%)	1 (5%)	7 (33%)

4.1.1.2. *RICTOR* CNV NGS-eredmények összehasonlítása nyilvánosan elérhető adatbázisadatok *RICTOR* gént érintő eltéréseinek gyakoriságával

Összehasonlítottuk a *RICTOR* CNV NGS-eredményeket nyilvánosan elérhető adatbázisok *RICTOR* gén eltéréseinek gyakorisági adataival (**10. táblázat**). Az összehasonlító értékeléshez két adatbázist használtunk: a cBioPortal (www.cbioportal.org) adatbázis két adatkészletét (MSK MetTropism és TCGA PanCancer Atlas), valamint a CNVIntegrate-et (www.cnvintegrate.cgm.ntu.edu.tw). Utóbbi az első olyan adatbázis, amely egészséges emberek és daganatos betegek CNV-értékeit gyűjti össze, különböző daganattípusokra vonatkozóan, lehetővé téve a statisztikai összehasonlítást különböző populációkban előforduló kópiaszám-gyakoriságok között is.

10. táblázat A *RICTOR* CNV NGS-eredmények összehasonlítása a nyilvánosan elérhető adatbázisadatok *RICTOR* gén eltéréseinek gyakoriságával nem szelektált humán daganatokban. A zöld szín az alacsony prevalenciát, a piros szín a *RICTOR* gént érintő eltérések gyakoriságának magas prevalenciáját jelzi.

Főbb daganattípusok		CNVIntegrate (N = N.E.)	cBioPortal		Saját NGS eredményeink (N = 420)
			MSK MetTropism (N = 25 775)	TCGA, PanCancer Atlas (N = 10 967)	
Emésztőrendszeri daganatok	Hepatobiliaris traktus	5,31%	0,22%	0,82%	0,24%
	Gyomor	4,99%	1,24%	-	0,24%
	Hasnyálmirigy	0,24%	0,40%	0,54%	1,19%
	Nyelőcső	7,31%	2,32%	6,61%	-
	Vastagbél	0,52%	1,87%	0,68%	0,95%
Központi idegrendszeri daganatok		0,09%	-	0,20%	1,43%
Lágyrész- és csontdaganatok		4,73%	3,02%	4,74%	0,95%
Női genitális traktus daganatok	Endometrium	1,34%	0,30%	2,42%	0,48%
	Méhnyak	7,03%	-	5,12%	0,24%
	Petefészek	3,58%	0,59%	5,24%	0,95%
Endokrin szervek daganatai	Mellékvese	1,87%	-	5,62%	0,24%
	Pajzsmirigy	0,20%	-	-	-
Mellkasi daganatok	Pleuralis mesothelioma	1,85%	0,41%	-	-
	Tüdő	11,64%	6,80%	9,42%	0,95%
Emlődaganatok		1,40%	0,27%	1,12%	0,48%
Húgyúti és férfi genitális traktus daganatok	Húgyhólyag	6,21%	1,64%	5,39%	-
	Prostata	0,19%	0,32%	0,41%	-
	Vese	0,29%	-	0,39%	-
Vérképző- és nyirokszervi daganatok		0,12%	-	2,08%	-
Fej-nyaki daganatok		5,33%	0,73%	4,06%	0,48%
Bőrdaganatok		2,04%	0,79%	2,45%	-
Rövidítések: N.E., nem elérhető.					

A *RICTOR* gén eltérések hasonló gyakoriságát találtuk több daganattípus esetében is. Adataink legjobban az MSK MetTropism adatkészlettel korreláltak az emlő-, a hepatobiliaris traktus, a női genitális traktus, valamint a fej-nyaki daganatok tekintetében. Az általunk vizsgált esetek közül a potenciális *RICTOR*-amplifikált esetek legmagasabb százalékát a központi idegrendszeri tumoroknál (1,43%), a legalacsonyabbat pedig a hepatobiliaris traktus, a gyomor-, az endometrium- és a mellékvese-daganatoknál (0,24%) találtuk.

Fontos megjegyezni, hogy a három adatbázis a *RICTOR*-t érintő genetikai eltérések gyakoriságát különbözőképpen értékelte. A CNVIntegrate (ismeretlen esetszám) a $2 \leq \text{CNV}$ -értékeket tekintette amplifikálnak. A TCGA PanCancer Atlas ($N = 10\,967$) szintén a $2 \leq \text{CNV}$ -értékeket, míg az MSK MetTropism ($N = 25\,775$) a $2,29 < \text{CNV}$ -értékeket tekintette amplifikálnak. Saját vizsgálatunkban a $3 \leq \text{CNV}$ -értékű eseteket ($N = 37$) tekintettük potenciálisan amplifikálnak.

4.1.1.3. A $3 \leq \text{RICTOR}$ CNV-vel rendelkező esetekben előforduló további, megváltozott kópiaszámú gének

A TSO500 NGS-vizsgálatok eredményei néhány, potenciálisan együttesen előforduló megváltozott kópiaszámú gént is kiemeltek ($3 \leq \text{CNV}$) a FISH-validált, *RICTOR*-amplifikált esetekben. Ezek a megváltozott kópiaszámú gének a következők voltak: *AKT2* (3/16), *BRCA1* (1/16), *CCND1* (5/16), *CCNE1* (2/16), *CDK4* (3/16), *CDK6* (2/16), *EGFR* (3/16), *ERBB2* (3/16), *ERBB3* (1/16), *ERCC1* (1/16), *ERCC2* (1/16), *ESR1* (1/16), *FGF3* (3/16), *FGF4* (1/16), *FGF10* (2/16), *FGF19* (2/16), *FGFR1* (3/16), *FGFR3* (2/16), *FGFR4* (3/16), *JAK2* (1/16), *KIT* (2/16), *KRAS* (2/16), *MDM2* (1/16), *MDM4* (4/16), *MET* (3/16), *MYC* (8/16), *MYCL* (1/16), *NMYC* (1/16), *PDGFRA* (2/16), *PIK3CA* (2/16), *PIK3CB* (1/16), *RET* (2/16), *RPS6KB1* (2/16), *TFRC* (1/16).

Ezek közül az *FGFR4* és az *FGF10* szintén az 5. kromoszómán található, mint a *RICTOR* is. Továbbá a *RICTOR* (5p13.1) és az *FGF10* (5p12) gének közötti távolság viszonylag kicsi, ami utalhat a két gént érintő eltérés együttes előfordulására.

4.1.1.4. Újonnan kimutatott, *RICTOR*-amplifikációval rendelkező daganattípusok

A *RICTOR*-amplifikációt 6 fő daganattípusban, 14 diagnózisban tudtuk validálni (**11. táblázat**). Több diagnózis esetében (N = 10) is először mutattuk ki a FISH-validált *RICTOR*-amplifikációt. Ezek a következő entitások voltak: epehólyag adenocarcinoma, hasnyálmirigy neuroendokrin tumor, astrocytoma (*IDH*-mutáns), glioblastoma, dedifferenciált liposarcoma, endometrialis carcinosarcoma, dedifferenciált endometrialis carcinoma, tüdő laphámcarcinoma, invazív emlőcarcinoma NST (Her2-, ER+, PR-), szájüregi laphámcarcinoma.

11. táblázat *RICTOR*-amplifikációval kapcsolatos eredményeink és a korábban már leírt *RICTOR* gén/expressziós változások.

Főbb daganattípusok	Diagnózisok	Potenciális <i>RICTOR</i> -amplifikált esetek NGS-sel/FISH-validált <i>RICTOR</i> -amplifikált esetek	<i>RICTOR</i> -amplifikációról és/vagy magas Rictor-expresszióról szóló publikációk (számok a publikációkat jelölik)	
			Gén szinten	Fehérje szinten
Emésztőrendszeri daganatok	*Colorectális adenocarcinoma	3/1 (33%)	[40]	[40, 54-57]
	Colorectalis neuroendokrin tumor	1/0 (0%)	N.E.	N.E.
	#Epehólyag adenocarcinoma	1/1 (100%)	[212]	N.E.
	*Gyomor adenocarcinoma	1/1 (100%)	[40, 50]	[40, 50, 213, 214]
	*Hasnyálmirigy adenocarcinoma	3/1 (33%)	[40]	[44, 215]
	#Hasnyálmirigy neuroendokrin tumor	2/1 (50%)	N.E.	N.E.
Központi idegrendszeri daganatok	#Astrocytoma, <i>IDH</i> -mutáns	1/1 (100%)	N.E.	[72]
	Csírsejtes tumor	1/0 (0%)	N.E.	N.E.
	Embriónális tumor NOS	1/0 (0%)	N.E.	N.E.
	#Glioblastoma	2/1 (50%)	N.E.	[69, 71]
	Medulloblastoma	1/0 (0%)	N.E.	[73]
Lágyrész- és csontdaganatok	#Dedifferenciált liposarcoma	3/1 (33%)	N.E.	[74]
	Infantil fibrosarcoma	1/0 (0%)	N.E.	[75]
Női genitális traktus daganatok	#Dedifferenciált endometrialis carcinoma	1/1 (100%)	N.E.	[81]
	#Endometrialis carcinosarcoma	1/1 (100%)	N.E.	N.E.
	Méhnyak laphámcarcinoma	1/0 (0%)	N.E.	N.E.
	Tubo-ovariális „high-grade” serosus carcinoma	4/0 (0%)	N.E.	N.E.
Endokrin szervek daganatai	Mellékvesekéreg carcinoma	1/0 (0%)	N.E.	N.E.
Mellkasi daganatok	*Tüdő adenocarcinoma	3/3 (100%)	[40, 41, 50]	[31]
	#Tüdő laphámcarcinoma	1/1 (100%)	[216]	N.E.
Emlődaganatok	#Invazív emlőcarcinoma NST (#Her2-, ER+, PR- és Her2+, ER-, PR-)	2/1 (50%)	N.E.	[34, 58-60]
Fej-nyaki daganatok	Nyalmirigy adenoid cisticus carcinoma	1/0 (0%)	N.E.	N.E.
	#Szájüregi laphámcarcinoma	1/1 (100%)	N.E.	[62, 63, 65]
Rövidítések: N.E., nem elérhető *, olyan diagnózisok, ahol a <i>RICTOR</i> -amplifikációt mások FISH-sel kimutatták már; #, FISH-validált <i>RICTOR</i> amplifikált diagnózisok, ahol a <i>RICTOR</i> -amplifikációt mások még nem validálták FISH-sel; félkövér, újonnan FISH-validált és korábban mások által le nem írt (sem gén-, sem fehérjeszinten) diagnózisok <i>RICTOR</i> -amplifikációval.				

Az mTOR/Rictor *in situ* expresszióját és genetikai eltéréseit (pl.: amplifikáció) korábban nem vizsgálták hasnyálmirigy neuroendokrin tumorokban és endometrialis carcinosarcomákban. Vizsgálatunkban az ezekkel a diagnózisokkal rendelkező esetek *RICTOR*-amplifikációt mutattak FISH és ddPCR segítségével; a #11 eset (NGS-kohorsz) hasnyálmirigy neuroendokrin tumor diagnózissal (*RICTOR/5q31.1* arány 2,47 és normalizált *RICTOR/AP3B1* arány 4,83 volt) és a #23 eset (NGS-kohorsz) endometrialis carcinosarcoma diagnózissal (*RICTOR/5q31.1* arány 2 és normalizált *RICTOR/AP3B1* arány 3,21 volt) rendelkezett.

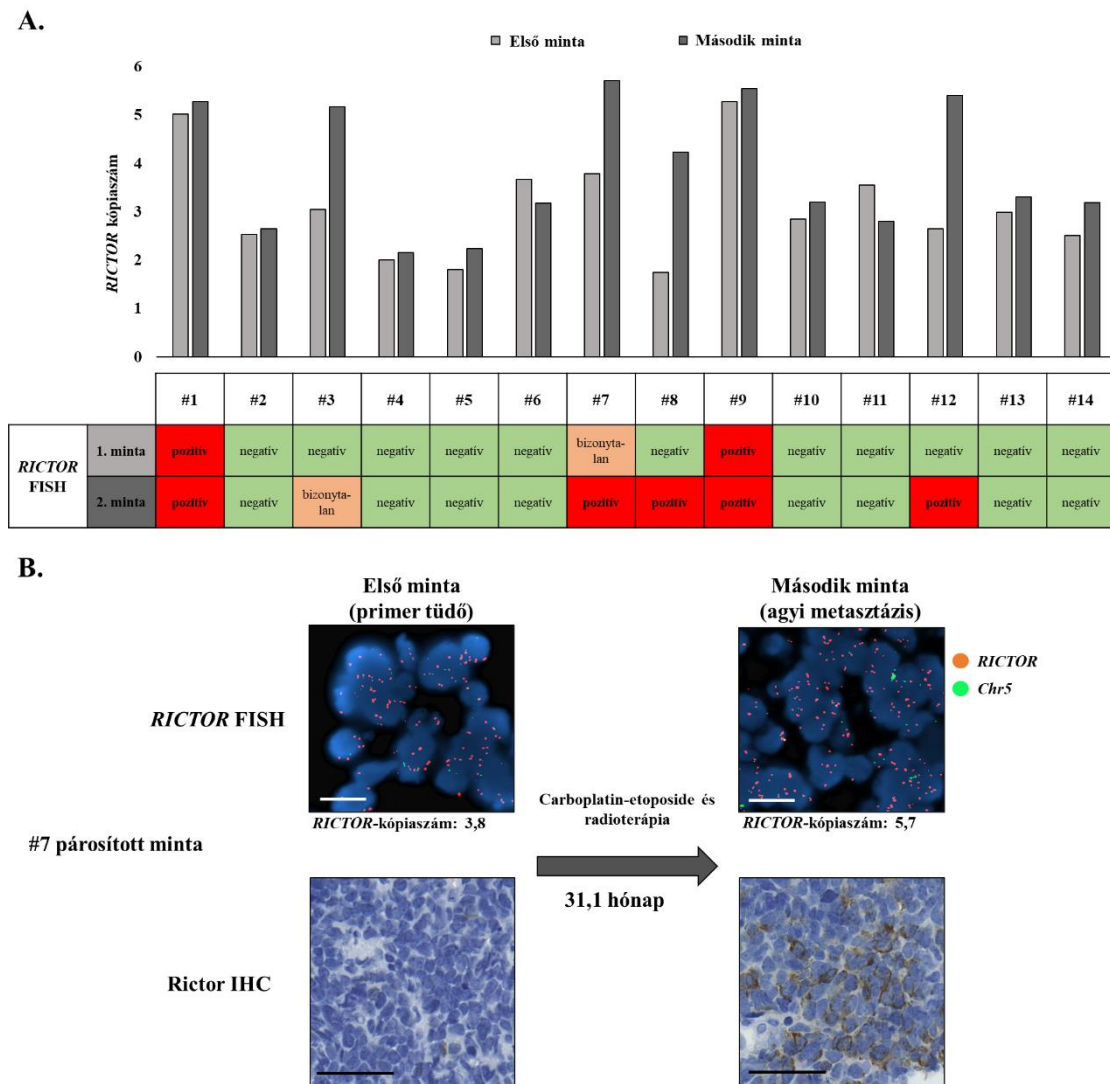
4.1.2. *RICTOR*-kópiaszám és az mTOR-aktivitás változásának vizsgálata párosított betegmintákban az SCLC progressziójával összefüggésben

Vizsgálataink során 14 párosított SCLC-mintát gyűjtöttünk (12. táblázat), melyek közül 10 szövetminta (#1-10), 4 pedig sejtblokkból készült minta (#11-14) volt. A két mintavételi időpont között eltelt idő átlagosan 14,1 (1,2-36,5) hónap volt. A legtöbb beteg a két mintavételi időpont között standard kezelésben részesült (cisplatin-etoposide, carboplatin-etoposide, sugárkezelés).

12. táblázat A párosított SCLC-s betegminták klinikopatológiai jellemzői.

Eset	Életkor az első diagnózis időpontjában	Nem	Első minta származási helye	Második minta származási helye	Biopsziák között eltelt idő (hónap)	Terápia a biopsziák között eltelt időben	Terápiára adott válasz
#1	58	N	Tüdő	Tüdő	N.E.	Carboplatin-etoposide	S.B.
#2	61	F	Tüdő	Tüdő	1,2	N.E.	N.E.
#3	58	F	Tüdő	Tüdő	2,4	N.E.	N.E.
#4	59	N	Tüdő	Tüdő	36,5	Cisplatin-etoposide, radioterápia, carboplatin-etoposide	T.R.
#5	50	F	Tüdő	Tüdő	11,8	Cisplatin-etoposide	N.E.
#6	67	N	Tüdő	Tüdő	12,4	Carboplatin-etoposide, pembrolizumab*	P.B.
#7	58	N	Tüdő	Agy	31,1	Carboplatin-etoposide, radioterápia	N.E.
#8	52	F	Tüdő	Agy	12,0	N.E.	N.E.
#9	57	N	Agy	Agy	20,9	N.E.	N.E.
#10	69	F	Agy	Agy	5,8	N.E.	N.E.
#11	54	F	Tüdő	Nyirokcsomó	N.E.	Cisplatin-etoposide, radioterápia	N.E.
#12	60	F	Nyirokcsomó	Hasnyálmirigy	N.E.	Cisplatin-etoposide, radioterápia, carboplatin-etoposide	S.B.
#13	67	N	Nyirokcsomó	Rekeszizom	N.E.	Cisplatin-etoposide, radioterápia, carboplatin-etoposide	S.B.
#14	75	N	Máj	Máj	6,7	N.E.	N.E.
Rövidítések: F, férfi; N, nő; N.E., nem elérhető; P.B., progresszív betegség; S.B., stabil betegség; T.R., teljes remisszió. * Pembrolizumab kezelés az azonos időben jelen lévő tüdő laphámcarcinoma miatt történt.							

A párosított beteganyagok *RICTOR*-amplifikációs státuszát és *RICTOR*-kópiaszámának változását FISH-sel vizsgáltuk. A kezdeti minták közül 2 *RICTOR*-amplifikált, 1 pedig bizonytalan értékelésű volt. A második mintavételből származó minták esetében 2, már korábban is *RICTOR*-amplifikált minta megtartotta az amplifikációját, 3 pedig újonnan bizonyult *RICTOR*-amplifikáltnak és 1 minta újonnan bizonytalan eredményt mutatott. Továbbá a 14 mintapárból 12-ben nőtt a *RICTOR*-kópiaszám a két mintavétel között eltelt idő során (12/A. ábra).



12. ábra A *RICTOR*-kópiaszám és Rictor-expresszió emelkedése az SCLC progressziója során párosított betegmintákban. (A.) FISH-sel kimutatott *RICTOR* kópiaszám-változás a párosított mintákban két mintavételi időpont között. (B.) *RICTOR*-kópiaszám és Rictor-expresszió növekedése a 7. számú párosított mintában, carboplatin-etoposide és

sugarterápiás kezelés előtt és után. Az első minta a primer tüdőtumorból, a második agyi metasztázisból származik, a mintavételek között eltelt idő 31,1 hónap volt. A narancssárga és a zöld jelek a *RICTOR* gént, illetve a kontroll-lókuszt régióját (*Chr5*) jelzik. A méretskálák 5 µm-t jelölnek a FISH- és 50 µm-t az IHC-képek esetében.

A párosított mintákban az mTORC1- és mTORC2-markerek expressziójának értékelésére IHC-t alkalmaztunk. A p-mTOR-expresszió 6, a p-S6-expresszió 9, a Rictor-expresszió 7, a p-Akt-expresszió pedig 8 esetben nőtt a mintavételek között eltelt idő során. Továbbá a *RICTOR*-amplifikált párosított minták 80%-ában (4/5) nőtt a Rictor-expresszió a két mintavételi időpont között. Egy primer tüdő/agyi metasztázis párosított mintát (#7) emeltünk ki, ahol a *RICTOR*-kópiaszám és a Rictor-expresszió emelkedése látható a két mintavételi időpont között az SCLC progressziója során (**12/B. ábra**).

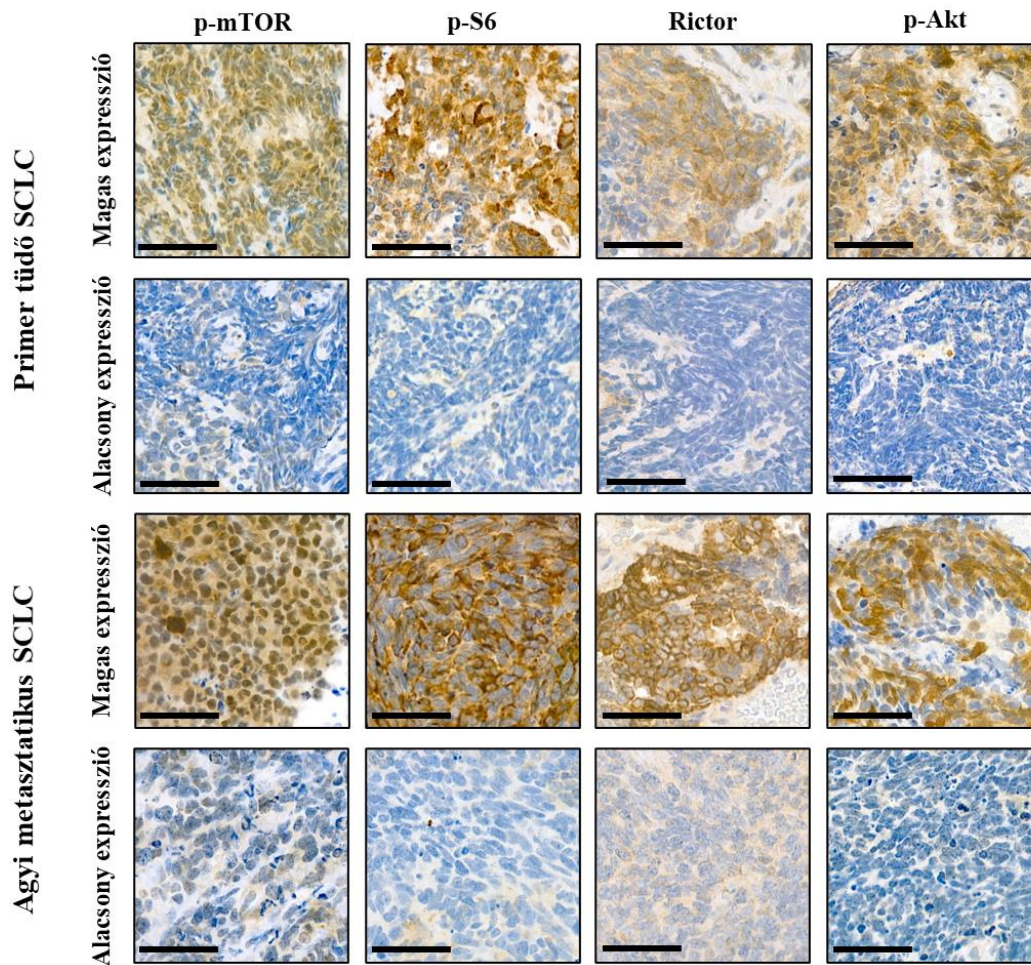
4.2. Az mTOR-aktivitás és a molekuláris szubtípus markerek vizsgálata primer és agyi metasztatikus SCLC-kben

4.2.1. mTORC1- és mTORC2-markerek *in situ* expressziójának vizsgálata primer és agyi metasztatikus SCLC betegmintákban

A primer (N = 50) és agyi metasztatikus (N = 50) SCLC-kben az mTORC1 (p-mTOR, pS6) és az mTORC2 (Rictor, p-Akt) markerek *in situ* expresszióját IHC-vel vizsgáltuk (**13. ábra**). A vizsgálatba bevont SCLC-s betegek klinikopatológiai adatait a **13. táblázat** tartalmazza.

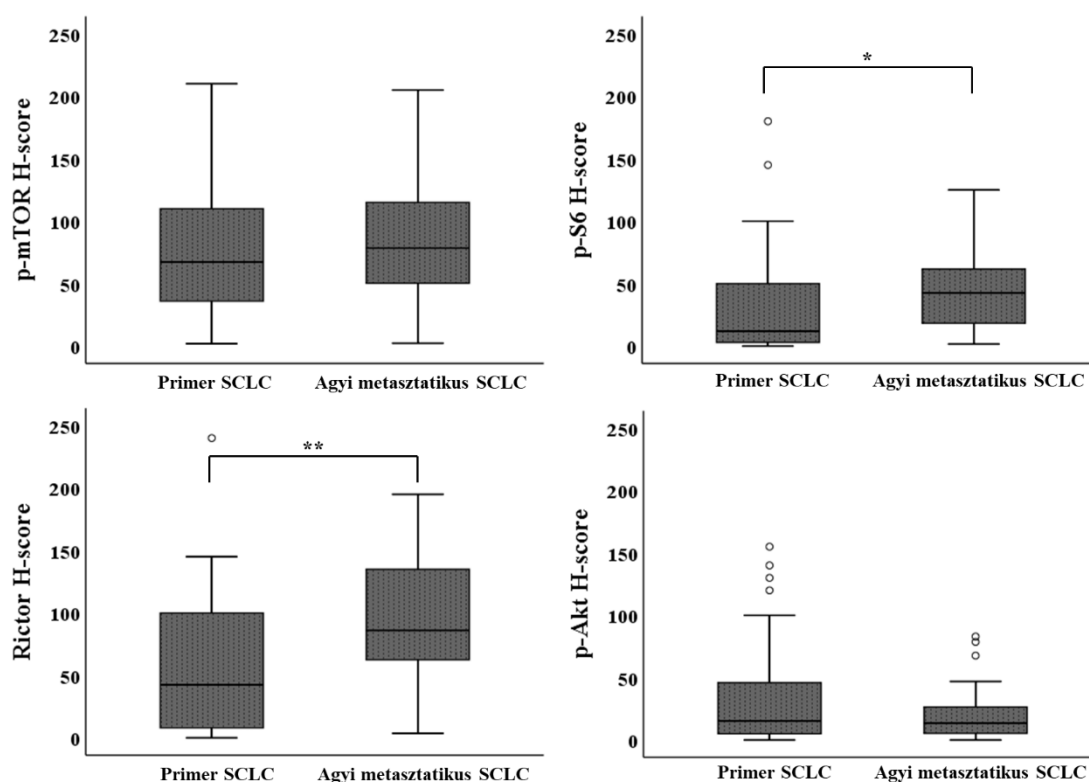
13. táblázat A primer és agyi metasztázisokkal rendelkező SCLC-s betegek klinikopatológia adatai.

	Primer SCLC (N = 50)	Agyi metasztatikus SCLC (N = 50)
Életkor (év)		
< 65	27 (54%)	27 (54%)
≥ 65	23 (46%)	23 (46%)
Nem		
Férfi	30 (60%)	26 (52%)
Nő	20 (40%)	24 (48%)
Túlélés (hónap)		
Átlag (tartomány)	9,69 (0,07-43,89)	6,67 (0,59-33,38)



13. ábra Reprezentatív képek az mTOR-markerek (p-mTOR, p-S6, Rictor, p-Akt) magas és alacsony expressziót mutató IHC-festéseiről primer és agyi metasztatikus SCLC esetekben. A méretskála 50 μm -t jelöl.

A p-mTOR- és a p-Akt-expresszióban nem találtunk szignifikáns különbséget a primer és az agyi metasztatikus esetek között. Érdekes módon a p-S6- és a Rictor-expresszió szignifikánsan magasabb volt az agyi metasztatikus tumorokban ($P < 0,05$ a p-S6 és $P < 0,01$ a Rictor esetében; **14. ábra**).

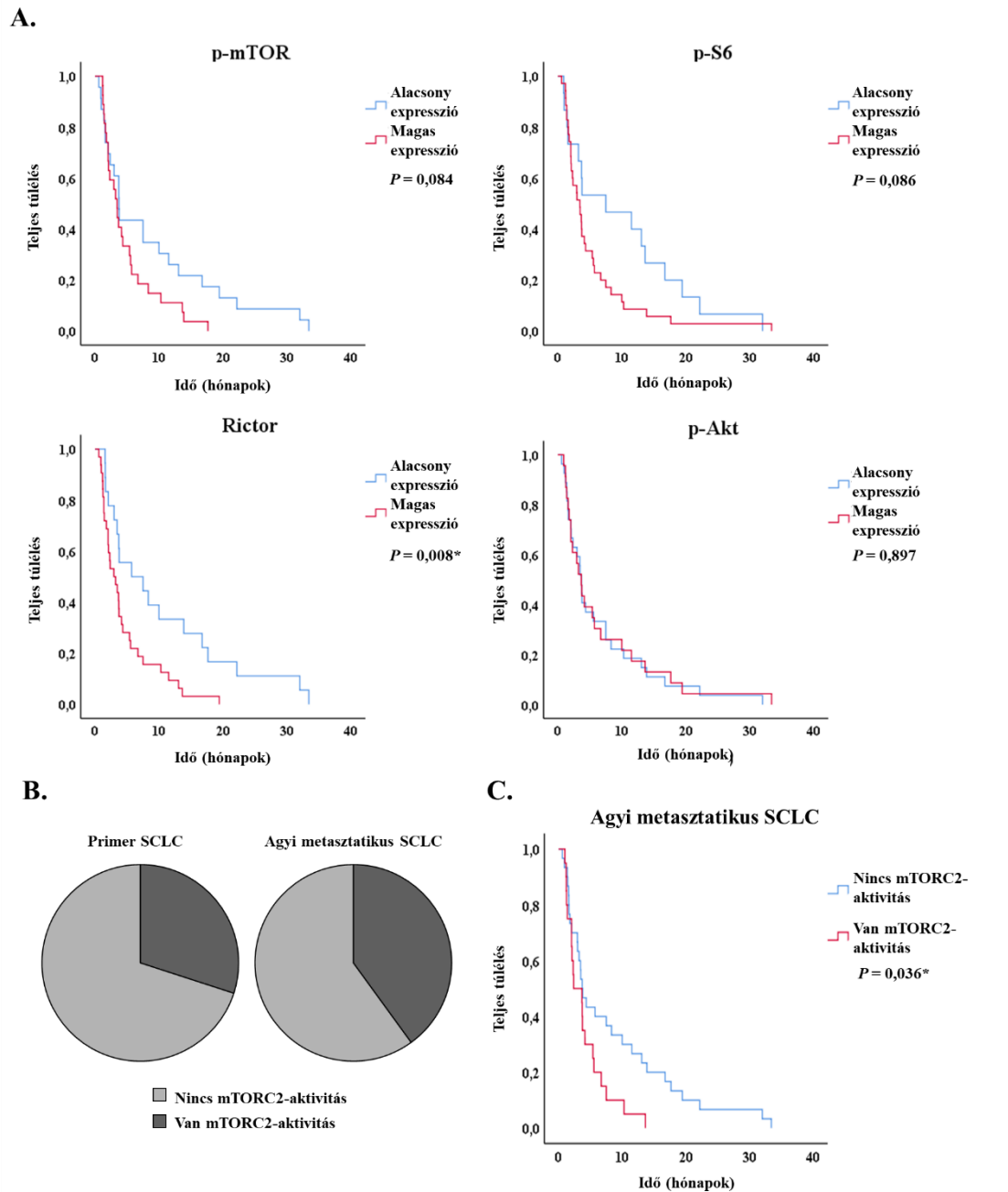


14. ábra Az mTOR-markerek H-score értékeinek prognosztikailag releváns emelkedése az agyi metasztatikus esetekben a primer SCLC-khez képest. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

A klinikopatológiai adatok és az mTOR-markerek expressziója közötti korreláció elemzése során összefüggést találtunk a nem, az életkor és a p-mTOR-expresszió között mind a primer, mind az agyi metasztatikus tumorok esetében. A p-mTOR-expresszió szignifikánsan magasabb volt a primer tumorokkal rendelkező férfiak ($P = 0,015$), valamint a 65 év feletti, agyi metasztázisokkal rendelkező betegek esetében ($P = 0,039$). A többi fehérje esetében nem találtunk szignifikáns összefüggést.

A primer tumorok esetében a p-mTOR-, a p-S6-, a Rictor- és a p-Akt-expresszió nem korrelált a betegek teljes túlélésével, valamint a klinikai kimenetellel. Azonban a magas Rictor-expresszió rövidebb teljes túléléssel társult az agyi metasztázisokkal rendelkező betegek esetében ($P = 0,008$; **15/A. ábra**). Az mTORC2-aktivitás és a betegek túlélési adatai közötti összefüggések vizsgálatához az mTORC2-markerek H-score értéke alapján két csoportot alakítottunk ki: a.) nincs mTORC2-aktivitás (alacsony Rictor-

és/vagy p-Akt-expresszió), b.) van mTORC2-aktivitás (magas Rictor- és/vagy p-Akt-expresszió). Az agyi metasztatikus esetek 40%-ában az mTORC2-aktivitás jelenléte volt igazolható, ami szignifikáns összefüggést mutatott a rövidebb teljes túléléssel ($P = 0,036$; 15/B-C. ábra).

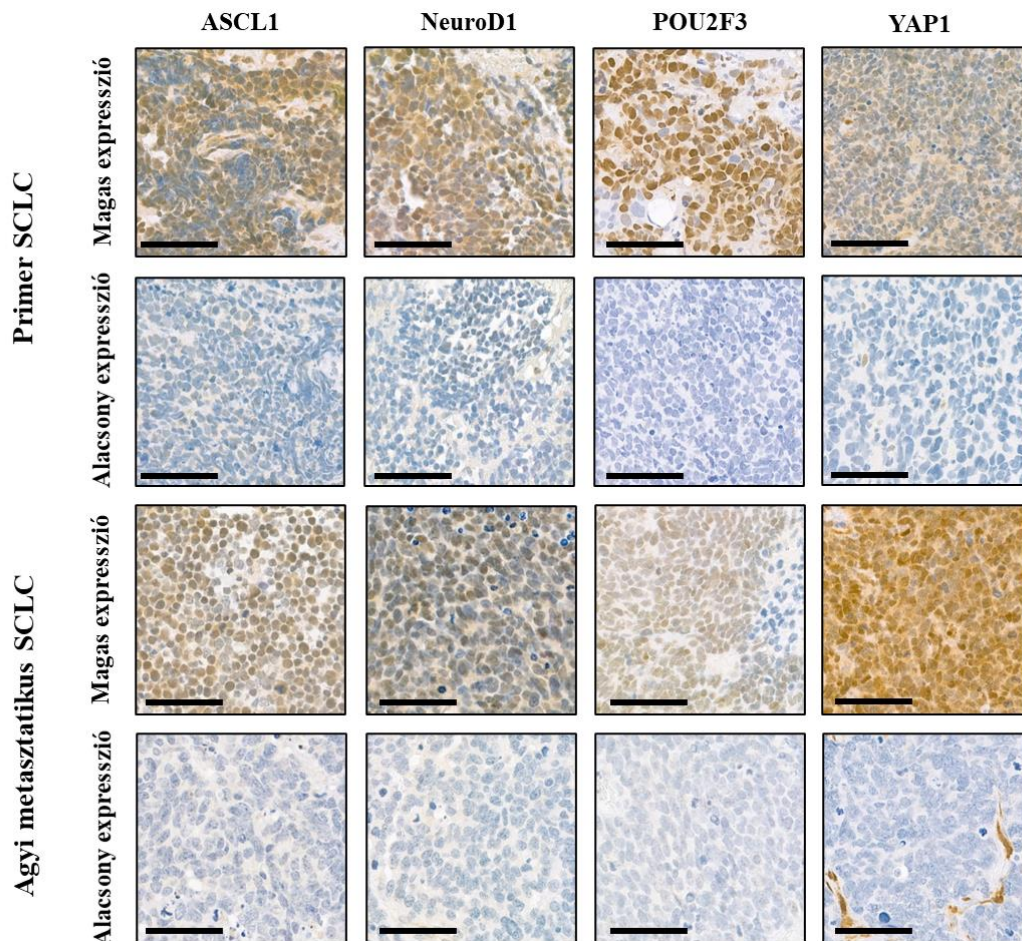


15. ábra Magas Rictor-expresszió és mTORC2-aktivitás összefüggése a teljes túléléssel az agyi metasztázissal rendelkező betegek esetében. (A.) Magas p-mTOR-, p-S6-, Rictor- és p-Akt-expresszió összefüggése a teljes túléléssel az agyi metasztatikus SCLC-kben.

(B.) Az mTORC2-aktivitás jelenléte a primer és agyi metasztatikus SCLC-tumorokban.
 (C.) mTORC2-aktivitás összefüggése a teljes túléléssel agyi metasztatikus SCLC-kben.
 * $P < 0,05$.

4.2.2. Molekuláris szubtypus markerek és az mTOR-aktivitás *in situ* expresszióinak összefüggései primer és agyi metasztatikus SCLC betegmintákban

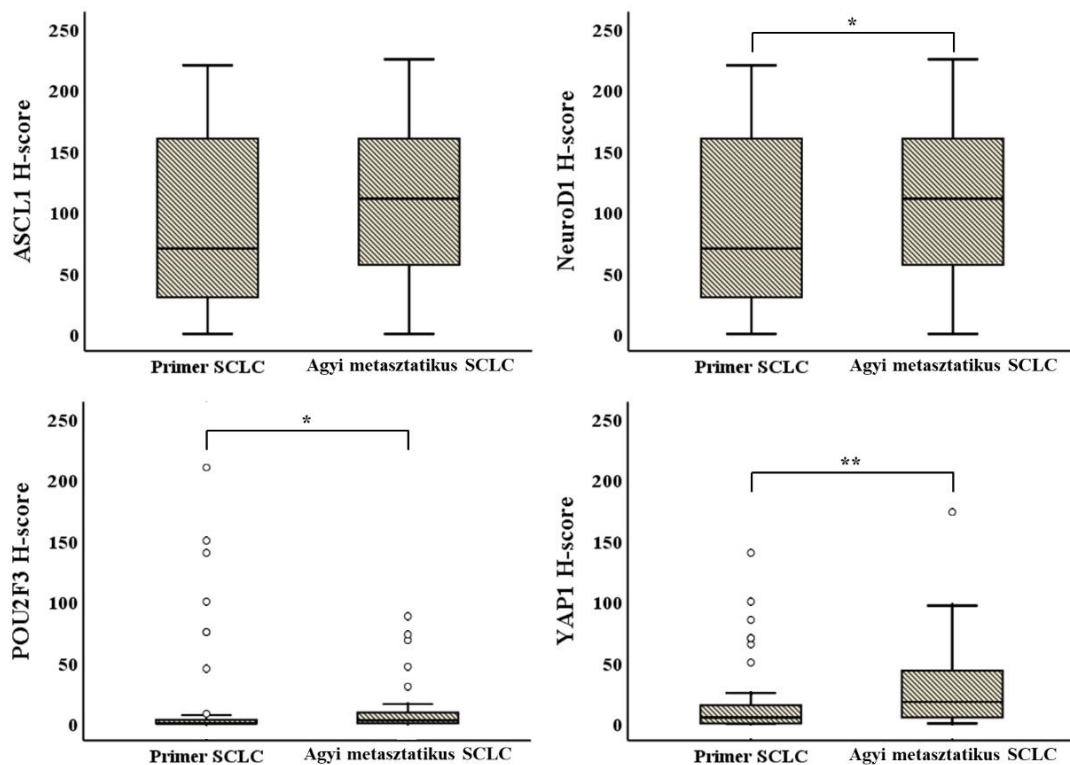
A primer és agyi metasztatikus SCLC-kben a molekuláris szubtypus markerek (ASCL1, NeuroD1, POU2F3, YAP1) *in situ* expresszióját IHC-vel vizsgáltuk (16. ábra).



16. ábra Reprezentatív képek a molekuláris szubtypus markerek (ASCL1, NeuroD1, POU2F3, YAP1) magas és alacsony expressziót mutató IHC-festéseiről primer és agyi metasztatikus SCLC esetekben. A méretskála 50 μm -t jelöl.

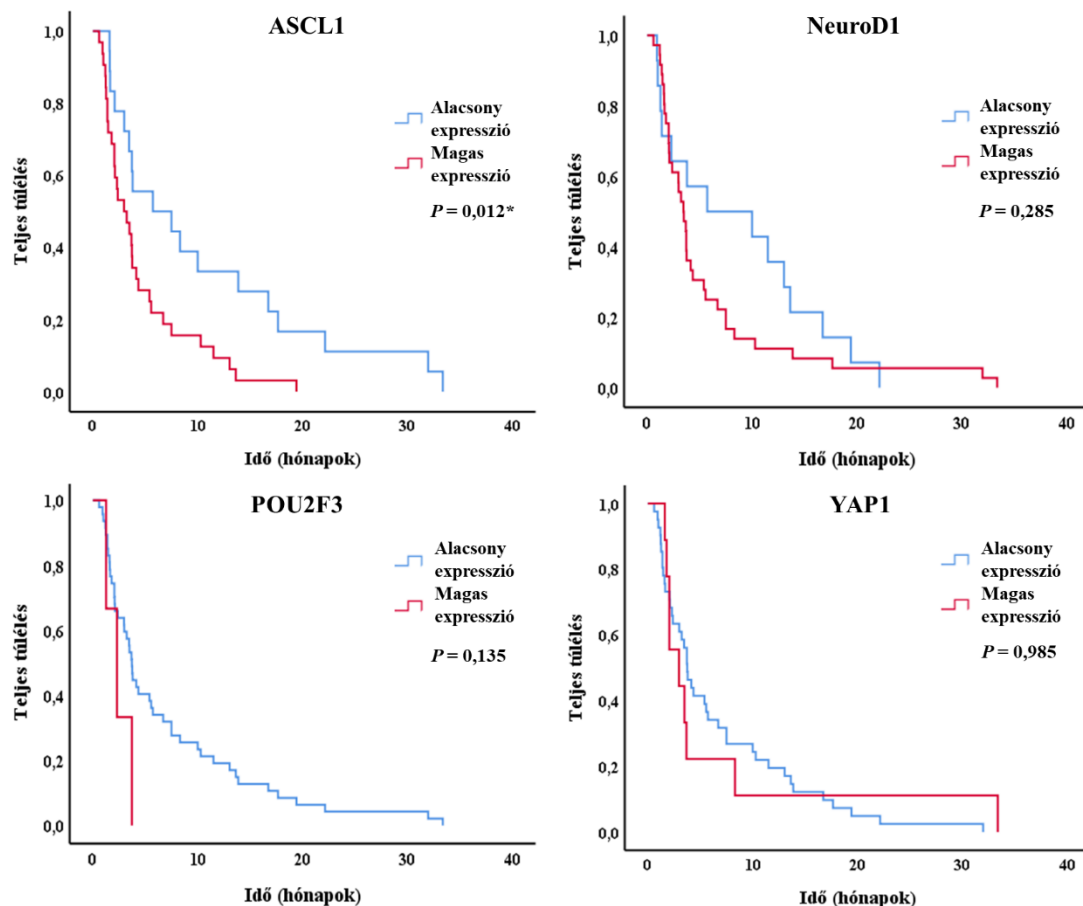
Az ASCL1-expresszió esetében nem találtunk szignifikáns különbséget a primer és a metasztatikus tumorok között. A NeuroD1- és a YAP1-expresszió azonban szignifikánsan magasabb volt az agyi metasztatikus tumorokban ($P < 0,05$ a NeuroD1 és $P < 0,01$ a YAP1 esetében), míg a POU2F3-expresszió szignifikánsan alacsonyabb volt az agyi metasztázisokban a primer tumorokhoz képest ($P < 0,05$; **17. ábra**).

A klinikopatológiai adatok és a szubtypus markerek expressziója közötti korrelációt elemezve nem találtunk összefüggést a rendelkezésre álló klinikai információk és a vizsgált fehérjeexpressziók között a primer SCLC-mintákban. Azonban, a női betegek agyi metasztázisaiban szignifikánsan magasabb NeuroD1-expressziót ($P = 0,016$), míg a primer tumorok esetében az idősebb (65 év feletti) életkorral összefüggésben szignifikánsan magasabb ASCL1-expressziót figyeltünk meg ($P = 0,021$).



17. ábra Molekuláris szubtypus markerek H-score értékeinek prognosztikailag releváns emelkedése az agyi metasztatikus esetekben a primer SCLC-khez képest. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

A túlélési adatok tekintetében a szubtypus markerek expressziója nem korrelált a primer esetek klinikai kimenetelével. Ezzel szemben a magas ASCL1-expresszió rövidebb teljes túléléssel járt együtt agyi áttéteknél ($P = 0,012$; **18. ábra**).



18. ábra Magas ASCL1-, NeuroD1- POU2F3- és YAP1-expresszió és a teljes túlélés összefüggése az agyi metasztatikus SCLC-kben. * $P < 0,05$.

Csak a domináns szubtypusokat figyelembe véve, az ASCL1-domináns, a NeuroD1-domináns és a négyszeresen negatív esetek voltak a leggyakoribbak mind a primer (58%, 54% és 20%), mind az agyi metasztatikus (76%, 72% és 18%) SCLC-kohorszban hasonló előfordulási gyakorisággal. A POU2F3-domináns és a YAP1-domináns alcsoportok kevésbé voltak gyakoriak a primer és agyi metasztatikus mintákban (12% és 12% a primer, illetve 6% és 18% az agyi metasztatikus esetekben).

A molekuláris szubtypus és az mTOR-markerek összefüggéseinek vizsgálatokor a POU2F3-expresszió szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a p-mTOR- ($R = 0,443$; P

= 0,001) és a Rictor-expresszióval ($R = 0,418$; $P = 0,003$) a primer tumorokban. A POU2F3-domináns esetek alacsonyabb száma ellenére, az agyi metasztatizisok esetében is hasonló eredményeket kaptunk; a POU2F3-expresszió szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a p-mTOR- ($R = 0,547$; $P < 0,001$), a p-S6- ($R = 0,490$; $P < 0,001$) és a p-Akt-expresszióval ($R = 0,292$; $P = 0,040$). Végezetül mind a primer, mind pedig az agyi metasztatikus POU2F3-domináns esetekben jellemző volt az mTOR-markerek magas expressziója.

4.3. Az mTOR-aktivitás, a *RICTOR*-amplifikáció, valamint az mTOR-gátlókkal szembeni érzékenység vizsgálata humán SCLC-sejtvonalakban

4.3.1. PI3K/Akt/mTOR-gátlók *in vitro* proliferációgátló hatásainak vizsgálata a *RICTOR*-amplifikáció és más az mTOR-jelátvitelt érintő genetikai eltérésekkel összefüggésben

A vizsgált nyolc humán SCLC-sejtvonal eredete, morfológiája, növekedési jellemzői és mutációs profilja mind különböző volt (**19/A. ábra, 14. táblázat**). Mindegyik sejtvonal hordozott legalább egy, az mTOR-útvonalhoz kapcsolódó mutációt. A sejtvonalak mutációs adatait az ATCC (www.atcc.org) és a Cancer Cell Line Encyclopedia (2019; www.sites.broadinstitute.org/ccle/datasets) adatbázisokból gyűjtöttük össze. A sejtvonalak molekuláris szubtípus besorolását Szeitz és munkatársainak cikke alapján végeztük [217]. Az adatbázisadatok alapján egyedül a H196 sejtvonalról ismert, hogy rendelkezik *RICTOR*-amplifikációval.

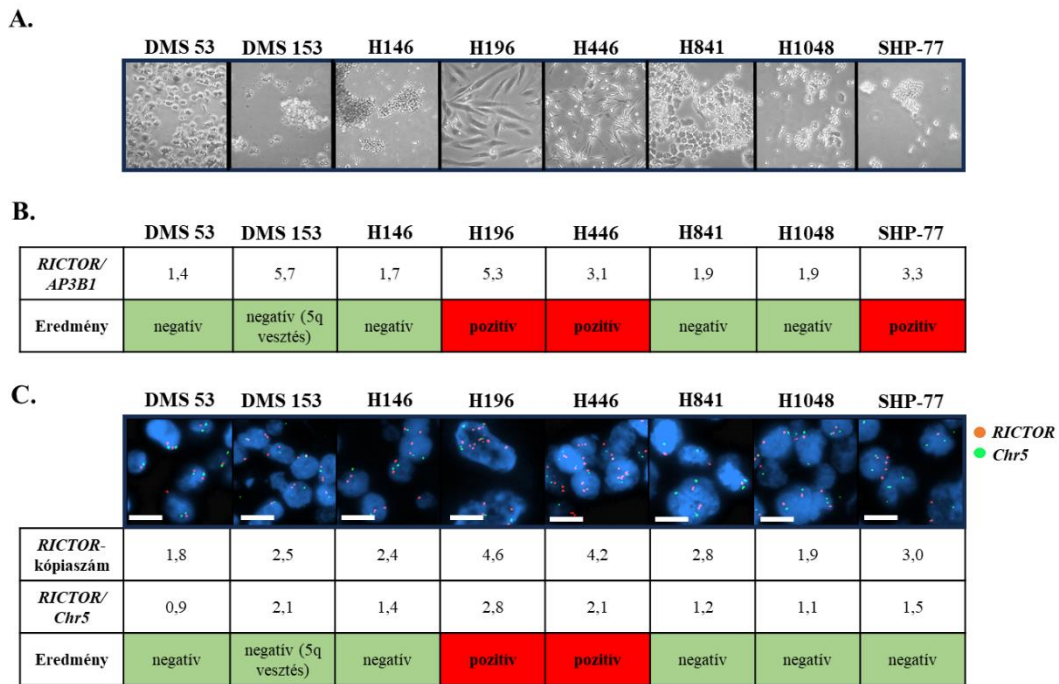
A vizsgált sejtvonalakban a *RICTOR*-amplifikációt ddPCR- és FISH-módszerekkel vizsgáltuk. *RICTOR*-amplifikációt mutattunk ki ddPCR-rel, a H196, a H446, valamint az SHP-77 sejtvonalakban. Továbbá FISH-sel validáltuk a már korábban leírt *RICTOR*-amplifikációt a H196 sejtvonalban, és elsőként igazoltunk validált *RICTOR*-amplifikációt a H446 sejtvonalban. A *RICTOR* misszensz mutációt (K582N) hordozó DMS 153 sejtvonalban az 5q kontrolljelek alacsony száma 5q vesztésre utalhat, melyet adatbázisadatok is alátámasztanak (**19/B-C. ábra**).

14. táblázat A vizsgált nyolc humán SCLC-sejtvonal klinikai adatai, molekuláris szubtypus besorolásai és főbb genetikai mutációi az ATCC és a Cancer Cell Line Encyclopedia (2019) adatbázisok alapján.

Sejtvonal	Nem	Eredet	Klinikai információ	Dohányzási kórtörténet	Növekedési jellemző	Molekuláris szubtípus	Mutációk							Egyéb	
							PIK3CA	PTEN	TSC2	RICTOR	MTOR	STK11	TP53		RB1
DMS 53	F	Tüdő (P)	Nem részesült terápiában.	N.E.	A	SCLC-A	-	-	P1458T (mis)	-	-	D194Y (mis)	S241F (mis), E56* (non)	-	FGFR1 amp, KR4S amp
DMS153	F	Tüdő (P)	Cytosinanal és metotrexate-tel kezelték.	N.E.	Kévert A+SZ	SCLC-A	M10I (mis) & amp	-	-	K582N (mis)	-	-	T155P (mis)	I573Nfs*2 (mis)	PIK3CG mis, I703K/R19W
H146	F	Csontvelő (M)	N.E.	N.E.	SZ	SCLC-A	amp	-	-	-	-	-	P318Lfs*21 (del)	Q850* (non)	AKT1 amp, PIK3C8 mis, M681 & amp, TERT amp
H196	F	Mellhártya (M)	Kemoterápiában és sugárkezelésben részesült.	Nem dohányzó	A	SCLC-Y	-	Y138C (mis)	-	amp	-	-	R175H (mis)	Q383* (non)	-
H446	F	Mellhártya (M)	N.E.	N.E.	A	SCLC-N	-	-	-	-	M2345V (mis)	-	G154V (mis)	X654 (spl)	FBXW7 mis, MTC amp, SDHA & FGF10 amp (5p), RPTOR amp
H841	F	Tüdő (P)	Kemoterápiában és sugárkezelésben részesült.	Dohányzó	A	SCLC-Y	-	-	-	R324K (mis)	-	-	C242S (mis)	-	-
H1048	N	Mellhártya (M)	N.E.	Nem dohányzó	A	SCLC-P	H1047R, K111R (mis)	-	-	-	-	-	P47Rfs*76 (del)	R552* (non)	AKT3 amp, RPTOR amp
SHP-77	F	Tüdő (P)	N.E.	N.E.	Kévert A+SZ	SCLC-A	-	-	-	-	-	-	C176W (mis)	-	KR4S mis G12V, RPTOR amp

Rövidítések: A, adherens; amp, amplifikáció; del, delekció; F, férfi; ins, inzerció; M, metasztázis; mis, misszensz; non, nonszensz; N, nő; N.E., nem elérhető; P, primer; spl, splice site; SZ, szuszpenziós.

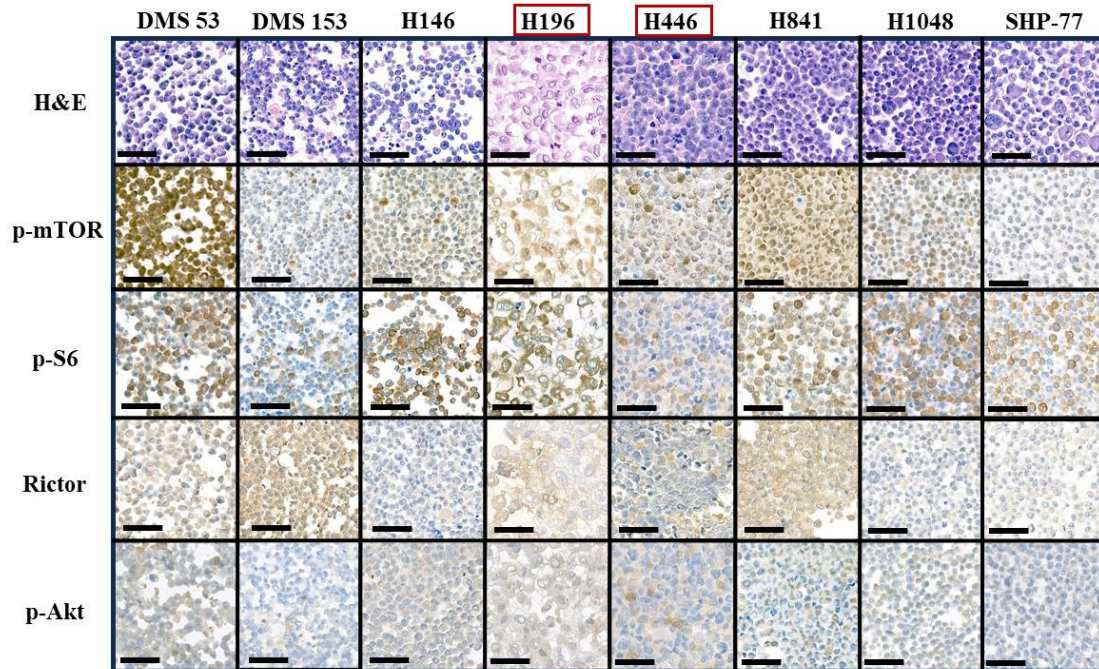
Rövidítések: A, adherens; amp, amplifikáció; del, delécio; F, férfi; ins, inzercio; M, metasztázis; mis, misszensz; non, nonszensz; N, nő; N.E., nem elérhető; P, primer; spl, splice site; SZ, szuszperziós.



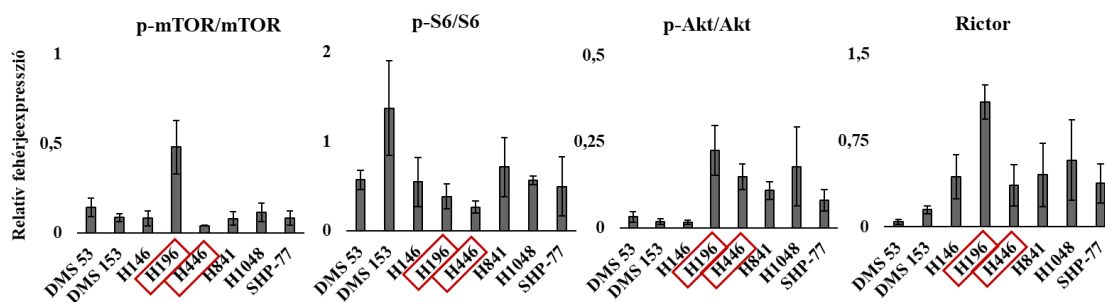
19. ábra A *RICTOR*-amplifikáció vizsgálata nyolc humán SCLC-sejtvonalon ddPCR-rel és FISH-sel. (A.) A nyolc humán SCLC-sejtvonal *in vitro* morfológiája, inverz mikroszkóppal (4x-es nagyítás; Olympus CK-2 – Olympus Corporation; Tokió, Japán) (B.) A *RICTOR*-amplifikáció vizsgálata ddPCR-rel. (C.) A *RICTOR*-amplifikáció vizsgálata a sejtblokkmintákon FISH-sel. A narancssárga és a zöld jelek a *RICTOR* gént és a kontroll-lókuszt régióját (*Chr5*) jelzik. A méretskála 5 μ m-t jelöl.

Az IHC és WesTM Simple vizsgálatainkban eltérő mTOR-aktivitást mutattunk ki a különböző sejtvonalakban (20-21. ábra). A legmagasabb mTOR-aktivitást a *RICTOR*-amplifikált H196 sejtvonalban (SCLC-Y) detektáltunk, amelyben a legmagasabb p-Akt/Akt arányt és Rictor-expressziót is találtuk. A másik, *RICTOR*-amplifikált H446 (SCLC-N) sejtvonalban szintén magas mTORC2-aktivitást (magasabb p-Akt/Akt arány) és mérsékelt magas Rictor-expressziót mutattunk ki. Magas mTOR-aktivitást, p-Akt/Akt arányt és Rictor-expressziót figyeltünk meg a H1048 (SCLC-P) sejtvonalban, amely az adatbázisadatok alapján *PIK3CA*-mutáns és *AKT3*-amplifikált. A DMS 53, DMS 153, H146 és SHP-77 sejtvonalak (mind SCLC-A) magas mTORC1-aktivitást mutattak, amely magas S6K-aktivitással (magas p-S6/S6 arány) és csökkent mTORC2-aktivitással (alacsony p-Akt/Akt arány és Rictor-expresszió) társult. Érdekes módon, a

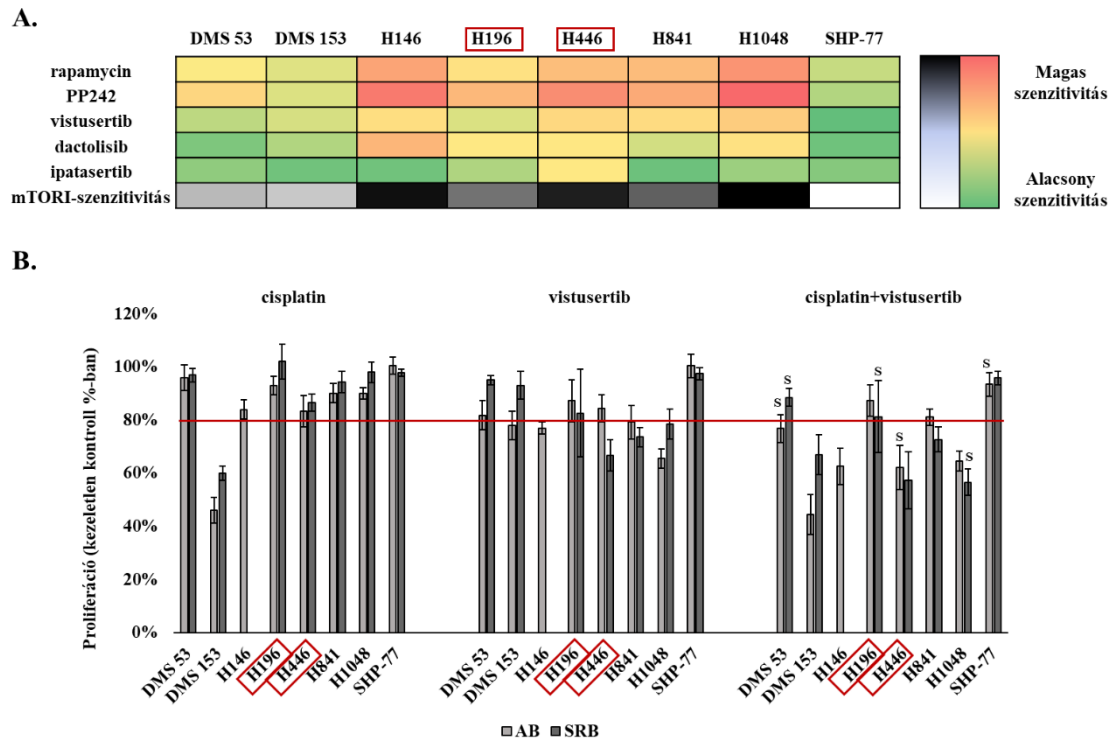
H841 sejtvonalban (SCLC-Y) kiegyensúlyozottabb mTORC1/mTORC2-aktivitás (magas p-S6/S6, p-Akt/Akt arány és Rictor-expresszió) volt megfigyelhető.



20. ábra Az mTORC1 (p-mTOR, p-S6) és mTORC2 (Rictor, p-Akt) fehérjék expressziójának vizsgálata sejtblokk-mintákon IHC-vel. A piros keret a FISH-validált *RICTOR*-amplifikált sejtvonalakat jelöli. A méretskála 50 μ m-t jelöl.



21. ábra Az mTOR-aktivitással kapcsolatos fehérjeexpresszió elemzése a WesTM Simple módszerrel. A denzitometrált p-mTOR/mTOR, p-S6/S6, p-Akt/Akt arányokat és a Rictor-expressziót ábrázoltuk az aktív mTOR-komplexe eloszlásának meghatározásához. A normalizáláshoz GAPDH-t használtunk kontroll fehérjeként. A piros keret a FISH-validált *RICTOR*-amplifikált sejtvonalakat jelöli.



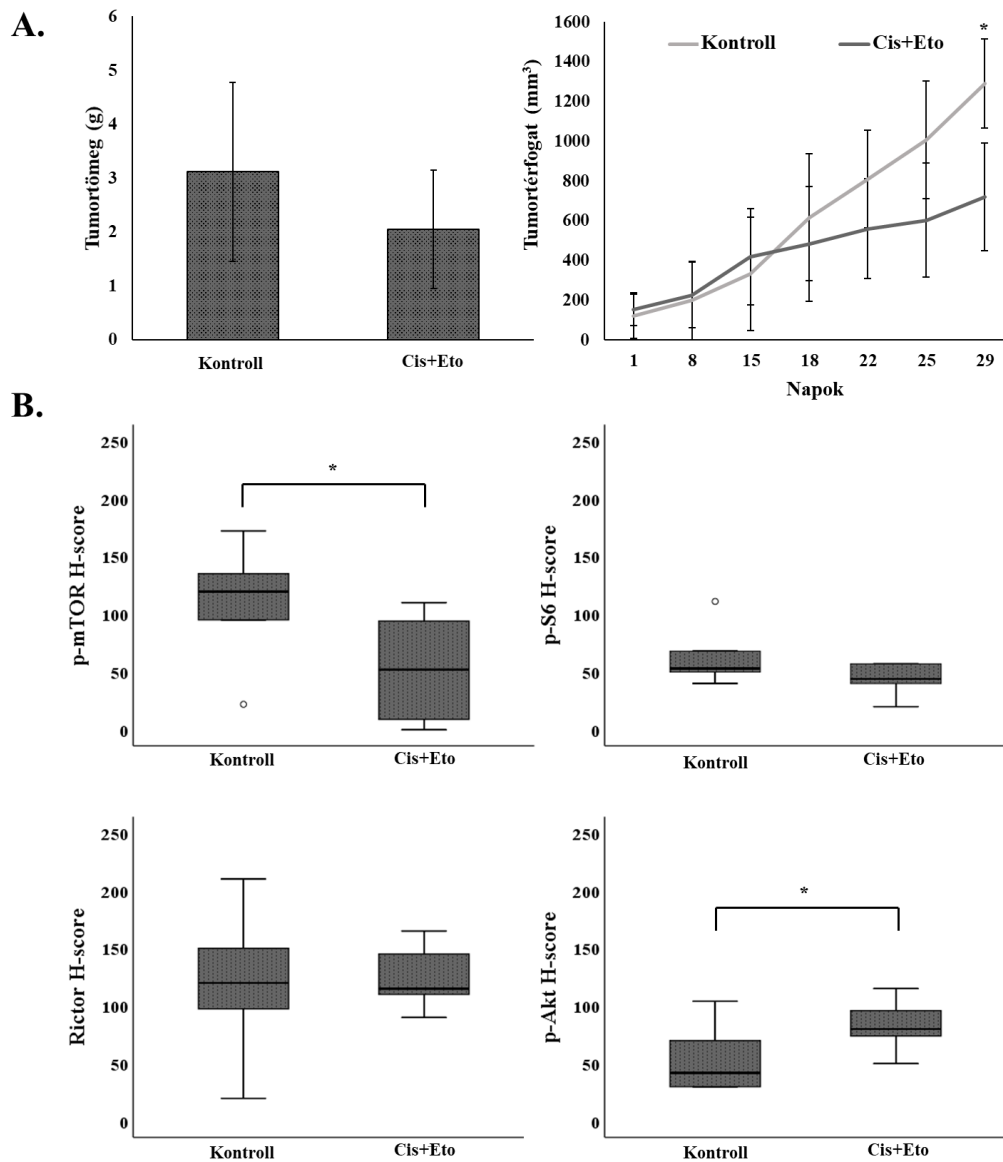
22. ábra PI3K/Akt/mTOR-gátlókkal szembeni érzékenység a vizsgált nyolc humán SCLC-sejtvonalban *in vitro*. **(A.)** A rapamycin (allosztérikus mTOR-gátló; 50 ng/ml), PP242 (kettős mTORC1- és mTORC2-gátló; 1 μ M), vistusertib (kettős mTORC1- és mTORC2-gátló; 0,1 μ M), dactolisib (duál PI3K-, mTOR-kináz-gátló; 1 μ M) és ipatasertib (Akt-gátló; 1 μ M) kezelések (72 óra) proliferációgátló hatásai. Az alamarBlue™ (AB) és a sulforhodamine B (SRB) proliferációs tesztek eredményeinek átlaga színskálával van ábrázolva: a zöldtől (~0-5%-os proliferációgátló hatás) a pirosig (~40-50%-os proliferációgátló hatás). Az mTOR-gátlókkal szembeni érzékenységet (mTORI-szenzitivitás) az 5 hatóanyag proliferációgátló hatásának összegzésével számoltuk ki: a fehértől (rezisztens sejtek) a feketéig (nagyon érzékeny sejtek). **(B.)** A cisplatin (kemoterápiás szer; 3 μ M) és vistusertib (kettős mTORC1- és mTORC2-gátló; 0,1 μ M) kezelések (72 óra) proliferációgátló hatásai mono- és kombinációs terápiában. A proliferáció legalább 20%-os csökkenését (piros vonal) biológiailag relevánsnak és statisztikailag szignifikánsnak tekintettük a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva ($P < 0,05$). A szinergista hatásokat „S” jelzéssel jelöltük (a kombinációs index alapján) a kombinációs kezelések esetében. A piros keret a *RICTOR*-amplifikált sejtvonalakat jelöli.

Összehasonlítottuk a vizsgált sejtvonalak cisplatin, rapamycin, PP242, vistusertib, dactolisib és ipatasertib elleni érzékenységét. A 72 órás kezelést követő AB és SRB proliferációs tesztek eredményei az **22/A. ábrán** láthatók. Az mTOR-gátlók összesített hatásainak értékelése során kapott intenzitáspontszámok alapján a nyolc sejtvonalból három nagy érzékenységet (H146, H446, H1048), két sejtvonal mérsékelt érzékenységet (H196, H841), két sejtvonal alacsony érzékenységet (DMS 53, DMS 153) mutatott, egy sejtvonal pedig nem volt érzékeny (SHP-77) a vizsgált mTOR-gátlókkal szemben. Az Akt-gátló ipatasertib bizonyult a legkevésbé hatékonynak, mivel szinte az egyik vizsgált sejtvonal esetében sem mutatott jelentős proliferációgátló hatást.

Egyetlen kivételtől (DMS 153) eltekintve mindegyik sejtvonal cisplatin rezisztensnek bizonyult. Azonban a vistusertib kezelés fokozta a cisplatin proliferációgátló hatását a legtöbb vizsgált sejtvonal esetében (DMS 53, H196, H446, H1048, SHP-77), szinergista hatást eredményezve legalább az egyik vagy mindkét proliferációs teszttel (**22/B. ábra**).

4.3.2. *In vivo* humán SCLC xenograft tumorok mTOR-aktivitásának, illetve RICTOR-kópiaszám változásának vizsgálata kemoterápiás kezelés és hosszútávú fenntartás során

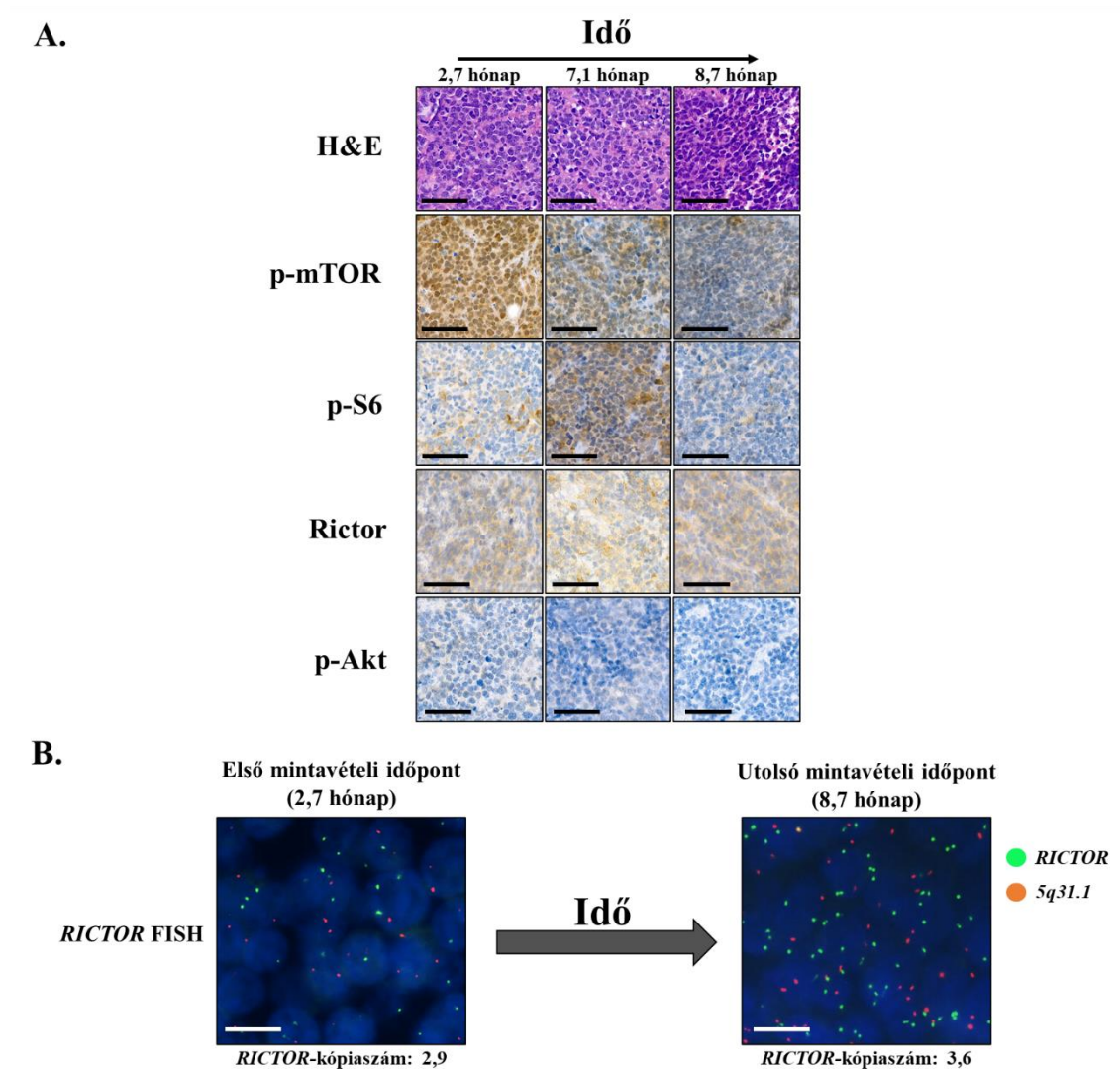
A H146 sejtvonalból indított xenograft kísérlet során az egereket két ciklus cisplatinnal és etoposide-dal kezeltük, majd az egereket 30 nappal az első kezelés után termináltuk. A kemoterápiás kezelés hatására a tumorok tömege ($P = 0,08$) és térfogata ($P = 0,05$) jelentősen csökkent (**23/A. ábra**). A p-mTOR-, p-S6-expresszió alacsonyabb volt a kezelt csoportban a kontrollhoz viszonyítva; ez a különbség statisztikailag szignifikáns volt a p-mTOR esetében ($P < 0,05$). A Rictor-expresszió nem változott a kezelt csoportban a kontroll csoportéhoz képest, valamint a p-Akt-expresszió szignifikánsan nőtt a kezelés hatására ($P < 0,05$; **23/B. ábra**), mely alátámasztja a kemoterápiás kezelés indukálta mTORC2-aktivitás megjelenését. Azonban az aktivitásváltozás hátterében álló jelentős RICTOR-kópiaszám emelkedés ilyen rövid idő alatt nem volt kimutatható a xenograftokban; a RICTOR-kópiaszám átlaga 2,5 (2,0-2,9) volt a kontroll csoportban és 3,0 (2,8-3,4) a kezelt csoportban.



23. ábra Az mTOR-markerek expressziójának változása két ciklus cisplatin és etoposide (Cis+Eto) kezelés után H146 xenograftokban. **(A.)** A tumorok tömegének és térfogatának változása két ciklus Cis+Eto kezelés után a kontrollcsoportéhoz viszonyítva. **(B.)** Az mTOR-markerek expressziójának változása a két ciklus Cis+Eto kezelés után a kontrollcsoportéhoz viszonyítva. * $P < 0,05$.

Az előbbiekkal párhuzamosan, hosszútávon *in vivo* fenntartott xenograft kísérletek során a kezeletlen tumorok Rictor-expressziója és *RICTOR*-kópiaszáma folyamatosan emelkedett (**24. ábra**). A *RICTOR*-kópiaszám (2,9-ről 3,6-ra) és a *RICTOR*/5q31.1 arány (1,6-ről 1,9-re) folyamatos emelkedését tapasztaltuk FISH-sel (2

$\leq$ *RICTOR/5q31.1* arányánál amplifikáltak tekintettük az eseteket), ami igazolja a Rictor/mTORC2-aktivitás jelentős szerepét az SCLC progressziójában.



24. ábra Az mTOR-markerek és a *RICTOR* kópiaszámának változásai a tumorevolúció modellezése során a H146 xenograftokban. **(A.)** Reprezentatív képek a hosszútávú xenograft kísérletek H&E és mTOR-markerek IHC festéseiről. A méretskála 50 μ m-t jelöl. **(B.)** A *RICTOR*-kópiaszám változásai a hosszútávú xenograft kísérletben. A FISH képeken a zöld és a narancssárga jelek a *RICTOR* gént és a kontroll lókuszt (5q31.1) jelölik. A méretskála 5 μ m-t jelöl.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Újonnan validált, *RICTOR*-amplifikációval rendelkező daganattípusok

Az elmúlt években a molekuláris diagnosztika jelentős szerepet kapott a személyre szabott terápiákban. Az NGS-alapú, széleskörű genetikai profilalkotás különösen fontos a patológiai és laboratóriumi gyakorlatban, azonban az eredmények validálása és értelmezése időigényes és költséges [218]. A jól ismert célozható genetikai eltérések mellett, a kapott eredmények felhívhatják a figyelmet további lehetséges terápiás célpontokra a gyakori és ritkább daganattípusokban egyaránt. Munkánk során az NGS által jelzett *RICTOR* CNV-emelkedést és ennek *RICTOR*-amplifikációt jelző szerepét vizsgáltuk különböző daganattípusokban. A feltételezett *RICTOR*-amplifikált eseteket a „gold standard” FISH-sel validáltuk, valamint más molekuláris és *in situ* módszerekkel is vizsgáltuk. A vizsgált esetek 8,8%-ában (37/420) jelezte az NGS-vizsgálat a feltételezett *RICTOR*-amplifikációt. A 37 esetből 16 esetben tudtuk validálni a *RICTOR*-amplifikációt FISH-sel. A ddPCR érzékenysége alacsonyabb volt, csak 11 *RICTOR*-amplifikált esetet erősített meg. Eredményeink alapján az NGS és a ddPCR módszerek specifitása és szenzitivitása nem teszi lehetővé a jelenleg „gold standard” validációs módszernek tekintett FISH-vizsgálat kiváltását, de segíthetnek azonosítani azokat a potenciálisan *RICTOR*-amplifikált eseteket, amelyeknél érdemes elvégezni a FISH-vizsgálatot.

A vizsgálateink során validált *RICTOR*-amplifikációval rendelkező 14 különböző diagnózis hangsúlyozza a *RICTOR*-amplifikáció széleskörű jelentőségét, beleértve néhány ritka malignitást is. A **11. táblázatban** összegyűjtött validált *RICTOR*-amplifikációs eredményeink számos összefüggést mutattak a rendelkezésre álló szakirodalmi adatokkal: a.) több olyan főbb daganattípusban tudtuk validálni a *RICTOR*-amplifikációt FISH-sel, ahol korábban fokozott Rictor-expressziót vagy emelkedett *RICTOR* CNV-t írtak le; b.) a FISH-validált diagnózisok közül egy-egy hasnyálmirigy-neuroendokrin tumor és endometrialis carcinosarcoma esetet is azonosítottunk mint korábban *RICTOR*-amplifikációt nem mutató daganattípusokat. Ezek az eredmények az általunk végzett vizsgálatban kerültek először leírásra, mivel sem a *RICTOR* gén, sem pedig a Rictor fehérjeexpressziós változásokat nem vizsgáltak korábban ezekben a

daganattípusokban; c.) a 4 feltételezett *RICTOR*-amplifikált tubo-ovariális „*high-grade*” serosus carcinoma eset közül, egyet sem tudtunk validálni; d.) a feltételezett *RICTOR*-amplifikációt az összes vizsgált tüdő adenocarcinoma esetben validálni tudtuk.

A vizsgált betegpopuláció szokatlan összetételének egyik oka, a beteganyagok centralizált feldolgozása. A vizsgált 420 esetet a ritka rosszindulatú daganatok, a központi idegrendszeri, valamint a lágyszövet- és csonttumороk, továbbá a gyermekkori esetek átlagon felüli gyakorisága jellemezte. A tüdődaganatos esetek alacsony száma pedig annak volt köszönhető, hogy a legtöbb tüdő adenocarcinoma esetet intézetünk egy másik, kevesebb génszámú, tüdődaganatokra specifikusabb, célozható genetikai eltéréseket tartalmazó panelen (Illumina TruSight Tumor 170) vizsgálja. Munkacsoportunk korábbi vizsgálataiban azonban már hozzájárultunk SCLC-s esetek *RICTOR*-amplifikációval kapcsolatos elemzéséhez, valamint a hazai tüdő adenocarcinomás esetek mTORC1/mTORC2-aktivitásának karakterizálásához is [31, 32].

A potenciális *RICTOR*-amplifikált esetek közül két gyermekkori központi idegrendszeri daganatos eset amplifikációját is igazoltuk. Ez különösen érdekes lehet a gyermekkori glioblastoma és astrocytoma esetében, tekintettel a központi idegrendszeri daganatokban leírt mTOR- és mTORC2-hiperaktivitásra [219, 220]. Ezekben a daganatokban korábban a PI3K/Akt/mTOR-gátlók alacsony hatékonyságát írták le [221], azonban ezekre a klinikai vizsgálatokra is jellemző volt a betegek markeralapú szelekciójának hiánya, mivel sem az mTORC2-hiperaktivitását, sem a *RICTOR*-amplifikációt nem vizsgálták a klinikai fázisvizsgálatokban a célzott terápia megkezdése előtt.

Az általunk újonnan jellemzett *RICTOR*-amplifikált daganattípusok közül a fokozott mTORC2-aktivitás lehetséges prognosztikai szerepét többek között glioblastomában, astrocytomában, invazív emlőcarcinomában, epehólyag adenocarcinomában és dedifferenciált endometrialis carcinomában írták le [58, 81, 222-227]. Továbbá a fej-nyaki és a tüdő laphámcarcinomákban a *PIK3CA*- és/vagy az *EGFR*-amplifikációt összefüggésbe hozták az emelkedett Rictor-expresszióval [29, 63], ami a PI3K/AKT/mTOR jelátviteli útvonal célzott kezelését indokolja ezekben a daganattípusokban. Kísérleti modellekben az mTOR-gátlók és a Rictort érintő célzott terápiák hatásosak voltak, különösen glioblastoma esetén [70, 228]. Klinikai vizsgálatokban a sapanisertib kezelés hatásosnak bizonyult vese- és endometrium-

daganatoknál [229]. Eredményeink alátámasztják a rapalógok és a kettős mTORC1- és mTORC2-gátlók alkalmazását az általunk validált dedifferenciált liposarcomákban, valamint a szájüregi és tüdő laphámcarcinomákban is [64, 230, 231].

Korábban nem írtak le a *RICTOR* gén és fehérjeexpresszióval kapcsolatos változásokat hasnyálmirigy neuroendokrin tumorokban vagy endometrialis carcinosarcomákban. Elsőként a mi eredményeink mutattak ki magas mTORC2-aktivitást és validált *RICTOR*-amplifikációt ezekben a daganattípusokban [106]. Eredményeink jelentőségét alátámasztják az mTOR-gátlókkal elért sikeres kezelési eredmények is [232-238].

A validált *RICTOR*-amplifikációval párhuzamosan a Rictor és a p-Akt fokozott expresszióját is megerősítettük; csak 3 olyan eset volt (3/16), ahol a FISH-validált *RICTOR*-amplifikáció nem járt együtt emelkedett Rictor- és/vagy p-Akt-expresszióval. Ezen eltérések lehetséges okai epigenetikai és komplex biológiai mechanizmusokkal (pl.: poszttranszlációs szabályozási mechanizmusok) [18, 239-247], valamint további technikai okokkal (pl.: biopsziás minták kezelése, antitestspecifikusság és érzékenységi különbségek) magyarázhatók. Eredményeink mindezek alapján arra utalnak, hogy az általunk alkalmazott immunfestések hasznosak lehetnek a *RICTOR* FISH-vizsgálat előszűrésében. Mindkét módszer hozzájárulhat az eredményesebb betegszelekcióhoz az mTOR-hiperaktivitás célzott kezelése előtt, továbbá a *RICTOR*-amplifikáció és/vagy az emelkedett Rictor-expresszió prediktív markerként szolgálhat a kettős mTORC1- és mTORC2-gátlókra reagáló daganatos betegek azonosításában [41, 79].

Vizsgálatainkban párosított SCLC-s betegmintákban is követtük a *RICTOR*-kópiaszám és az mTOR-aktivitás változásait a betegség progressziójával összefüggésben. A viszonylag kis mintaszám ellenére az esetek többségében a *RICTOR*-kópiaszám emelkedését mutattuk ki FISH-sel a két mintavételi időpont között. Hasonló kópiaszám-változásokat figyeltek meg hosszútávon nyomon követett gyermekkori daganatokban is, ahol a progresszióval összefüggésben vizsgálták a *RICTOR* gén kópiaszám-emelkedését [248].

Összefoglalva, nincs egységes konszenzus az NGS CNV-eredmények tényleges prediktív értékét illetően. Emiatt fontos kiemelni, hogy: a.) vizsgálatunkban alacsonyabb *RICTOR* CNV-t ($3 \leq \text{CNV} < 4$) mutató esetek között is sikeresen validáltuk a *RICTOR*-amplifikációt; b.) *RICTOR* FISH és a Rictor, p-Akt IHC-festések megbízható és

költséghatékony validációs módszerek a különböző daganatos megbetegedésekben az mTORC1/mTORC2-gátlók alkalmazása előtt; c.) eredményeink rávilágíthatnak a *RICTOR*-amplifikáció lehetséges előfordulására és a *RICTOR* kópiaszám-emelkedésére néhány ritka és/vagy nehezen kezelhető malignitásban.

5.2. Az mTOR-markerek expressziójának változásai és összefüggései a molekuláris szubtípus markerekkel primer és agyi metasztatikus SCLC betegmintákban

Vizsgálatainkban jellemeztük az mTOR-aktivást, valamint a molekuláris szubtípus markerek eloszlását nemcsak a primer, hanem az agyi metasztatikus SCLC-kben is. A klinikopatológiai jellemzőktől függetlenül mind a primer, mind az agyi metasztatikus betegmintákban magas p-mTOR-, p-S6-, Rictor- és p-Akt-expressziót figyeltünk meg, az irodalmi adatokkal összefüggésben [32, 185, 249-251]. Vizsgálatainkban a magas Rictor-expresszió összefüggött a szignifikánsan rosszabb teljes túléléssel az agyi metasztázisokkal rendelkező betegek esetében. Korábbi eredményeink és más publikációk is megerősítették a *RICTOR*-amplifikáció, a magas Rictor- és p-Akt-expresszió, valamint a kedvezőtlen klinikai kimenetel közötti összefüggéseket SCLC-ben [32, 79]. Az agyi metasztázisok 40%-ában magas mTORC2-aktivitást figyeltünk meg, ami utalhat az mTORC2 szerepére az agyi metasztázisok kialakulásában és az SCLC progressziójában. Ez összhangban áll azzal a megfigyeléssel, miszerint az mTOR-aktivitást szabályozó géneltérések gyakoribbak az agyi metasztatikus SCLC-kben, más metasztatikus helyekhez képest [252].

Bár az irodalmi adatok alapján nincs egységes konszenzus az SCLC-szubtípusok megoszlását illetően, saját vizsgálataink több esetben is hasonlóságot mutattak a korábban publikált eredményekkel [180, 253-255]. Leggyakrabban az ASCL1-, a NeuroD1-domináns és a négyszeresen negatív esetek fordultak elő hasonló gyakorisággal mind a primer, mind az agyi metasztatikus SCLC-kben. A négyszeresen negatív esetek száma viszonylag magas volt vizsgálatunkban; a primer esetek 20%-a, az agyi áttétek 18%-a volt ebbe a típusba sorolható, szemben a korábbi tanulmányokban közölt 6,3% és 17% közötti előfordulási gyakorisággal [180, 181, 255-257].

A közelmúlt eredményei alapján az SCLC progressziója során kialakuló fenotípusos-átmenet koncepciója kezd körvonalazódni. Eszerint a szubtypusok egy adott időpontban csak egy pillanatfelvételt mutatnak az SCLC dinamikus fejlődéséből, melyet az SCLC-A szubtypustól az SCLC-N, majd az SCLC-Y szubtypusig tartó folyamatos átmenet jellemez [187]. Ezt a megfigyelést eredményeink is alátámasztják, mivel a NeuroD1- és a YAP1-expresszió is jelentős emelkedést mutatott az agyi áttétekben. Továbbá a magas NeuroD1 és a magas YAP1-expressziót kapcsolatba hozták az EMT-vel, a betegség magasabb stádiumával, valamint a kemorezisztencia kialakulásával is [257-259].

Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy a magas POU2F3-expresszióval rendelkező daganatok az SCLC-k egy különálló alcsoportját képviselik. A magas POU2F3 expressziójú sejtek a tüdőhám kemoszenzoros sejtjeiként ismert „*tuft*” sejtekből erednek, így az NE-sejtektől különböznek [190, 260]. Korábbi vizsgálatokkal összhangban mi is hasonló előfordulási gyakoriságot találtunk (12%) a POU2F3-domináns szubtypusból a primer SCLC-esetek között [261]. Azonban az agyi metasztatikus mintáknak csak 6%-a mutatott magas POU2F3-expressziót. Kimutattuk továbbá, hogy a POU2F3-domináns SCLC-ket az mTOR-út vonal hiperaktivitása jellemzi, mind a primer, mind pedig az agyi metasztatikus esetekben. Különböző vizsgálatok az SCLC-P fenotípusú tumorok más és más genetikai, transzkriptomikai és epigenetikai profilt írták le [182, 190, 261, 262], ami potenciálisan eltérő terápiás sebezhetőséget feltételez erre az szubtypusra vonatkozóan [185, 260].

Összefoglalva, saját vizsgálatainkban: a.) az mTOR-út vonal hiperaktivitását figyeltük meg mind a primer, mind az agyi metasztatikus SCLC-kben; b.) a magas Rictor-expresszió jelentősen összefüggött a rosszabb teljes túléléssel az agyi metasztatikusokkal rendelkező betegekben, továbbá az agyi metasztatikusok 40%-ban mTORC2-aktivitást igazoltunk; c.) az ASCL1-, a NeuroD1-domináns és a négyszeresen negatív esetek voltak a leggyakoribbak mind a primer, mind az agyi metasztatikus SCLC-kben, hasonló előfordulási gyakorisággal; d.) a POU2F3-domináns SCLC-ket az mTOR-út vonal hiperaktivitása jellemzi, mind a primer, mind pedig az agyi metasztatikus esetekben, amely az mTOR-gátló terápiák lehetséges alkalmazására hívja fel a figyelmet.

5.3. Az mTOR-aktivitás és *RICTOR*-amplifikáció vizsgálata humán SCLC-sejtvonalakban *in vitro* és *in vivo*

Az *in vitro* vizsgálataink során *RICTOR*-amplifikációt, illetve egyéb mTOR-útvonalhoz kapcsolódó mutációkat hordozó humán SCLC-sejtvonalakban vizsgáltuk a cisplatin és egyéb PI3K/mTOR/Akt-gátlók anti-proliferatív hatásait. A vizsgált sejtvonalak között kettő (H196, H446) *RICTOR*-amplifikált volt, melyeket ddPCR- és a FISH-módszerekkel is igazoltunk. Bár korábban már beszámoltak a H446 sejtvonal fokozott Rictor expressziójáról, a mi vizsgáltunk volt az első, amely FISH-sel validálta a *RICTOR*-amplifikációt ebben a sejtvonalban [79]. Érdekes módon az alkalmazott mTOR-gátlók a legjelentősebb anti-proliferatív hatást a H446 (*RICTOR*-amplifikált) és a H1048 sejtvonalakban mutatták. A H1048 sejtvonal számos, a PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonalhoz kapcsolódó genetikai eltérést hordoz (kettős *PIK3CA*-mutáció és amplifikáció, valamint *AKT3*-amplifikáció), amelyek hozzájárulhatnak a fokozott mTOR-aktivitáshoz és az mTOR-gátlókkal szembeni érzékenységhöz. Eredményeinkhez hasonlóan, a kettős *PIK3CA*-mutáció növelte az alpelisib nevű PI3K-gátlóval szembeni érzékenységet emlődaganatokban [263]. A közelmúltban végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a *RICTOR*-amplifikáció jelenléte növelte a daganatos sejtek érzékenységét az ATP-kompetitív mTOR-gátlókkal szemben, továbbá a *RICTOR* gén csendesítése vagy kiütése semlegesítette a vistusertib hatását tüdő- és gyomordaganatokban [50, 79]. Az Egyesült Államok Nemzeti Rákkutató Intézete kismolekulájú gátlószerek, köztük kemoterápiás szerek (pl.: cisplatin), mTOR- és duál PI3K-, mTOR-kináz-gátlók (pl.: rapamycin, vistusertib) hatásainak vizsgálata során a mi eredményeinkhez hasonlóan kiemelte az SCLC-sejtvonalak érzékenységekülönbségeit [264]. Az *in vitro* vizsgálataink alapján a vistusertib fokozza a cisplatin proliferációgátló hatását és/vagy áttöri a cisplatin-rezisztenciát kombinált kezelésben a vizsgált SCLC-sejtvonalak többségében. Ez megerősíti azokat a korábbi eredményeket, miszerint az mTOR-gátlók használatával visszafordíthatók az egyes kezelésekkel szembeni rezisztenciamechanizmusok [147, 265]. A kombinációs kezelések jelentőségét igazolja, hogy tubo-ovariális „*high-grade*” serosus carcinomában és NSCLC-ben a paclitaxel és a vistusertib kombinációs terápia is ígéretes klinikai eredményeket mutatott [205].

Bár számos tanulmány kimutatta különböző daganatokban az mTOR-út vonal fokozott aktivitását és összefüggését a kemoterápiával szembeni csökkent érzékenységgel [266], az mTORC1-gátlók kombinációjának klinikai vizsgálatai a kezdeti sikerek ellenére nem hozták a várt eredményeket, többek között SCLC-kben sem [147, 267, 268]. Az mTOR-hiperaktiváció a különböző malignitásokban, így a tüdődaganatokban is, számos genetikai eltéréssel társulhat (pl.: *PIK3CA*-, *PTEN*-mutáció, *RICTOR*-amplifikáció) [79, 269, 270]. Az mTORC1-gátlók sikertelenségének hátterében számos mechanizmus állhat, melyek a dolgozat *Bevezetés* című fejezetében kifejtésre kerültek. Az mTOR-gátlók sikertelenségének egyik legfontosabb oka az eddigi adatok alapján az mTORC2-aktivitás változásaival lehet összefüggésben, ami a klinikai vizsgálatokban a megfelelő betegszelekció és a prediktív markerek alkalmazásának fontosságára irányítja a figyelmet.

Egy *in vivo* vizsgálatban az AZD8055 – egy ATP-kompetitív mTOR-inhibitor – tumornövekedést gátló hatásait igazolták kezeletlen *patient-derived* SCLC-s xenotranszplantátumokban, továbbá megfigyelték, hogy a kezelés fokozta a cisplatin és etoposide terápiával szembeni érzékenységet is [251]. Saját xenograft kísérleteinkben a kemoterápiás kezelés alkalmazása után a fennmaradó Rictor-expresszió mellett szignifikánsan megnövekedett p-Akt-expressziót mutattunk ki, ami a kemoterápiás kezelés során kialakuló mTORC2-aktivitást támasztja alá. Emellett hosszútávú xenograft kísérletben, a kezeletlen tumorokban a *RICTOR*-kópiaszám és a Rictor-expresszió folyamatos növekedése volt igazolható.

Összefoglalva, a.) a vistusertib fokozza a cisplatin proliferációgátló hatását és/vagy képes visszafordítani a cisplatin-rezisztenciát kombinációs terápiában a vizsgált SCLC-sejtvonalak többségében *in vitro*; b.) az *in vivo* kemoterápiás kezelés hatására a fokozott p-Akt-expresszió és a fennmaradó Rictor-expresszió is alátámasztja a kezelés által indukált mTORC2-aktivitást; c.) a hosszútávon fenntartott xenograft kísérletekben, a kezeletlen tumorokban a *RICTOR*-kópiaszám és Rictor-expresszió folyamatos emelkedését igazoltuk. Mindezek egyértelműen alátámasztják a Rictor/mTORC2-aktivitás jelentős szerepét az SCLC progressziójában.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

I. A *RICTOR*-amplifikáció vizsgálata során a különböző daganatokban igazoltuk és elsőként írtuk le, hogy:

- nincs egységes konszenzus az NGS CNV-eredmények tényleges prediktív értékét illetően, alacsonyabb *RICTOR* CNV-t ($3 \leq \text{CNV} < 4$) mutató esetek között is sikeresen validáltuk a *RICTOR*-amplifikációt;
- *RICTOR* FISH és a Rictor, p-Akt IHC-festések megbízható és költséghatékony validációs módszerek az mTORC1/mTORC2-gátlók alkalmazása előtt a különböző daganatos megbetegedésekben;
- eredményeink kiemelik a *RICTOR*-amplifikáció előfordulását és a *RICTOR* kópiaszám-emelkedését néhány ritka és/vagy nehezen kezelhető malignitásban.

II. Az mTOR-aktivitás és a molekuláris szubtípus markerek *in situ* vizsgálata során megállapíthatjuk, hogy:

- az mTOR-útvonal hiperaktivitása mind a primer, mind az agyi metasztatikus SCLC-kben jellemző;
- az agyi metasztázisok 40%-ban mTORC2-aktivitás igazolható;
- a magas Rictor-expresszió szignifikánsan összefüggött a rosszabb teljes túléléssel az agyi metasztázisokkal rendelkező betegekben;
- az ASCL1-, a NeuroD1-domináns és a négyszeresen negatív esetek voltak a leggyakoribbak, hasonló előfordulási gyakorisággal mind a primer, mind az agyi metasztatikus SCLC-kben;
- a POU2F3-domináns SCLC-ket az mTOR-útvonal hiperaktivitása jellemzi, mind a primer, mind pedig az agyi metasztatikus esetekben.

III. A humán SCLC-sejtvonalak *in vitro* és *in vivo* vizsgálataiban leírtuk, hogy:

- Rictor/mTORC2-aktivitásnak jelentős szerepe van az SCLC progressziójában;

- a vistsusertib *in vitro* fokozza a cisplatin proliferációgátló hatását és/vagy áttöri a cisplatin-rezisztenciát kombinációs terápia alkalmazása során a vizsgált SCLC-sejtvonalak többségében;
- a kemoterápiás kezelés hatására *in vivo* szignifikánsan nő a p-Akt-expresszió és jelentős marad a Rictor-expresszió, ami a kemoterápiás kezelés mellett kialakuló mTORC2-irányú aktivitás eltolódást jelez;
- a tumorevolúció modellezése közben, a hosszútávon fenntartott, kezeletlen xenograft kísérletekben is a *RICTOR*-kópiaszám és a Rictor-expresszió folyamatos emelkedése igazolható.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az elmúlt évtizedekben az mTOR jelátviteli útvonal szabályozási zavarainak daganatbiológiai szerepét számos tanulmány erősítette meg. Az útvonal egyik leggyakoribb genetikai eltérése a *RICTOR*-amplifikáció, melyet több daganattípusban is megfigyeltek. Ezzel összefüggésben számos PI3K/Akt/mTOR-gátló klinikai fejlesztése zajlik, így az mTOR-aktivitás jellemzése és további prediktív markerek azonosítása egyre fontosabbá válik. Munkámban a *RICTOR* kópiaszám-változását (CNV), az amplifikáció előfordulását és a párhuzamosan megjelenő mTOR-aktivitást vizsgáltam különböző rosszindulatú daganatokban köztük kissejtes tüdőcarcinomában (SCLC).

Rutin diagnosztikai újgenerációs szekvenálással (NGS) kiválasztott esetekben ($3 \leq \text{RICTOR CNV}$), valamint SCLC-s betegek párosított mintáiban, humán SCLC-sejtvonalakban és *in vivo* xenograft kísérletekben vizsgáltuk a *RICTOR*-kópiaszám változását és annak jelentőségét. Az amplifikációt a „gold standard” fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) igazoltuk, és több esetben Droplet Digital PCR-rel (ddPCR) is megerősítettük. Az mTOR-aktivitással összefüggő fehérjeexpressziós változásokat immunhisztokémiával és WesTM Simple módszerrel vizsgáltuk. A különböző mTOR-inhibitorok proliferációgátló hatásait többféle tesztel is igazoltuk *in vitro*.

Több ritka daganattípusban elsőként írtunk le FISH-validált *RICTOR*-amplifikációt, amely igazolja a *RICTOR*-amplifikáció jelentőségét a daganatok széles körében. Eredményeink alapján sem az NGS, sem pedig a ddPCR nem helyettesítheti a FISH-t a *RICTOR*-amplifikáció validálásában. Továbbá az emelkedett Rictor fehérjeexpresszió és az *in situ* mTORC2-hiperaktivitás felhívhatják a figyelmet a potenciális *RICTOR*-amplifikált esetekre. A *RICTOR*-kópiaszám emelkedését párosított SCLC-s betegmintákban és *in vivo* kísérletekben is sikerült igazolnunk. Ezzel összefüggésben a magas Rictor-expresszió, az mTORC2-hiperaktivitás és a rosszabb teljes túlélés szignifikáns összefüggését mutattuk ki az agyi metasztatikus SCLC-kben. Végezetül a *RICTOR* kópiaszám- és expresszióváltozások jelentőségét *in vitro* kísérleteinkkel erősítettük meg.

Eredményeink alapján a *RICTOR*-amplifikáció korai felismerése ígéretes terápiás célpontot kínálhat nemcsak az SCLC, hanem más ritka primer daganatok progressziójának és áttétképződésének megelőzésében.

8. SUMMARY

In recent decades, numerous studies have confirmed the dysregulation of the mTOR signalling pathway in cancer. One of the most common genetic alterations in the mTOR pathway is the *RICTOR* amplification, which has been observed in several tumour types. In this context, several PI3K/Akt/mTOR inhibitors are already in clinical development. Therefore, characterising mTOR activity and identifying additional potential predictive markers have become increasingly important. In my work, I have investigated the copy number variation (CNV) of the *RICTOR*, the prevalence of amplification and the associated mTOR activity in a wide range of malignancies, including small cell lung carcinoma (SCLC).

In selected cases from routine diagnostic next-generation sequencing (NGS) studies ($3 \leq \text{RICTOR CNV}$), paired SCLC patient samples, human SCLC cell lines, and *in vivo* xenograft experiments, we investigated the variation in *RICTOR* copy number and its significance. The amplification was validated by the "gold standard" fluorescence *in situ* hybridisation (FISH), and – in several cases – confirmed by Droplet Digital PCR (ddPCR). The protein expression changes associated with mTOR activity were assessed by immunohistochemistry and WesTM Simple. Several assays were used to test the anti-proliferative effects of various mTOR inhibitors *in vitro*.

We were the first to describe FISH-validated *RICTOR* amplification in several rare tumours, demonstrating the importance of *RICTOR* amplification in a wide range of tumour types. Our results suggest that neither NGS nor ddPCR can replace FISH in validating *RICTOR* amplification. Furthermore, increased Rictor protein expression and *in situ* mTORC2 hyperactivity may highlight potential *RICTOR*-amplified cases. We have also demonstrated an increase in *RICTOR* copy number in paired SCLC patient samples and *in vivo* experiments. In this context, we found a significant association between high Rictor expression, mTORC2 hyperactivity and worse overall survival in brain metastatic SCLCs. Finally, *in vitro* experiments confirmed the significance of *RICTOR* copy number and expression changes.

Based on our results, early detection of *RICTOR* amplification may provide a promising therapeutic target, not only for SCLC, but also for preventing progression and metastasis in other rare primary tumours.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
3. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31-46.
4. Mossmann D, Park S, Hall MN. mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(12):744-757.
5. Hobby G, Clark R, Woywodt A. A treasure from a barren island: the discovery of rapamycin. *Clin Kidney J*. 2022;15(10):1971-1972.
6. Sehgal SN, Baker H, Vézina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)*. 1975;28(10):727-732.
7. Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc*. 2003;35(3 Suppl):7S-14S.
8. Garber K. Rapamycin's resurrection: a new way to target the cancer cell cycle. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(20):1517-1519.
9. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*. 1991;253(5022):905-909.
10. Kunz J, Henriquez R, Schneider U, Deuter-Reinhard M, Movva NR, Hall MN. Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell*. 1993;73(3):585-596.
11. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, Schreiber SL. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*. 1994;369(6483):756-758.
12. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*. 1994;78(1):35-43.
13. Eng CP, Sehgal SN, Vézina C. Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *J Antibiot (Tokyo)*. 1984;37(10):1231-1237.

14. Sehgal SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem.* 1998;31(5):335-340.
15. Sebestyén A, Dankó T, Sztankovics D, Moldvai D, Raffay R, Cervi C, Krencz I, Zsiros V, Jeney A, Petővári G. The role of metabolic ecosystem in cancer progression - metabolic plasticity and mTOR hyperactivity in tumor tissues. *Cancer Metastasis Rev.* 2021;40(4):989-1033.
16. Sztankovics D, Moldvai D, Petővári G, Dankó T, Szalai F, Miyaúra R, Varga V, Nagy N, Papp G, Pápay J, Krencz I, Sebestyén A. mTOR hyperactivity and RICTOR amplification as targets for personalized treatments in malignancies. *Pathol Oncol Res.* 2024;30(1):611-643.
17. Liu GY, Sabatini DM. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(4):183-203. Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(4):246.
18. Fu W, Hall MN. Regulation of mTORC2 Signaling. *Genes (Basel).* 2020;11(9):1045.
19. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 2006;124(3):471-484.
20. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell.* 2017;168(6):960-976. Erratum in: *Cell.* 2017;169(2):361-371.
21. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012;149(2):274-293.
22. Bracho-Valdés I, Moreno-Alvarez P, Valencia-Martínez I, Robles-Molina E, Chávez-Vargas L, Vázquez-Prado J. mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused. *IUBMB Life.* 2011;63(10):896-914.
23. Yamaguchi H, Kawazu M, Yasuda T, Soda M, Ueno T, Kojima S, Yashiro M, Yoshino I, Ishikawa Y, Sai E, Mano H. Transforming somatic mutations of mammalian target of rapamycin kinase in human cancer. *Cancer Sci.* 2015;106(12):1687-1692.
24. Grabiner BC, Nardi V, Birsoy K, Possemato R, Shen K, Sinha S, Jordan A, Beck AH, Sabatini DM. A diverse array of cancer-associated MTOR mutations are

- hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity. *Cancer Discov.* 2014;4(5):554-563.
25. Wagle N, Grabiner BC, Van Allen EM, Amin-Mansour A, Taylor-Weiner A, Rosenberg M, Gray N, Barletta JA, Guo Y, Swanson SJ, Ruan DT, Hanna GJ, Haddad RI, Getz G, Kwiatkowski DJ, Carter SL, Sabatini DM, Jänne PA, Garraway LA, Lorch JH. Response and acquired resistance to everolimus in anaplastic thyroid cancer. *N Engl J Med.* 2014;371(15):1426-1433.
 26. Menon S, Manning BD. Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene.* 2008;27 Suppl 2(0 2):S43-S51.
 27. Szalai F, Sztankovics D, Krencz I, Moldvai D, Pápay J, Sebestyén A, Khor A. Rictor-A Mediator of Progression and Metastasis in Lung Cancer. *Cancers (Basel).* 2024;16(3):543.
 28. Krencz I, Sebestyén A, Khor A. mTOR in Lung Neoplasms. *Pathol Oncol Res.* 2020;26(1):35-48.
 29. Iksen, Pothongsrisit S, Pongrakhananon V. Targeting the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Lung Cancer: An Update Regarding Potential Drugs and Natural Products. *Molecules.* 2021;26(13):4100.
 30. Ali ES, Mitra K, Akter S, Ramproshad S, Mondal B, Khan IN, Islam MT, Sharifi-Rad J, Calina D, Cho WC. Recent advances and limitations of mTOR inhibitors in the treatment of cancer. *Cancer Cell Int.* 2022 ;22(1):284.
 31. Krencz I, Sebestyén A, Fábíán K, Márk Á, Moldvay J, Khor A, Kopper L, Pápay J. Expression of mTORC1/2-related proteins in primary and brain metastatic lung adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2017;62:66-73.
 32. Krencz I, Sebestyén A, Papay J, Lou Y, Lutz GF, Majewicz TL, Khor A. Correlation between immunohistochemistry and RICTOR fluorescence in situ hybridization amplification in small cell lung carcinoma. *Hum Pathol.* 2019;93:74-80.
 33. Baker AF, Dragovich T, Ihle NT, Williams R, Fenoglio-Preiser C, Powis G. Stability of phosphoprotein as a biological marker of tumor signaling. *Clin Cancer Res.* 2005;11(12):4338-4340.
 34. Petővári G, Dankó T, Tőkés AM, Vetlényi E, Krencz I, Raffay R, Hajdu M, Sztankovics D, Németh K, Vellai-Takács K, Jeney A, Kulka J, Sebestyén A. In Situ

- Metabolic Characterisation of Breast Cancer and Its Potential Impact on Therapy. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9):2492.
35. Felkai L, Krencz I, Kiss DJ, Nagy N, Petővári G, Dankó T, Micsík T, Khoor A, Tornóczy T, Sági Z, Sebestyén A, Csóka M. Characterization of mTOR Activity and Metabolic Profile in Pediatric Rhabdomyosarcoma. *Cancers (Basel)*. 2020;12(7):1947.
 36. Moldvai D, Sztankovics D, Dankó T, Vetlényi E, Petővári G, Márk Á, Patonai A, Végső G, Piros L, Hosszú Á, Pápay J, Krencz I, Sebestyén A. Tumorigenic role of tacrolimus through mTORC1/C2 activation in post-transplant renal cell carcinomas. *Br J Cancer*. 2024;130(7):1119-1130.
 37. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*. 2004;14(14):1296-1302.
 38. Gkoutakos A, Pilotto S, Mafficini A, Vicentini C, Simbolo M, Milella M, Tortora G, Scarpa A, Bria E, Corbo V. Unmasking the impact of Rictor in cancer: novel insights of mTORC2 complex. *Carcinogenesis*. 2018;39(8):971-980.
 39. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*. 2006;441(7092):424-430.
 40. Bang H, Ahn S, Ji Kim E, Kim ST, Park HY, Lee J, Kim KM. Correlation between RICTOR overexpression and amplification in advanced solid tumors. *Pathol Res Pract*. 2020;216(1):152734.
 41. Cheng H, Zou Y, Ross JS, Wang K, Liu X, Halmos B, Ali SM, Liu H, Verma A, Montagna C, Chachoua A, Goel S, Schwartz EL, Zhu C, Shan J, Yu Y, Gritsman K, Yelensky R, Lipson D, Otto G, Hawryluk M, Stephens PJ, Miller VA, Piperdi B, Perez-Soler R. RICTOR Amplification Defines a Novel Subset of Patients with Lung Cancer Who May Benefit from Treatment with mTORC1/2 Inhibitors. *Cancer Discov*. 2015;5(12):1262-1270.
 42. Jiang WJ, Feng RX, Liu JT, Fan LL, Wang H, Sun GP. RICTOR expression in esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Med Oncol*. 2017;34(3):32.

43. Wazir U, Newbold RF, Jiang WG, Sharma AK, Mokbel K. Prognostic and therapeutic implications of mTORC1 and Rictor expression in human breast cancer. *Oncol Rep.* 2013;29(5):1969-1974.
44. Driscoll DR, Karim SA, Sano M, Gay DM, Jacob W, Yu J, Mizukami Y, Gopinathan A, Jodrell DI, Evans TR, Bardeesy N, Hall MN, Quattrochi BJ, Klimstra DS, Barry ST, Sansom OJ, Lewis BC, Morton JP. mTORC2 Signaling Drives the Development and Progression of Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* 2016;76(23):6911-6923.
45. Joechle K, Guenzle J, Hellerbrand C, Strnad P, Cramer T, Neumann UP, Lang SA. Role of mammalian target of rapamycin complex 2 in primary and secondary liver cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2021;13(11):1632-1647.
46. Jebali A, Battistella M, Lebbé C, Dumaz N. RICTOR Affects Melanoma Tumorigenesis and Its Resistance to Targeted Therapy. *Biomedicines.* 2021;9(10):1498.
47. Jebali A, Dumaz N. The role of RICTOR downstream of receptor tyrosine kinase in cancers. *Mol Cancer.* 2018;17(1):39.
48. Sun Y, Li R, Nong B, Songyang Z, Wang X, Ma W, Zhou Q. A Comprehensive Pan-Cancer Analysis of the Potential Biological Functions and Prognosis Values of RICTOR. *Genes (Basel).* 2023;14(6):1280.
49. Schmidt KM, Dietrich P, Hackl C, Guenzle J, Bronsert P, Wagner C, Fichtner-Feigl S, Schlitt HJ, Geissler EK, Hellerbrand C, Lang SA. Inhibition of mTORC2/RICTOR Impairs Melanoma Hepatic Metastasis. *Neoplasia.* 2018;20(12):1198-1208.
50. Kim ST, Kim SY, Klempner SJ, Yoon J, Kim N, Ahn S, Bang H, Kim KM, Park W, Park SH, Park JO, Park YS, Lim HY, Lee SH, Park K, Kang WK, Lee J. Rapamycin-insensitive companion of mTOR (RICTOR) amplification defines a subset of advanced gastric cancer and is sensitive to AZD2014-mediated mTORC1/2 inhibition. *Ann Oncol.* 2017;28(3):547-554.
51. Cao RZ, Min L, Liu S, Tian RY, Jiang HY, Liu J, Shao LL, Cheng R, Zhu ST, Guo SL, Li P. Rictor Activates Cav 1 Through the Akt Signaling Pathway to Inhibit the Apoptosis of Gastric Cancer Cells. *Front Oncol.* 2021;11:641453.

52. Kaibori M, Shikata N, Sakaguchi T, Ishizaki M, Matsui K, Iida H, Tanaka Y, Miki H, Nakatake R, Okumura T, Tokuhara K, Inoue K, Wada J, Oda M, Nishizawa M, Kon M. Influence of Rictor and Raptor Expression of mTOR Signaling on Long-Term Outcomes of Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis Sci*. 2015;60(4):919-928.
53. Villanueva A, Chiang DY, Newell P, Peix J, Thung S, Alsinet C, Tovar V, Roayaie S, Minguez B, Sole M, Battiston C, Van Laarhoven S, Fiel MI, Di Feo A, Hoshida Y, Yea S, Toffanin S, Ramos A, Martignetti JA, Mazzaferro V, Bruix J, Waxman S, Schwartz M, Meyerson M, Friedman SL, Llovet JM. Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2008;135(6):1972-1983, 1983.e1-11.
54. Gulhati P, Bowen KA, Liu J, Stevens PD, Rychahou PG, Chen M, Lee EY, Weiss HL, O'Connor KL, Gao T, Evers BM. mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer Res*. 2011;71(9):3246-3256.
55. Wen FF, Li XY, Li YY, He S, Xu XY, Liu YH, Liu L, Wu SH. Expression of Raptor and Rictor and their relationships with angiogenesis in colorectal cancer. *Neoplasma*. 2020;67(3):501-508.
56. Sticz T, Molnár A, Márk Á, Hajdu M, Nagy N, Végső G, Micsik T, Kopper L, Sebestyén A. mTOR activity and its prognostic significance in human colorectal carcinoma depending on C1 and C2 complex-related protein expression. *J Clin Pathol*. 2017;70(5):410-416.
57. Wang L, Qi J, Yu J, Chen H, Zou Z, Lin X, Guo L. Overexpression of Rictor protein in colorectal cancer is correlated with tumor progression and prognosis. *Oncol Lett*. 2017;14(5):6198-6202.
58. Morrison Joly M, Hicks DJ, Jones B, Sanchez V, Estrada MV, Young C, Williams M, Rexer BN, Sarbassov dos D, Muller WJ, Brantley-Sieders D, Cook RS. Rictor/mTORC2 Drives Progression and Therapeutic Resistance of HER2-Amplified Breast Cancers. *Cancer Res*. 2016;76(16):4752-4764.
59. Morrison Joly M, Williams MM, Hicks DJ, Jones B, Sanchez V, Young CD, Sarbassov DD, Muller WJ, Brantley-Sieders D, Cook RS. Two distinct mTORC2-

- dependent pathways converge on Rac1 to drive breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res.* 2017;19(1):74.
60. Werfel TA, Wang S, Jackson MA, Kavanaugh TE, Joly MM, Lee LH, Hicks DJ, Sanchez V, Ericsson PG, Kilchrist KV, Dimobi SC, Sarett SM, Brantley-Sieders DM, Cook RS, Duvall CL. Selective mTORC2 Inhibitor Therapeutically Blocks Breast Cancer Cell Growth and Survival. *Cancer Res.* 2018;78(7):1845-1858.
 61. Zhang F, Zhang X, Li M, Chen P, Zhang B, Guo H, Cao W, Wei X, Cao X, Hao X, Zhang N. mTOR complex component Rictor interacts with PKCzeta and regulates cancer cell metastasis. *Cancer Res.* 2010;70(22):9360-9370.
 62. Naruse T, Yanamoto S, Okuyama K, Yamashita K, Omori K, Nakao Y, Yamada SI, Umeda M. Therapeutic implication of mTORC2 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2017;65:23-32.
 63. Ruicci KM, Plantinga P, Pinto N, Khan MI, Stecho W, Dhaliwal SS, Yoo J, Fung K, MacNeil D, Mymryk JS, Barrett JW, Howlett CJ, Nichols AC. Disruption of the RICTOR/mTORC2 complex enhances the response of head and neck squamous cell carcinoma cells to PI3K inhibition. *Mol Oncol.* 2019;13(10):2160-2177.
 64. Kawasaki G, Naruse T, Furukawa K, Umeda M. mTORC1 and mTORC2 Expression Levels in Oral Squamous Cell Carcinoma: An Immunohistochemical and Clinicopathological Study. *Anticancer Res.* 2018;38(3):1623-1628.
 65. Kondo S, Hirakawa H, Ikegami T, Uehara T, Agena S, Uezato J, Kinjyo H, Kise N, Yamashita Y, Tanaka K, Hasegawa N, Kiyuna A, Maeda H, Suzuki M, Gahana A. Raptor and rictor expression in patients with human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2021;21(1):87.
 66. Sahu D, Huan J, Wang H, Sahoo D, Casteel DE, Klemke RL, Boss GR, Hansel DE. Bladder Cancer Invasion Is Mediated by Mammalian Target of Rapamycin Complex 2-Driven Regulation of Nitric Oxide and Invadopodia Formation. *Am J Pathol.* 2021;191(12):2203-2218.
 67. Juengel E, Kim D, Makarević J, Reiter M, Tsaur I, Bartsch G, Haferkamp A, Blaheta RA. Molecular analysis of sunitinib resistant renal cell carcinoma cells after sequential treatment with RAD001 (everolimus) or sorafenib. *J Cell Mol Med.* 2015;19(2):430-441.

68. Krencz I, Vetlényi E, Dankó T, Petővári G, Moldvai D, Sztankovics D, Raffay R, Mészáros K, Sebestyén E, Végső G, Pápay J, Sebestyén A. Metabolic Adaptation as Potential Target in Papillary Renal Cell Carcinomas Based on Their In Situ Metabolic Characteristics. *Int J Mol Sci.* 2022;23(18):10587.
69. 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;18:211.
70. 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.* 2020;26(1):23-33.
71. Liu Y, Lu Y, Li A, Celiku O, Han S, Qian M, Yang C. mTORC2/Rac1 Pathway Predisposes Cancer Aggressiveness in IDH1-Mutated Glioma. *Cancers (Basel).* 2020;12(4):787.
72. Alvarenga AW, Machado LE, Rodrigues BR, Lupinacci FC, Sanemastu P, Matta E, Roffé M, Torres LF, da Cunha IW, Martins VR, Hajj GN. Evaluation of Akt and RICTOR Expression Levels in Astrocytomas of All Grades. *J Histochem Cytochem.* 2017;65(2):93-103.
73. Akgül S, Li Y, Zheng S, Kool M, Treisman DM, Li C, Wang Y, Gröbner S, Ikenoue T, Shen Y, Camelo-Piragua S, Tomasek G, Stark S, Guduguntla V, Gusella JF, Guan KL, Pfister SM, Verhaak RGW, Zhu Y. Opposing Tumor-Promoting and -Suppressive Functions of Rictor/mTORC2 Signaling in Adult Glioma and Pediatric SHH Medulloblastoma. *Cell Rep.* 2018;24(2):463-478.e5.
74. Gibault L, Ferreira C, Pérot G, Audebourg A, Chibon F, Bonnin S, Lagarde P, Vacher-Lavenu MC, Terrier P, Coindre JM, Aurias A. From PTEN loss of expression to RICTOR role in smooth muscle differentiation: complex involvement of the mTOR pathway in leiomyosarcomas and pleomorphic sarcomas. *Mod Pathol.* 2012;25(2):197-211.
75. Okada T, Lee AY, Qin LX, Agaram N, Mimae T, Shen Y, O'Connor R, López-Lago MA, Craig A, Miller ML, Agius P, Molinelli E, Socci ND, Crago AM, Shima F, Sander C, Singer S. Integrin- α 10 Dependency Identifies RAC and RICTOR as

- Therapeutic Targets in High-Grade Myxofibrosarcoma. *Cancer Discov.* 2016;6(10):1148-1165.
76. Mohás A, Krencz I, Váradi Z, Arató G, Felkai L, Kiss DJ, Moldvai D, Sebestyén A, Csóka M. In Situ Analysis of mTORC1/C2 and Metabolism-Related Proteins in Pediatric Osteosarcoma. *Pathol Oncol Res.* 2022;28:1610231.
 77. Ross JS, Wang K, Elkadi OR, Tarasen A, Foulke L, Sheehan CE, Otto GA, Palmer G, Yelensky R, Lipson D, Chmielecki J, Ali SM, Elvin J, Morosini D, Miller VA, Stephens PJ. Next-generation sequencing reveals frequent consistent genomic alterations in small cell undifferentiated lung cancer. *J Clin Pathol.* 2014;67(9):772-776.
 78. Umemura S, Mimaki S, Makinoshima H, Tada S, Ishii G, Ohmatsu H, Niho S, Yoh K, Matsumoto S, Takahashi A, Morise M, Nakamura Y, Ochiai A, Nagai K, Iwakawa R, Kohno T, Yokota J, Ohe Y, Esumi H, Tsuchihara K, Goto K. Therapeutic priority of the PI3K/AKT/mTOR pathway in small cell lung cancers as revealed by a comprehensive genomic analysis. *J Thorac Oncol.* 2014;9(9):1324-1331.
 79. Sakre N, Wildey G, Behtaj M, Kresak A, Yang M, Fu P, Dowlati A. RICTOR amplification identifies a subgroup in small cell lung cancer and predicts response to drugs targeting mTOR. *Oncotarget.* 2017;8(4):5992-6002.
 80. Krencz I, Sebestyén A, Papay J, Jeney A, Hujber Z, Burger CD, Keller CA, Khoor A. In situ analysis of mTORC1/2 and cellular metabolism-related proteins in human Lymphangioleiomyomatosis. *Hum Pathol.* 2018;79:199-207.
 81. Wen SY, Li CH, Zhang YL, Bian YH, Ma L, Ge QL, Teng YC, Zhang ZG. Rictor is an independent prognostic factor for endometrial carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(5):2068-2078.
 82. Sebestyén A, Sticz TB, Márk A, Hajdu M, Timár B, Nemes K, Nagy N, Váradi Z, Kopper L. Activity and complexes of mTOR in diffuse large B-cell lymphomas--a tissue microarray study. *Mod Pathol.* 2012;25(12):1623-1628.
 83. Márk Á, Hajdu M, Váradi Z, Sticz TB, Nagy N, Csomor J, Berczi L, Varga V, Csóka M, Kopper L, Sebestyén A. Characteristic mTOR activity in Hodgkin-lymphomas offers a potential therapeutic target in high risk disease--a combined tissue microarray, in vitro and in vivo study. *BMC Cancer.* 2013;13:250.

84. Zeng Z, Sarbassov dos D, Samudio IJ, Yee KW, Munsell MF, Ellen Jackson C, Giles FJ, Sabatini DM, Andreeff M, Konopleva M. Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. *Blood*. 2007;109(8):3509-3512.
85. Zhuang J, Hawkins SF, Glenn MA, Lin K, Johnson GG, Carter A, Cawley JC, Pettitt AR. Akt is activated in chronic lymphocytic leukemia cells and delivers a pro-survival signal: the therapeutic potential of Akt inhibition. *Haematologica*. 2010;95(1):110-118.
86. Simioni C, Martelli AM, Zauli G, Melloni E, Neri LM. Targeting mTOR in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cells*. 2019;8(2):190.
87. Müller A, Zang C, Chumduri C, Dörken B, Daniel PT, Scholz CW. Concurrent inhibition of PI3K and mTORC1/mTORC2 overcomes resistance to rapamycin induced apoptosis by down-regulation of Mcl-1 in mantle cell lymphoma. *Int J Cancer*. 2013;133(8):1813-1824.
88. Zhang X, Wang X, Xu T, Zhong S, Shen Z. Targeting of mTORC2 may have advantages over selective targeting of mTORC1 in the treatment of malignant pheochromocytoma. *Tumour Biol*. 2015;36(7):5273-5281.
89. Masui K, Tanaka K, Ikegami S, Villa GR, Yang H, Yong WH, Cloughesy TF, Yamagata K, Arai N, Cavenee WK, Mischel PS. Glucose-dependent acetylation of Rictor promotes targeted cancer therapy resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(30):9406-9411.
90. Lamouille S, Connolly E, Smyth JW, Akhurst RJ, Derynck R. TGF- β -induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial-mesenchymal transition and cell invasion. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 5):1259-1273.
91. Zhou H, Guan Q, Hou X, Liu L, Zhou L, Li W, Liu H. Epithelial-mesenchymal reprogramming by KLF4-regulated Rictor expression contributes to metastasis of non-small cell lung cancer cells. *Int J Biol Sci*. 2022;18(13):4869-4883.
92. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(3):178-196.
93. Serrano I, McDonald PC, Lock FE, Dedhar S. Role of the integrin-linked kinase (ILK)/Rictor complex in TGF β -1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Oncogene*. 2013;32(1):50-60.

94. Dai H, Thomson AW. The "other" mTOR complex: New insights into mTORC2 immunobiology and their implications. *Am J Transplant*. 2019 Jun;19(6):1614-1621.
95. Chantaravisoot N, Wongkongkathep P, Kalpongkul N, Pacharakullanon N, Kaewsapsak P, Ariyachet C, Loo JA, Tamanoi F, Pisitkun T. mTORC2 interactome and localization determine aggressiveness of high-grade glioma cells through association with gelsolin. *Sci Rep*. 2023;13(1):7037.
96. Prakash V, Carson BB, Feenstra JM, Dass RA, Sekyrova P, Hoshino A, Petersen J, Guo Y, Parks MM, Kurylo CM, Batchelder JE, Haller K, Hashimoto A, Rundqvist H, Condeelis JS, Allis CD, Drygin D, Nieto MA, Andäng M, Percipalle P, Bergh J, Adameyko I, Farrants AÖ, Hartman J, Lyden D, Pietras K, Blanchard SC, Vincent CT. Ribosome biogenesis during cell cycle arrest fuels EMT in development and disease. *Nat Commun*. 2019;10(1):2110.
97. Tsirtsaki K, Gkretsi V. The focal adhesion protein Integrin-Linked Kinase (ILK) as an important player in breast cancer pathogenesis. *Cell Adh Migr*. 2020;14(1):204-213.
98. Górska A, Mazur AJ. Integrin-linked kinase (ILK): the known vs. the unknown and perspectives. *Cell Mol Life Sci*. 2022;79(2):100.
99. Almasabi S, Ahmed AU, Boyd R, Williams BRG. A Potential Role for Integrin-Linked Kinase in Colorectal Cancer Growth and Progression via Regulating Senescence and Immunity. *Front Genet*. 2021;12:638558.
100. Gao D, Wan L, Inuzuka H, Berg AH, Tseng A, Zhai B, Shaik S, Bennett E, Tron AE, Gasser JA, Lau A, Gygi SP, Harper JW, DeCaprio JA, Toker A, Wei W. Rictor forms a complex with Cullin-1 to promote SGK1 ubiquitination and destruction. *Mol Cell*. 2010;39(5):797-808.
101. Pan SJ, Zhan SK, Pan YX, Liu W, Bian LG, Sun B, Sun QF. Tetraspanin 8-rictor-integrin $\alpha 3$ complex is required for glioma cell migration. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):5363-5374.
102. Guo Z, Zhou Y, Evers BM, Wang Q. Rictor regulates FBXW7-dependent c-Myc and cyclin E degradation in colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;418(2):426-432.

103. Hagan GN, Lin Y, Magnuson MA, Avruch J, Czech MP. A Rictor-Myo1c complex participates in dynamic cortical actin events in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol.* 2008;28(13):4215-4226.
104. Bera A, Das F, Ghosh-Choudhury N, Kasinath BS, Abboud HE, Choudhury GG. microRNA-21-induced dissociation of PDCD4 from rictor contributes to Akt-IKK β -mTORC1 axis to regulate renal cancer cell invasion. *Exp Cell Res.* 2014;328(1):99-117.
105. Zhang F, Zhang X, Li M, Chen P, Zhang B, Guo H, Cao W, Wei X, Cao X, Hao X, Zhang N. mTOR complex component Rictor interacts with PKC ζ and regulates cancer cell metastasis. *Cancer Res.* 2010;70(22):9360-9370.
106. Sztankovics D, Krencz I, Moldvai D, Dankó T, Nagy Á, Nagy N, Bedics G, Rókusz A, Papp G, Tóké AM, Pápay J, Sápi Z, Dezső K, Bödör C, Sebestyén A. Novel RICTOR amplification harbouring entities: FISH validation of RICTOR amplification in tumour tissue after next-generation sequencing. *Sci Rep.* 2023;13(1):19610.
107. Li Y, Yan B, He S. Advances and challenges in the treatment of lung cancer. *Biomed Pharmacother.* 2023;169:115891.
108. Schabath MB, Cote ML. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019;28(10):1563-1579.
109. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(3):229-263.
110. Bogos K, Ostoros G. Tüdörák. *Korányi Bulletin.* 2024;1:28-37.
111. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, Dacic S, Jain D, Kerr KM, Lantuejoul S, Noguchi M, Papotti M, Rekhtman N, Scagliotti G, van Schil P, Sholl L, Yatabe Y, Yoshida A, Travis WD. The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *J Thorac Oncol.* 2022;17(3):362-387.
112. Wei X, Li X, Hu S, Cheng J, Cai R. Regulation of Ferroptosis in Lung Adenocarcinoma. *Int J Mol Sci.* 2023;24(19):14614.

113. Chen JW, Dhahbi J. Lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma cancer classification, biomarker identification, and gene expression analysis using overlapping feature selection methods. *Sci Rep.* 2021;11(1):13323.
114. Blandin Knight S, Crosbie PA, Balata H, Chudziak J, Hussell T, Dive C. Progress and prospects of early detection in lung cancer. *Open Biol.* 2017;7(9):170070.
115. Sung S, Heymann JJ, Politis MG, Baine MK, Rekhtman N, Saqi A. Small Biopsy and Cytology of Pulmonary Neuroendocrine Neoplasms: Brief Overview of Classification, Immunohistochemistry, Molecular Profiles, and World Health Organization Updates. *Adv Anat Pathol.* 2022;29(6):329-336.
116. Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD. Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(12):725-737.
117. Travis WD, Rush W, Flieder DB, Falk R, Fleming MV, Gal AA, Koss MN. Survival analysis of 200 pulmonary neuroendocrine tumors with clarification of criteria for atypical carcinoid and its separation from typical carcinoid. *Am J Surg Pathol.* 1998;22(8):934-944.
118. Fisseler-Eckhoff A, Demes M. Neuroendocrine tumors of the lung. *Cancers (Basel).* 2012;4(3):777-798.
119. Maleki Z, Nadella A, Nadella M, Patel G, Patel S, Kholová I. INSM1, a Novel Biomarker for Detection of Neuroendocrine Neoplasms: Cytopathologists' View. *Diagnostics (Basel).* 2021;11(12):2172.
120. La Rosa S. Diagnostic, Prognostic, and Predictive Role of Ki67 Proliferative Index in Neuroendocrine and Endocrine Neoplasms: Past, Present, and Future. *Endocr Pathol.* 2023;34(1):79-97.
121. Waarts MR, Stonestrom AJ, Park YC, Levine RL. Targeting mutations in cancer. *J Clin Invest.* 2022;132(8):e154943.
122. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016;17(6):333-351.
123. Levy SE, Myers RM. Advancements in Next-Generation Sequencing. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2016;17:95-115.
124. Nagahashi M, Shimada Y, Ichikawa H, Kameyama H, Takabe K, Okuda S, Wakai T. Next generation sequencing-based gene panel tests for the management of solid tumors. *Cancer Sci.* 2019;110(1):6-15.

125. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014;511(7511):543-550. Erratum in: *Nature*. 2014;514(7521):262. Rogers, K [corrected to Rodgers, K]. Erratum in: *Nature*. 2018;559(7715):E12.
126. George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretić L, Kong G, Leenders F, Lu X, Fernández-Cuesta L, Bosco G, Müller C, Dahmen I, Jahchan NS, Park KS, Yang D, Karnezis AN, Vaka D, Torres A, Wang MS, Korbel JO, Menon R, Chun SM, Kim D, Wilkerson M, Hayes N, Engelmann D, Pützer B, Bos M, Michels S, Vlasic I, Seidel D, Pinther B, Schaub P, Becker C, Altmüller J, Yokota J, Kohno T, Iwakawa R, Tsuta K, Noguchi M, Muley T, Hoffmann H, Schnabel PA, Petersen I, Chen Y, Soltermann A, Tischler V, Choi CM, Kim YH, Massion PP, Zou Y, Jovanovic D, Kontic M, Wright GM, Russell PA, Solomon B, Koch I, Lindner M, Muscarella LA, la Torre A, Field JK, Jakopovic M, Knezevic J, Castañós-Vélez E, Roz L, Pastorino U, Brustugun OT, Lund-Iversen M, Thunnissen E, Köhler J, Schuler M, Botling J, Sandelin M, Sanchez-Cespedes M, Salvesen HB, Achter V, Lang U, Bogus M, Schneider PM, Zander T, Ansén S, Hallek M, Wolf J, Vingron M, Yatabe Y, Travis WD, Nürnberg P, Reinhardt C, Perner S, Heukamp L, Büttner R, Haas SA, Brambilla E, Peifer M, Sage J, Thomas RK. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*. 2015;524(7563):47-53.
127. Ozaki T, Nakagawara A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel)*. 2011;3(1):994-1013.
128. Ferrara MG, Belluomini L, Smimmo A, Sposito M, Avancini A, Giannarelli D, Milella M, Pilotto S, Bria E. Meta-analysis of the prognostic impact of TP53 co-mutations in EGFR-mutant advanced non-small-cell lung cancer treated with tyrosine kinase inhibitors. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2023;184:103929.
129. Wang Y, Goh KY, Chen Z, Lee WX, Choy SM, Fong JX, Wong YK, Li D, Hu F, Tang HW. A Novel TP53 Gene Mutation Sustains Non-Small Cell Lung Cancer through Mitophagy. *Cells*. 2022;11(22):3587.
130. Cascetta P, Marinello A, Lazzari C, Gregorc V, Planchard D, Bianco R, Normanno N, Morabito A. KRAS in NSCLC: State of the Art and Future Perspectives. *Cancers (Basel)*. 2022;14(21):5430.

131. Judd J, Abdel Karim N, Khan H, Naqash AR, Baca Y, Xiu J, VanderWalde AM, Mamdani H, Raez LE, Nagasaka M, Pai SG, Socinski MA, Nieva JJ, Kim C, Wozniak AJ, Ikpeazu C, de Lima Lopes G Jr, Spira AI, Korn WM, Kim ES, Liu SV, Borghaei H. Characterization of KRAS Mutation Subtypes in Non-small Cell Lung Cancer. *Mol Cancer Ther.* 2021;20(12):2577-2584.
132. Reck M, Carbone DP, Garassino M, Barlesi F. Targeting KRAS in non-small-cell lung cancer: recent progress and new approaches. *Ann Oncol.* 2021;32(9):1101-1110.
133. Yan N, Guo S, Zhang H, Zhang Z, Shen S, Li X. BRAF-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: Current Treatment Status and Future Perspective. *Front Oncol.* 2022;12:863043.
134. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004;350(21):2129-2139.
135. Castellanos E, Feld E, Horn L. Driven by Mutations: The Predictive Value of Mutation Subtype in EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2017;12(4):612-623.
136. Planchard D, Loriot Y, André F, Gobert A, Auger N, Lacroix L, Soria JC. EGFR-independent mechanisms of acquired resistance to AZD9291 in EGFR T790M-positive NSCLC patients. *Ann Oncol.* 2015;26(10):2073-2078.
137. Schrank Z, Chhabra G, Lin L, Iderzorig T, Osude C, Khan N, Kuckovic A, Singh S, Miller RJ, Puri N. Current Molecular-Targeted Therapies in NSCLC and Their Mechanism of Resistance. *Cancers (Basel).* 2018;10(7):224.
138. Cardillo AB, Kovar S, Roper N, Hicks DG, Velez MJ. Exploration of HER2 (ERBB2) immunohistochemistry in non-small cell lung cancer: correlation with ERBB2 mutational status: experimental research. *Ann Med Surg (Lond).* 2023;85(6):2640-2646.
139. Uy NF, Merkhofer CM, Baik CS. HER2 in Non-Small Cell Lung Cancer: A Review of Emerging Therapies. *Cancers (Basel).* 2022;14(17):4155.

140. Hendriks LEL, Menis J, Reck M. Prospects of targeted and immune therapies in SCLC. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2019;19(2):151-167.
141. Sabari JK, Lok BH, Laird JH, Poirier JT, Rudin CM. Unravelling the biology of SCLC: implications for therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(9):549-561.
142. Sharp A, Bhosle J, Abdelraouf F, Popat S, O'Brien M, Yap TA. Development of molecularly targeted agents and immunotherapies in small cell lung cancer. *Eur J Cancer.* 2016;60:26-39.
143. Lawson MH, Cummings NM, Rassl DM, Vowler SL, Wickens M, Howat WJ, Brenton JD, Murphy G, Rintoul RC. Bcl-2 and β 1-integrin predict survival in a tissue microarray of small cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2010;103(11):1710-1715.
144. Byers LA, Wang J, Nilsson MB, Fujimoto J, Saintigny P, Yordy J, Giri U, Peyton M, Fan YH, Diao L, Masrourpour F, Shen L, Liu W, Duchemann B, Tumula P, Bhardwaj V, Welsh J, Weber S, Glisson BS, Kalhor N, Wistuba II, Girard L, Lippman SM, Mills GB, Coombes KR, Weinstein JN, Minna JD, Heymach JV. Proteomic profiling identifies dysregulated pathways in small cell lung cancer and novel therapeutic targets including PARP1. *Cancer Discov.* 2012;2(9):798-811.
145. Sirhan Z, Alojair R, Thyagarajan A, Sahu RP. Therapeutic Implications of PTEN in Non-Small Cell Lung Cancer. *Pharmaceutics.* 2023;15(8):2090.
146. Tan X, Tong L, Li L, Xu J, Xie S, Ji L, Fu J, Liu Q, Shen S, Liu Y, Xiao Y, Gao F, Moses RE, Bardeesy N, Wang Y, Zhang J, Tang L, Li L, Wong KK, Song D, Yang X, Liu J, Li X. Loss of Smad4 promotes aggressive lung cancer metastasis by de-repression of PAK3 via miRNA regulation. *Nat Commun.* 2021;12(1):4853.
147. Tian T, Li X, Zhang J. mTOR Signaling in Cancer and mTOR Inhibitors in Solid Tumor Targeting Therapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3):755.
148. Conde E, Angulo B, Tang M, Morente M, Torres-Lanzas J, Lopez-Encuentra A, Lopez-Rios F, Sanchez-Cespedes M. Molecular context of the EGFR mutations: evidence for the activation of mTOR/S6K signaling. *Clin Cancer Res.* 2006;12(3 Pt 1):710-717.
149. Papadimitrakopoulou V. Development of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors and their application in personalized therapy for non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2012;7(8):1315-1326.

150. Janku F, Yap TA, Meric-Bernstam F. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(5):273-291.
151. Peifer M, Fernández-Cuesta L, Sos ML, George J, Seidel D, Kasper LH, Plenker D, Leenders F, Sun R, Zander T, Menon R, Koker M, Dahmen I, Müller C, Di Cerbo V, Schildhaus HU, Altmüller J, Baessmann I, Becker C, de Wilde B, Vandesompele J, Böhm D, Ansén S, Gabler F, Wilkening I, Heynck S, Heuckmann JM, Lu X, Carter SL, Cibulskis K, Banerji S, Getz G, Park KS, Rauh D, Grütter C, Fischer M, Pasqualucci L, Wright G, Wainer Z, Russell P, Petersen I, Chen Y, Stoecken E, Ludwig C, Schnabel P, Hoffmann H, Muley T, Brockmann M, Engel-Riedel W, Muscarella LA, Fazio VM, Groen H, Timens W, Sietsma H, Thunnissen E, Smit E, Heideman DA, Snijders PJ, Cappuzzo F, Ligorio C, Damiani S, Field J, Solberg S, Brustugun OT, Lund-Iversen M, Sängler J, Clement JH, Soltermann A, Moch H, Weder W, Solomon B, Soria JC, Validire P, Besse B, Brambilla E, Brambilla C, Lantuejoul S, Lorimier P, Schneider PM, Hallek M, Pao W, Meyerson M, Sage J, Shendure J, Schneider R, Büttner R, Wolf J, Nürnberg P, Perner S, Heukamp LC, Brindle PK, Haas S, Thomas RK. Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nat Genet.* 2012;44(10):1104-1110.
152. Rudin CM, Durinck S, Stawiski EW, Poirier JT, Modrusan Z, Shames DS, Bergbower EA, Guan Y, Shin J, Guillory J, Rivers CS, Foo CK, Bhatt D, Stinson J, Gnad F, Haverty PM, Gentleman R, Chaudhuri S, Janakiraman V, Jaiswal BS, Parikh C, Yuan W, Zhang Z, Koeppen H, Wu TD, Stern HM, Yauch RL, Huffman KE, Paskulin DD, Illei PB, Varella-Garcia M, Gazdar AF, de Sauvage FJ, Bourgon R, Minna JD, Brock MV, Seshagiri S. Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. *Nat Genet.* 2012;44(10):1111-1116.
153. Gardner EE, Lok BH, Schneeberger VE, Desmeules P, Miles LA, Arnold PK, Ni A, Khodos I, de Stanchina E, Nguyen T, Sage J, Campbell JE, Ribich S, Rekhman N, Dowlati A, Massion PP, Rudin CM, Poirier JT. Chemosensitive Relapse in Small Cell Lung Cancer Proceeds through an EZH2-SLFN11 Axis. *Cancer Cell.* 2017;31(2):286-299.

154. Hendifar AE, Marchevsky AM, Tuli R. Neuroendocrine Tumors of the Lung: Current Challenges and Advances in the Diagnosis and Management of Well-Differentiated Disease. *J Thorac Oncol.* 2017;12(3):425-436.
155. Pesch B, Kendzia B, Gustavsson P, Jöckel KH, Johnen G, Pohlabein H, Olsson A, Ahrens W, Gross IM, Bröske I, Wichmann HE, Merletti F, Richiardi L, Simonato L, Fortes C, Siemiatycki J, Parent ME, Consonni D, Landi MT, Caporaso N, Zaridze D, Cassidy A, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, Lissowska J, Stücker I, Fabianova E, Dumitru RS, Bencko V, Foretova L, Janout V, Rudin CM, Brennan P, Boffetta P, Straif K, Brüning T. Cigarette smoking and lung cancer--relative risk estimates for the major histological types from a pooled analysis of case-control studies. *Int J Cancer.* 2012;131(5):1210-1219.
156. Poirier JT, George J, Owonikoko TK, Berns A, Brambilla E, Byers LA, Carbone D, Chen HJ, Christensen CL, Dive C, Farago AF, Govindan R, Hann C, Hellmann MD, Horn L, Johnson JE, Ju YS, Kang S, Krasnow M, Lee J, Lee SH, Lehman J, Lok B, Lovly C, MacPherson D, McFadden D, Minna J, Oser M, Park K, Park KS, Pommier Y, Quaranta V, Ready N, Sage J, Scagliotti G, Sos ML, Sutherland KD, Travis WD, Vakoc CR, Wait SJ, Wistuba I, Wong KK, Zhang H, Daigneault J, Wiens J, Rudin CM, Oliver TG. New Approaches to SCLC Therapy: From the Laboratory to the Clinic. *J Thorac Oncol.* 2020;15(4):520-540.
157. Sen T, Takahashi N, Chakraborty S, Takebe N, Nassar AH, Karim NA, Puri S, Naqash AR. Emerging advances in defining the molecular and therapeutic landscape of small-cell lung cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2024;21(8):610-627.
158. Schneider BJ, Saxena A, Downey RJ. Surgery for early-stage small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw.* 2011;9(10):1132-1139.
159. Liu Y, Liu XH, Wang Y, Zhu J, Xin Y, Niu K, Wang S, Cheng Y. A study on different therapies and prognosis-related factors for 101 patients with SCLC and brain metastases. *Cancer Biol Ther.* 2017;18(9):670-675.
160. Li N, Chu Y, Song Q. Brain Metastasis in Patients with Small Cell Lung Cancer. *Int J Gen Med.* 2021;14:10131-10139.
161. Rudin CM, Brambilla E, Faivre-Finn C, Sage J. Small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2021;7(1):3.

162. Yang S, Zhang Z, Wang Q. Emerging therapies for small cell lung cancer. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):47.
163. Paz-Ares L, Chen Y, Reinmuth N, Hotta K, Trukhin D, Statsenko G, Hochmair MJ, Özgüroğlu M, Ji JH, Garassino MC, Voitko O, Poltoratskiy A, Musso E, Havel L, Bondarenko I, Losonczy G, Conev N, Mann H, Dalvi TB, Jiang H, Goldman JW. Durvalumab, with or without tremelimumab, plus platinum-etoposide in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer: 3-year overall survival update from CASPIAN. *ESMO Open.* 2022;7(2):100408.
164. Roth BJ, Johnson DH, Einhorn LH, Schacter LP, Cherng NC, Cohen HJ, Crawford J, Randolph JA, Goodlow JL, Broun GO, et al. Randomized study of cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine versus etoposide and cisplatin versus alternation of these two regimens in extensive small-cell lung cancer: a phase III trial of the Southeastern Cancer Study Group. *J Clin Oncol.* 1992;10(2):282-291.
165. Sundstrøm S, Bremnes RM, Kaasa S, Aasebø U, Hatlevoll R, Dahle R, Boye N, Wang M, Vigander T, Vilsvik J, Skovlund E, Hannisdal E, Aamdal S; Norwegian Lung Cancer Study Group. Cisplatin and etoposide regimen is superior to cyclophosphamide, epirubicin, and vincristine regimen in small-cell lung cancer: results from a randomized phase III trial with 5 years' follow-up. *J Clin Oncol.* 2002;20(24):4665-4672.
166. Herzog BH, Devarakonda S, Govindan R. Overcoming Chemotherapy Resistance in SCLC. *J Thorac Oncol.* 2021;16(12):2002-2015.
167. He J, Pan H, He J, Li S. Effectiveness and safety of bevacizumab in extensive-disease small cell lung cancer: a systemic review and meta-analysis. *Ann Transl Med.* 2021;9(16):1285.
168. Ready NE, Pang HH, Gu L, Otterson GA, Thomas SP, Miller AA, Baggstrom M, Masters GA, Graziano SL, Crawford J, Bogart J, Vokes EE. Chemotherapy With or Without Maintenance Sunitinib for Untreated Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase II Study-CALGB 30504 (Alliance). *J Clin Oncol.* 2015;33(15):1660-1665.
169. Yuan M, Zhao Y, Arkenau HT, Lao T, Chu L, Xu Q. Signal pathways and precision therapy of small-cell lung cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):187.

170. Pietanza MC, Waqar SN, Krug LM, Dowlati A, Hann CL, Chiappori A, Owonikoko TK, Woo KM, Cardnell RJ, Fujimoto J, Long L, Diao L, Wang J, Bensman Y, Hurtado B, de Groot P, Sulman EP, Wistuba II, Chen A, Fleisher M, Heymach JV, Kris MG, Rudin CM, Byers LA. Randomized, Double-Blind, Phase II Study of Temozolomide in Combination With Either Veliparib or Placebo in Patients With Relapsed-Sensitive or Refractory Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(23):2386-2394.
171. Farago AF, Yeap BY, Stanzione M, Hung YP, Heist RS, Marcoux JP, Zhong J, Rangachari D, Barbie DA, Phat S, Myers DT, Morris R, Kem M, Dubash TD, Kennedy EA, Digumarthy SR, Sequist LV, Hata AN, Maheswaran S, Haber DA, Lawrence MS, Shaw AT, Mino-Kenudson M, Dyson NJ, Drapkin BJ. Combination Olaparib and Temozolomide in Relapsed Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Discov*. 2019;9(10):1372-1387.
172. Langer CJ, Albert I, Ross HJ, Kovacs P, Blakely LJ, Pajkos G, Somfay A, Zatloukal P, Kazarnowicz A, Moezi MM, Schreeder MT, Schnyder J, Ao-Baslock A, Pathak AK, Berger MS; GEM017 Investigators. Randomized phase II study of carboplatin and etoposide with or without obatoclox mesylate in extensive-stage small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2014;85(3):420-428.
173. Baggstrom MQ, Qi Y, Koczywas M, Argiris A, Johnson EA, Millward MJ, Murphy SC, Erlichman C, Rudin CM, Govindan R; Mayo Phase 2 Consortium; California Consortium. A phase II study of AT-101 (Gossypol) in chemotherapy-sensitive recurrent extensive-stage small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2011;6(10):1757-1760.
174. Valko Z, Megyesfalvi Z, Schwendenwein A, Lang C, Paku S, Barany N, Ferencz B, Horvath-Rozsas A, Kovacs I, Schlegl E, Pozzonec V, Boettiger K, Rezeli M, Marko-Varga G, Renyi-Vamos F, Hoda MA, Klikovits T, Hoetzenecker K, Grusch M, Laszlo V, Dome B, Schelch K. Dual targeting of BCL-2 and MCL-1 in the presence of BAX breaks venetoclax resistance in human small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2023;128(10):1850-1861.
175. Owonikoko TK, Niu H, Nackaerts K, Csoszi T, Ostoros G, Mark Z, Baik C, Joy AA, Chouaid C, Jaime JC, Kolek V, Majem M, Roubec J, Santos ES, Chiang AC, Speranza G, Belani CP, Chiappori A, Patel MR, Czebe K, Byers L, Bahamon B, Li

- C, Sheldon-Waniga E, Kong EF, Williams M, Badola S, Shin H, Bedford L, Ecsedy JA, Bryant M, Jones S, Simmons J, Leonard EJ, Ullmann CD, Spiegel DR; C14018 study investigators. Randomized Phase II Study of Paclitaxel plus Alisertib versus Paclitaxel plus Placebo as Second-Line Therapy for SCLC: Primary and Correlative Biomarker Analyses. *J Thorac Oncol.* 2020;15(2):274-287.
176. Blackhall F, Jao K, Greillier L, Cho BC, Penkov K, Reguart N, Majem M, Nackaerts K, Syrigos K, Hansen K, Schuette W, Cetnar J, Cappuzzo F, Okamoto I, Erman M, Langer SW, Kato T, Groen H, Sun Z, Luo Y, Tanwani P, Caffrey L, Komarnitsky P, Reinmuth N. Efficacy and Safety of Rovalpituzumab Tesirine Compared With Topotecan as Second-Line Therapy in DLL3-High SCLC: Results From the Phase 3 TAHOE Study. *J Thorac Oncol.* 2021;16(9):1547-1558.
 177. Paz-Ares L, Champiat S, Lai WV, Izumi H, Govindan R, Boyer M, Hummel HD, Borghaei H, Johnson ML, Steeghs N, Blackhall F, Dowlati A, Reguart N, Yoshida T, He K, Gadgeel SM, Felip E, Zhang Y, Pati A, Minocha M, Mukherjee S, Goldrick A, Nagorsen D, Hashemi Sadraei N, Owonikoko TK. Tarlatamab, a First-in-Class DLL3-Targeted Bispecific T-Cell Engager, in Recurrent Small-Cell Lung Cancer: An Open-Label, Phase I Study. *J Clin Oncol.* 2023;41(16):2893-2903.
 178. Paz-Ares L, Garassino MC, Chen Y, Reinmuth N, Hotta K, Poltoratskiy A, Trukhin D, Hochmair MJ, Özgüroğlu M, Ji JH, Statsenko G, Conev N, Bondarenko I, Havel L, Losonczy G, Xie M, Lai Z, Godin-Heymann N, Mann H, Jiang H, Shrestha Y, Goldman JW. Durvalumab ± Tremelimumab + Platinum-Etoposide in Extensive-Stage Small Cell Lung Cancer (CASPIAN): Outcomes by PD-L1 Expression and Tissue Tumor Mutational Burden. *Clin Cancer Res.* 2024;30(4):824-835.
 179. Rudin CM, Awad MM, Navarro A, Gottfried M, Peters S, Csőszi T, Cheema PK, Rodriguez-Abreu D, Wollner M, Yang JC, Mazieres J, Orlandi FJ, Luft A, Gümüş M, Kato T, Kalemkerian GP, Luo Y, Ebiana V, Pietanza MC, Kim HR; KEYNOTE-604 Investigators. Pembrolizumab or Placebo Plus Etoposide and Platinum as First-Line Therapy for Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer: Randomized, Double-Blind, Phase III KEYNOTE-604 Study. *J Clin Oncol.* 2020;38(21):2369-2379.
 180. Rudin CM, Poirier JT, Byers LA, Dive C, Dowlati A, George J, Heymach JV, Johnson JE, Lehman JM, MacPherson D, Massion PP, Minna JD, Oliver TG,

- Quaranta V, Sage J, Thomas RK, Vakoc CR, Gazdar AF. Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and mouse model data. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(5):289-297.
181. Baine MK, Hsieh MS, Lai WV, Egger JV, Jungbluth AA, Daneshbod Y, Beras A, Spencer R, Lopardo J, Bodd F, Montecalvo J, Sauter JL, Chang JC, Buonocore DJ, Travis WD, Sen T, Poirier JT, Rudin CM, Rekhtman N. SCLC Subtypes Defined by ASCL1, NEUROD1, POU2F3, and YAP1: A Comprehensive Immunohistochemical and Histopathologic Characterization. *J Thorac Oncol*. 2020;15(12):1823-1835.
 182. Gay CM, Stewart CA, Park EM, Diao L, Groves SM, Heeke S, Nabet BY, Fujimoto J, Solis LM, Lu W, Xi Y, Cardnell RJ, Wang Q, Fabbri G, Cargill KR, Vokes NI, Ramkumar K, Zhang B, Della Corte CM, Robson P, Swisher SG, Roth JA, Glisson BS, Shames DS, Wistuba II, Wang J, Quaranta V, Minna J, Heymach JV, Byers LA. Patterns of transcription factor programs and immune pathway activation define four major subtypes of SCLC with distinct therapeutic vulnerabilities. *Cancer Cell*. 2021;39(3):346-360.e7.
 183. Raso MG, Bota-Rabassedas N, Wistuba II. Pathology and Classification of SCLC. *Cancers (Basel)*. 2021;13(4):820.
 184. Bumber Y. Tumor mutational burden (TMB) as a biomarker of response to immunotherapy in small cell lung cancer. *J Thorac Dis*. 2018;10(8):4689-4693.
 185. Krencz I, Sztankovics D, Danko T, Sebestyen A, Khoor A. Progression and metastasis of small cell lung carcinoma: the role of the PI3K/Akt/mTOR pathway and metabolic alterations. *Cancer Metastasis Rev*. 2021;40(4):1141-1157.
 186. Mollaoglu G, Guthrie MR, Böhm S, Brägelmann J, Can I, Ballieu PM, Marx A, George J, Heinen C, Chalishazar MD, Cheng H, Ireland AS, Denning KE, Mukhopadhyay A, Vahrenkamp JM, Berrett KC, Mosbrugger TL, Wang J, Kohan JL, Salama ME, Witt BL, Peifer M, Thomas RK, Gertz J, Johnson JE, Gazdar AF, Wechsler-Reya RJ, Sos ML, Oliver TG. MYC Drives Progression of Small Cell Lung Cancer to a Variant Neuroendocrine Subtype with Vulnerability to Aurora Kinase Inhibition. *Cancer Cell*. 2017;31(2):270-285.
 187. Ireland AS, Micinski AM, Kastner DW, Guo B, Wait SJ, Spainhower KB, Conley CC, Chen OS, Guthrie MR, Soltero D, Qiao Y, Huang X, Tarapcsák S,

- Devarakonda S, Chalishazar MD, Gertz J, Moser JC, Marth G, Puri S, Witt BL, Spike BT, Oliver TG. MYC Drives Temporal Evolution of Small Cell Lung Cancer Subtypes by Reprogramming Neuroendocrine Fate. *Cancer Cell*. 2020;38(1):60-78.e12.
188. Saunders LR, Bankovich AJ, Anderson WC, Aujay MA, Bheddah S, Black K, Desai R, Escarpe PA, Hampl J, Laysang A, Liu D, Lopez-Molina J, Milton M, Park A, Pysz MA, Shao H, Slingerland B, Torgov M, Williams SA, Foord O, Howard P, Jassem J, Badzio A, Czapiewski P, Harpole DH, Dowlati A, Massion PP, Travis WD, Pietanza MC, Poirier JT, Rudin CM, Stull RA, Dylla SJ. A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo. *Sci Transl Med*. 2015;7(302):302ra136.
 189. Sen T, Tong P, Stewart CA, Cristea S, Valliani A, Shames DS, Redwood AB, Fan YH, Li L, Glisson BS, Minna JD, Sage J, Gibbons DL, Piwnica-Worms H, Heymach JV, Wang J, Byers LA. CHK1 Inhibition in Small-Cell Lung Cancer Produces Single-Agent Activity in Biomarker-Defined Disease Subsets and Combination Activity with Cisplatin or Olaparib. *Cancer Res*. 2017;77(14):3870-3884.
 190. Huang YH, Klingbeil O, He XY, Wu XS, Arun G, Lu B, Somerville TDD, Milazzo JP, Wilkinson JE, Demerdash OE, Spector DL, Egeblad M, Shi J, Vakoc CR. POU2F3 is a master regulator of a tuft cell-like variant of small cell lung cancer. *Genes Dev*. 2018;32(13-14):915-928.
 191. Dora D, Rivard C, Yu H, Bunn P, Suda K, Ren S, Lueke Pickard S, Laszlo V, Harko T, Megyesfalvi Z, Moldvay J, Hirsch FR, Dome B, Lohinai Z. Neuroendocrine subtypes of small cell lung cancer differ in terms of immune microenvironment and checkpoint molecule distribution. *Mol Oncol*. 2020;14(9):1947-1965.
 192. Schwendenwein A, Megyesfalvi Z, Barany N, Valko Z, Bugyik E, Lang C, Ferencz B, Paku S, Lantos A, Fillinger J, Rezeli M, Marko-Varga G, Bogos K, Galffy G, Renyi-Vamos F, Hoda MA, Klepetko W, Hoetzenecker K, Laszlo V, Dome B. Molecular profiles of small cell lung cancer subtypes: therapeutic implications. *Mol Ther Oncolytics*. 2021;20:470-483.

193. Horie M, Saito A, Ohshima M, Suzuki HI, Nagase T. YAP and TAZ modulate cell phenotype in a subset of small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2016;107(12):1755-1766.
194. Liu S, Cao H, Guo D, Jiang Y, Yin H, Zhu J, Duan Q, Seleh-Zo EDM, Li G, An X, Cao B. Pou2F3 silencing enhanced the proliferation of mammary epithelial cells in dairy goat via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Anim Biotechnol.* 2022;33(2):321-329.
195. Owonikoko TK, Khuri FR. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway: biomarkers of success and tribulation. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2013;33:395-401.
196. Wander SA, Hennessy BT, Slingerland JM. Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *J Clin Invest.* 2011;121(4):1231-1241.
197. Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA 3rd, Rugo HS, Sahmoud T, Noguchi S, Gnant M, Pritchard KI, Lebrun F, Beck JT, Ito Y, Yardley D, Deleu I, Perez A, Bachelot T, Vittori L, Xu Z, Mukhopadhyay P, Lebwohl D, Hortobagyi GN. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(6):520-529.
198. Mita MM, Gong J, Chawla SP. Ridaforolimus in advanced or metastatic soft tissue and bone sarcomas. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2013;6(5):465-482.
199. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005;307(5712):1098-1101.
200. Mao B, Zhang Q, Ma L, Zhao DS, Zhao P, Yan P. Overview of Research into mTOR Inhibitors. *Molecules.* 2022;27(16):5295.
201. Guenzle J, Akasaka H, Joechle K, Reichardt W, Venkatasamy A, Hoepfner J, Hellerbrand C, Fichtner-Feigl S, Lang SA. Pharmacological Inhibition of mTORC2 Reduces Migration and Metastasis in Melanoma. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1):30.
202. Conciatori F, Ciuffreda L, Bazzichetto C, Falcone I, Pilotto S, Bria E, Cognetti F, Milella M. mTOR Cross-Talk in Cancer and Potential for Combination Therapy. *Cancers (Basel).* 2018;10(1):23.
203. Yu L, Wei J, Liu P. Attacking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer. *Semin Cancer Biol.* 2022;85:69-94.

204. Tan AC. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Thorac Cancer*. 2020;11(3):511-518.
205. Basu B, Krebs MG, Sundar R, Wilson RH, Spicer J, Jones R, Brada M, Talbot DC, Steele N, Ingles Garces AH, Brugger W, Harrington EA, Evans J, Hall E, Tovey H, de Oliveira FM, Carreira S, Swales K, Ruddle R, Raynaud FI, Purchase B, Dawes JC, Parmar M, Turner AJ, Tunariu N, Banerjee S, de Bono JS, Banerji U. Vistusertib (dual m-TORC1/2 inhibitor) in combination with paclitaxel in patients with high-grade serous ovarian and squamous non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2018;29(9):1918-1925.
206. Park S, Shim J, Mortimer PGS, Smith SA, Godin RE, Hollingsworth SJ, Kim HJ, Jung HA, Sun JM, Park WY, Ahn JS, Ahn MJ, Lee SH, Park K. Biomarker-driven phase 2 umbrella trial study for patients with recurrent small cell lung cancer failing platinum-based chemotherapy. *Cancer*. 2020;126(17):4002-4012.
207. Gieszer B, Megyesfalvi Z, Dulai V, Papay J, Kovalszky I, Timar J, Fillinger J, Harko T, Pipek O, Teglas V, Regos E, Papp G, Szallasi Z, Laszlo V, Renyi-Vamos F, Galffy G, Bodor C, Dome B, Moldvay J. EGFR variant allele frequency predicts EGFR-TKI efficacy in lung adenocarcinoma: a multicenter study. *Transl Lung Cancer Res*. 2021;10(2):662-674.
208. Liang Y, Yu D, Perez-Soler R, Klostergaard J, Zou Y. TRIB2 contributes to cisplatin resistance in small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2017;8(65):109596-109608.
209. Kahn J, Hayman TJ, Jamal M, Rath BH, Kramp T, Camphausen K, Tofilon PJ. The mTORC1/mTORC2 inhibitor AZD2014 enhances the radiosensitivity of glioblastoma stem-like cells. *Neuro Oncol*. 2014;16(1):29-37.
210. Lin J, Sampath D, Nannini MA, Lee BB, Degtyarev M, Oeh J, Savage H, Guan Z, Hong R, Kassees R, Lee LB, Risom T, Gross S, Liederer BM, Koeppen H, Skelton NJ, Wallin JJ, Belvin M, Punnoose E, Friedman LS, Lin K. Targeting activated Akt with GDC-0068, a novel selective Akt inhibitor that is efficacious in multiple tumor models. *Clin Cancer Res*. 2013;19(7):1760-1772.
211. Fouquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol Res Perspect*. 2015;3(3):e00149. Erratum in: *Pharmacol Res Perspect*. 2019;7(6):e00549.

212. Javle M, Rashid A, Churi C, Kar S, Zuo M, Eterovic AK, Nogueras-Gonzalez GM, Janku F, Shroff RT, Aloia TA, Vauthey JN, Curley S, Mills G, Roa I. Molecular characterization of gallbladder cancer using somatic mutation profiling. *Hum Pathol.* 2014;45(4):701-708.
213. Wang F, Lou X, Zou Y, Hu D, Liu J, Ning J, Jiao Y, Zhang Z, Yang F, Fan L, Yu H, Wei W, Wang H, Sun G. Overexpression of Rictor protein and Rictor-H. pylori interaction has impact on tumor progression and prognosis in patients with gastric cancer. *Folia Histochem Cytobiol.* 2020;58(2):96-107
214. Bian Y, Wang Z, Xu J, Zhao W, Cao H, Zhang Z. Elevated Rictor expression is associated with tumor progression and poor prognosis in patients with gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;464(2):534-540.
215. Schmidt KM, Hellerbrand C, Ruemmele P, Michalski CW, Kong B, Kroemer A, Hackl C, Schlitt HJ, Geissler EK, Lang SA. Inhibition of mTORC2 component RICTOR impairs tumor growth in pancreatic cancer models. *Oncotarget.* 2017;8(15):24491-24505.
216. Xu Y, Li H, Huang Z, Chen K, Yu X, Sheng J, Zhang HH, Fan Y. Predictive values of genomic variation, tumor mutational burden, and PD-L1 expression in advanced lung squamous cell carcinoma treated with immunotherapy. *Transl Lung Cancer Res.* 2020;9(6):2367-2379.
217. Szeitz B, Megyesfalvi Z, Woldmar N, Valkó Z, Schwendenwein A, Bárány N, Paku S, László V, Kiss H, Bugyik E, Lang C, Szász AM, Pizzatti L, Bogos K, Hoda MA, Hoetzenecker K, Marko-Varga G, Horvatovich P, Döme B, Schelch K, Rezeli M. In-depth proteomic analysis reveals unique subtype-specific signatures in human small-cell lung cancer. *Clin Transl Med.* 2022;12(9):e1060.
218. Cappello F, Angerilli V, Munari G, Ceccon C, Sabbadin M, Pagni F, Fusco N, Malapelle U, Fassan M. FFPE-Based NGS Approaches into Clinical Practice: The Limits of Glory from a Pathologist Viewpoint. *J Pers Med.* 2022;12(5):750.
219. Ramaiah MJ, Kumar KR. mTOR-Rictor-EGFR axis in oncogenesis and diagnosis of glioblastoma multiforme. *Mol Biol Rep.* 2021;48(5):4813-4835.
220. Jhanwar-Uniyal M, Dominguez JF, Mohan AL, Tobias ME, Gandhi CD. Disentangling the signaling pathways of mTOR complexes, mTORC1 and

- mTORC2, as a therapeutic target in glioblastoma. *Adv Biol Regul.* 2022;83:100854.
221. Li X, Wu C, Chen N, Gu H, Yen A, Cao L, Wang E, Wang L. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget.* 2016;7(22):33440-33450.
 222. Miricescu D, Totan A, Stanescu-Spinu II, Badoiu SC, Stefani C, Greabu M. PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1):173.
 223. Moritz S, Krause M, Schlatter J, Cordes N, Vehlow A. Lamellipodin-RICTOR Signaling Mediates Glioblastoma Cell Invasion and Radiosensitivity Downstream of EGFR. *Cancers (Basel).* 2021;13(21):5337.
 224. Gatti G, Vilardo L, Musa C, Di Pietro C, Bonaventura F, Scavizzi F, Torcinaro A, Bucci B, Saporito R, Arisi I, De Santa F, Raspa M, Guglielmi L, D'Agnano I. Role of Lamin A/C as Candidate Biomarker of Aggressiveness and Tumorigenicity in Glioblastoma Multiforme. *Biomedicines.* 2021;9(10):1343.
 225. Roa I, de Toro G, Fernández F, Game A, Muñoz S, de Aretxabala X, Javle M. Inactivation of tumor suppressor gene pten in early and advanced gallbladder cancer. *Diagn Pathol.* 2015;10:148.
 226. Simbolo M, Fassan M, Ruzzenente A, Mafficini A, Wood LD, Corbo V, Melisi D, Malleo G, Vicentini C, Malpeli G, Antonello D, Sperandio N, Capelli P, Tomezzoli A, Iacono C, Lawlor RT, Bassi C, Hruban RH, Guglielmi A, Tortora G, de Braud F, Scarpa A. Multigene mutational profiling of cholangiocarcinomas identifies actionable molecular subgroups. *Oncotarget.* 2014;5(9):2839-2852.
 227. Subbannayya T, Leal-Rojas P, Zhavoronkov A, Ozerov IV, Korzinkin M, Babu N, Radhakrishnan A, Chavan S, Raja R, Pinto SM, Patil AH, Barbhuiya MA, Kumar P, Guerrero-Preston R, Navani S, Tiwari PK, Kumar RV, Prasad TSK, Roa JC, Pandey A, Sidransky D, Gowda H, Izumchenko E, Chatterjee A. PIM1 kinase promotes gallbladder cancer cell proliferation via inhibition of proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40). *J Cell Commun Signal.* 2019;13(2):163-177.
 228. Li Y, Li B, Li W, Wang Y, Akgül S, Treisman DM, Heist KA, Pierce BR, Hoff B, Ho CY, Ferguson DO, Rehemtulla A, Zheng S, Ross BD, Li JZ, Zhu Y. Murine

- models of IDH-wild-type glioblastoma exhibit spatial segregation of tumor initiation and manifestation during evolution. *Nat Commun.* 2020;11(1):3669.
229. Voss MH, Gordon MS, Mita M, Rini B, Makker V, Macarulla T, Smith DC, Cervantes A, Puzanov I, Pili R, Wang D, Jalal S, Pant S, Patel MR, Neuwirth RL, Enke A, Shou Y, Sedarati F, Faller DV, Burris HA 3rd. Phase 1 study of mTORC1/2 inhibitor sapanisertib (TAK-228) in advanced solid tumours, with an expansion phase in renal, endometrial or bladder cancer. *Br J Cancer.* 2020;123(11):1590-1598.
 230. Ishii T, Kohashi K, Iura K, Maekawa A, Bekki H, Yamada Y, Yamamoto H, Nabeshima K, Kawashima H, Iwamoto Y, Oda Y. Activation of the Akt-mTOR and MAPK pathways in dedifferentiated liposarcomas. *Tumour Biol.* 2016;37(4):4767-4776.
 231. Beck JT, Ismail A, Tolomeo C. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway: an emerging treatment strategy for squamous cell lung carcinoma. *Cancer Treat Rev.* 2014;40(8):980-989.
 232. Rajdev L, Lee JW, Libutti SK, Benson AB, Fisher GA Jr, Kunz PL, Hendifar AE, Catalano P, O'Dwyer PJ. A phase II study of sapanisertib (TAK-228) a mTORC1/2 inhibitor in rapalog-resistant advanced pancreatic neuroendocrine tumors (PNET): ECOG-ACRIN EA2161. *Invest New Drugs.* 2022;40(6):1306-1314.
 233. Djukom C, Porro LJ, Mrazek A, Townsend CM Jr, Hellmich MR, Chao C. Dual inhibition of PI3K and mTOR signaling pathways decreases human pancreatic neuroendocrine tumor metastatic progression. *Pancreas.* 2014;43(1):88-92.
 234. Zanini S, Renzi S, Giovino F, Bermano G. mTOR Pathway in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumor (GEP-NETs). *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:562505.
 235. Mpilla GB, Uddin MH, Al-Hallak MN, Aboukameel A, Li Y, Kim SH, Beydoun R, Dyson G, Baloglu E, Senapedis WT, Landesman Y, Wagner KU, Viola NT, El-Rayes BF, Philip PA, Mohammad RM, Azmi AS. PAK4-NAMPT Dual Inhibition Sensitizes Pancreatic Neuroendocrine Tumors to Everolimus. *Mol Cancer Ther.* 2021;20(10):1836-1845.

236. Vandamme T, Beyens M, de Beeck KO, Dogan F, van Koetsveld PM, Pauwels P, Mortier G, Vangestel C, de Herder W, Van Camp G, Peeters M, Hofland LJ. Long-term acquired everolimus resistance in pancreatic neuroendocrine tumours can be overcome with novel PI3K-AKT-mTOR inhibitors. *Br J Cancer*. 2016;114(6):650-658.
237. Bobiński M, Okła K, Łuszczki J, Bednarek W, Wawruszak A, Moreno-Bueno G, Garcia-Sanz P, Dmoszyńska-Graniczka M, Tarkowski R, Kotarski J. Gemcitabine and Selected mTOR Inhibitors in Uterine Sarcomas and Carcinosarcoma Cells- an Isobolographic Analysis. *Int J Med Sci*. 2020;17(18):2987-2997.
238. Rubinstein MM, Hyman DM, Caird I, Won H, Soldan K, Seier K, Iasonos A, Tew WP, O'Cearbhaill RE, Grisham RN, Hensley ML, Troso-Sandoval T, Sabbatini P, Guillen J, Selcuklu SD, Zimel C, Torrisi J, Aghajanian C, Makker V. Phase 2 study of LY3023414 in patients with advanced endometrial cancer harboring activating mutations in the PI3K pathway. *Cancer*. 2020;126(6):1274-1282.
239. Guan B, Wu K, Zeng J, Xu S, Mu L, Gao Y, Wang K, Ma Z, Tian J, Shi Q, Guo P, Wang X, He D, Du Y. Tumor-suppressive microRNA-218 inhibits tumor angiogenesis via targeting the mTOR component RICTOR in prostate cancer. *Oncotarget*. 2017;8(5):8162-8172.
240. Micevic G, Muthusamy V, Damsky W, Theodosakis N, Liu X, Meeth K, Wingrove E, Santhanakrishnan M, Bosenberg M. DNMT3b Modulates Melanoma Growth by Controlling Levels of mTORC2 Component RICTOR. *Cell Rep*. 2016;14(9):2180-2192.
241. Oneyama C, Kito Y, Asai R, Ikeda J, Yoshida T, Okuzaki D, Kokuda R, Kakumoto K, Takayama K, Inoue S, Morii E, Okada M. MiR-424/503-mediated Rictor upregulation promotes tumor progression. *PLoS One*. 2013;8(11):e80300.
242. Uesugi A, Kozaki K, Tsuruta T, Furuta M, Morita K, Imoto I, Omura K, Inazawa J. The tumor suppressive microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT phosphorylation in oral cancer. *Cancer Res*. 2011;71(17):5765-5778.
243. Zheng G, Jia X, Peng C, Deng Y, Yin J, Zhang Z, Li N, Deng M, Liu X, Liu H, Lu M, Wang C, Gu Y, He Z. The miR-491-3p/mTORC2/FOXO1 regulatory loop

- modulates chemo-sensitivity in human tongue cancer. *Oncotarget*. 2015;6(9):6931-6943.
244. Scattone A, Catino A, Schirosi L, Caldarola L, Tommasi S, Lacalamita R, Montagna ES, Galetta D, Serio G, Zito FA, Mangia A. Discordance between FISH, IHC, and NGS Analysis of ALK Status in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): a Brief Report of 7 Cases. *Transl Oncol*. 2019;12(2):389-395.
 245. Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, Slamon DJ. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol*. 2000;18(21):3651-3664.
 246. Dybdal N, Leiberman G, Anderson S, McCune B, Bajamonde A, Cohen RL, Mass RD, Sanders C, Press MF. Determination of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization and concordance with the clinical trials immunohistochemical assay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat*. 2005;93(1):3-11.
 247. Mass RD, Press MF, Anderson S, Cobleigh MA, Vogel CL, Dybdal N, Leiberman G, Slamon DJ. Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Clin Breast Cancer*. 2005;6(3):240-246.
 248. AlShail E, Alahmari AN, Dababo AAM, Alsagob M, Al-Hindi H, Khalil H, Al Masseri Z, AlSalamah R, Almohseny E, Alduhaish A, Colak D, Kaya N. A molecular study of pediatric pilomyxoid and pilocytic astrocytomas: Genome-wide copy number screening, retrospective analysis of clinicopathological features and long-term clinical outcome. *Front Oncol*. 2023;13:1034292.
 249. Lee JH, Kang KW, Lee HW. Expression of phosphorylated mTOR and its clinical significances in small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(3):2987-2993.
 250. Ali G, Boldrini L, Capodanno A, Pelliccioni S, Servadio A, Crisman G, Picchi A, Davini F, Mussi A, Fontanini G. Expression of p-AKT and p-mTOR in a large series of bronchopulmonary neuroendocrine tumors. *Exp Ther Med*. 2011;2(5):787-792.

251. Kern JA, Kim J, Foster DG, Mishra R, Gardner EE, Poirier JT, Rivard C, Yu H, Finigan JH, Dowlati A, Rudin CM, Tan AC. Role of mTOR As an Essential Kinase in SCLC. *J Thorac Oncol.* 2020;15(9):1522-1534.
252. Sivakumar S, Moore JA, Montesion M, Sharaf R, Lin DI, Colón CI, Fleishmann Z, Ebot EM, Newberg JY, Mills JM, Hegde PS, Pan Q, Dowlati A, Frampton GM, Sage J, Lovly CM. Integrative Analysis of a Large Real-World Cohort of Small Cell Lung Cancer Identifies Distinct Genetic Subtypes and Insights into Histologic Transformation. *Cancer Discov.* 2023;13(7):1572-1591.
253. Qi J, Zhang J, Liu N, Zhao L, Xu B. Prognostic Implications of Molecular Subtypes in Primary Small Cell Lung Cancer and Their Correlation With Cancer Immunity. *Front Oncol.* 2022;12:779276.
254. Megyesfalvi Z, Barany N, Lantos A, Valko Z, Pipek O, Lang C, Schwendenwein A, Oberndorfer F, Paku S, Ferencz B, Dezso K, Fillinger J, Lohinai Z, Moldvay J, Galffy G, Szeitz B, Rezeli M, Rivard C, Hirsch FR, Brcic L, Popper H, Kern I, Kovacevic M, Skarda J, Mittak M, Marko-Varga G, Bogos K, Renyi-Vamos F, Hoda MA, Klikovits T, Hoetzenecker K, Schelch K, Laszlo V, Dome B. Expression patterns and prognostic relevance of subtype-specific transcription factors in surgically resected small-cell lung cancer: an international multicenter study. *J Pathol.* 2022;257(5):674-686.
255. Qu S, Fetsch P, Thomas A, Pommier Y, Schrump DS, Miettinen MM, Chen H. Molecular Subtypes of Primary SCLC Tumors and Their Associations With Neuroendocrine and Therapeutic Markers. *J Thorac Oncol.* 2022;17(1):141-153.
256. Sato Y, Okamoto I, Kameyama H, Kudoh S, Saito H, Sanada M, Kudo N, Wakimoto J, Fujino K, Ikematsu Y, Tanaka K, Nishikawa A, Sakaguchi R, Ito T. Integrated Immunohistochemical Study on Small-Cell Carcinoma of the Lung Focusing on Transcription and Co-Transcription Factors. *Diagnostics (Basel).* 2020;10(11):949.
257. Osborne JK, Larsen JE, Shields MD, Gonzales JX, Shames DS, Sato M, Kulkarni A, Wistuba II, Girard L, Minna JD, Cobb MH. NeuroD1 regulates survival and migration of neuroendocrine lung carcinomas via signaling molecules TrkB and NCAM. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(16):6524-6529.

258. Cho HJ, Hong SA, Ryu D, Hong SH, Kim TM. Transcriptional Profiling Reveals Mesenchymal Subtypes of Small Cell Lung Cancer with Activation of the Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Worse Clinical Outcomes. *Cancers (Basel)*. 2022;14(22):5600.
259. Wu Q, Guo J, Liu Y, Zheng Q, Li X, Wu C, Fang D, Chen X, Ma L, Xu P, Xu X, Liao C, Wu M, Shen L, Song H. YAP drives fate conversion and chemoresistance of small cell lung cancer. *Sci Adv*. 2021;7(40):eabg1850.
260. Wang WZ, Shulman A, Amann JM, Carbone DP, Tsihchlis PN. Small cell lung cancer: Subtypes and therapeutic implications. *Semin Cancer Biol*. 2022;86(Pt 2):543-554.
261. Baine MK, Febres-Aldana CA, Chang JC, Jungbluth AA, Sethi S, Antonescu CR, Travis WD, Hsieh MS, Roh MS, Homer RJ, Ladanyi M, Egger JV, Lai WV, Rudin CM, Rekhtman N. POU2F3 in SCLC: Clinicopathologic and Genomic Analysis With a Focus on Its Diagnostic Utility in Neuroendocrine-Low SCLC. *J Thorac Oncol*. 2022;17(9):1109-1121.
262. Yamada Y, Belharazem-Vitacolonna D, Bohnenberger H, Weiß C, Matsui N, Kriegsmann M, Kriegsmann K, Sinn P, Simon-Keller K, Hamilton G, Graeter T, Preissler G, Ott G, Schölch S, Nakajima N, Yoshizawa A, Haga H, Date H, Thomas RK, Petrini I, Giaccone G, Ströbel P, Marx A. Pulmonary cancers across different histotypes share hybrid tuft cell/ionocyte-like molecular features and potentially druggable vulnerabilities. *Cell Death Dis*. 2022;13(11):979.
263. Toker A. Double trouble for cancer gene. *Science*. 2019;366(6466):685-686.
264. Polley E, Kunkel M, Evans D, Silvers T, Delosh R, Laudeman J, Ogle C, Reinhart R, Selby M, Connelly J, Harris E, Fer N, Sonkin D, Kaur G, Monks A, Malik S, Morris J, Teicher BA. Small Cell Lung Cancer Screen of Oncology Drugs, Investigational Agents, and Gene and microRNA Expression. *J Natl Cancer Inst*. 2016;108(10):djw122.
265. Murugan AK. mTOR: Role in cancer, metastasis and drug resistance. *Semin Cancer Biol*. 2019;59:92-111.
266. Peng Y, Wang Y, Zhou C, Mei W, Zeng C. PI3K/Akt/mTOR Pathway and Its Role in Cancer Therapeutics: Are We Making Headway? *Front Oncol*. 2022;12:819128.

267. Sun JM, Kim JR, Do IG, Lee SY, Lee J, Choi YL, Ahn JS, Ahn MJ, Park K. A phase-1b study of everolimus plus paclitaxel in patients with small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2013;109(6):1482-1487.
268. Besse B, Heist RS, Papadimitrakopoulou VA, Camidge DR, Beck JT, Schmid P, Mulatero C, Miller N, Dimitrijevic S, Urva S, Pylvaenaeinen I, Petrovic K, Johnson BE. A phase Ib dose-escalation study of everolimus combined with cisplatin and etoposide as first-line therapy in patients with extensive-stage small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2014;25(2):505-511.
269. Shibata T, Kokubu A, Tsuta K, Hirohashi S. Oncogenic mutation of PIK3CA in small cell lung carcinoma: a potential therapeutic target pathway for chemotherapy-resistant lung cancer. *Cancer Lett*. 2009;283(2):203-211.
270. Zinzalla V, Stracka D, Oppliger W, Hall MN. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell*. 2011;144(5):757-768.

10.SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

10.1. A disszertáció alapját képező saját közlemények

Krencz I, **Sztankovics D**, Dankó T, Sebestyén A, Khoór A. Progression and metastasis of small cell lung carcinoma: the role of the PI3K/Akt/mTOR pathway and metabolic alterations. *Cancer Metastasis Rev.* 2021;40(4):1141-1157. **IF: 9,237**

Sztankovics D, Krencz I, Moldvai D, Dankó T, Nagy Á, Nagy N, Bedics G, Rókusz A, Papp G, Tőkés AM, Pápay J, Sági Z, Dezső K, Bödör C, Sebestyén A. Novel RICTOR amplification harbouring entities: FISH validation of RICTOR amplification in tumour tissue after next-generation sequencing. *Sci Rep.* 2023;13(1):19610. **IF: 3,8**

Szalai F*, **Sztankovics D***, Krencz I, Moldvai D, Pápay J, Sebestyén A, Khoor A. Rictor-A Mediator of Progression and Metastasis in Lung Cancer. *Cancers (Basel).* 2024;16(3):543. (* megosztott első szerzős közlemény) **IF: 4,5**

Sztankovics D, Moldvai D, Petővári G, Dankó T, Szalai F, Miyaura R, Varga V, Nagy N, Papp G, Pápay J, Krencz I, Sebestyén A. mTOR hyperactivity and RICTOR amplification as targets for personalized treatments in malignancies. *Pathol Oncol Res.* 2024;30:1611643. **IF: 2,3**

Sztankovics D, Szalai F, Moldvai D, Dankó T, Nagy N, Pápay J, Khoór A, Krencz I, Sebestyén A. Increased mTOR activity and RICTOR copy number in small cell lung carcinoma progression. *Eur J Cell Biol.* 2024;151468. **IF: 4,5**

10.2. A disszertációtól független saját közlemények

Petővári G, Dankó T, Tőkés AM, Vetlényi E, Krencz I, Raffay R, Hajdu M, **Sztankovics D**, Németh K, Vellai-Takács K, Jeney A, Kulka J, Sebestyén A. In Situ Metabolic Characterisation of Breast Cancer and Its Potential Impact on Therapy. *Cancers (Basel).* 2020;12(9):2492. **IF:6,639**

Vellainé Takács K, **Sztankovics D**, Hoffmann Gy, Kopper L, Gálosi R. A biológiai óra és a daganatok. *Klin Onkol.* 2020;7(2):167-175. **IF:-**

Sebestyén A, Petővári G, Dankó T, **Sztankovics D**, Vetlényi E, Khoor A, Jeney A Krencz I, Pápay J. A tumorszövet metabolikus heterogenitása - anyagcsere-változások vizsgálati lehetőségei és jelentősége a daganatbiológiában. *ORVOSKÉPZÉS.* 2021;96(3):479-493. **IF:-**

Dankó T, Petővári G, **Sztankovics D**, Moldvai D, Raffay R, Lőrincz P, Visnovitz T, Zsiros V, Barna G, Márk Á, Krencz I, Sebestyén A. Rapamycin Plus Doxycycline Combination Affects Growth Arrest and Selective Autophagy-Dependent Cell Death in Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2021;22(15):8019. **IF: 6,208**

Sebestyén A, Dankó T, **Sztankovics D**, Moldvai D, Raffay R, Cervi C, Krencz I, Zsiros V, Jeney A, Petővári G. The role of metabolic ecosystem in cancer progression - metabolic plasticity and mTOR hyperactivity in tumor tissues. *Cancer Metastasis Rev.* 2021;40(4):989-1033. **IF: 9,237**

Moldvai D, Raffay R, Petővári G, Dankó T, **Sztankovics D**, Krencz I, Vetlényi E, Sebestyén A. 3D bionyomtatott szöveti és tumormodellek a daganatkutatásban. *Gyógyszerészet.* 2022;66(6):295-302. **IF:-**

Sebestyén A, Dankó T, **Sztankovics D**, Moldvai D, Krencz I, Raffay R, Petővári G. Extracellular Matrix as a Metabolic Niche in Cancer. In: Kovalszky, I., Franchi, M., Alaniz, L.D. (eds) *The Extracellular Matrix and the Tumor Microenvironment. Biology of Extracellular Matrix.* 2022; vol 11. Springer, Cham. **IF:-**

Dankó T, Petővári G, Raffay R, **Sztankovics D**, Moldvai D, Vetlényi E, Krencz I, Rókus A, Sipos K, Visnovitz T, Pápay J, Sebestyén A. Characterisation of 3D Bioprinted Human Breast Cancer Model for In Vitro Drug and Metabolic Targeting. *Int J Mol Sci.* 2022;23(13):7444. **IF: 5,6**

Krencz I, Vetlényi E, Dankó T, Petővári G, Moldvai D, **Sztankovics D**, Raffay R, Mészáros K, Sebestyén E, Végső G, Pápay J, Sebestyén A. Metabolic Adaptation as Potential Target in Papillary Renal Cell Carcinomas Based on Their In Situ Metabolic Characteristics. *Int J Mol Sci.* 2022;23(18):10587. **IF: 5,6**

Sztankovics D*, Moldvai D*, Petővári G, Gelencsér R, Krencz I, Raffay R, Dankó T, Sebestyén A. 3D bioprinting and the revolution in experimental cancer model systems-A review of developing new models and experiences with in vitro 3D bioprinted breast cancer tissue-mimetic structures. *Pathol Oncol Res.* 2023;29:1610996. (* megosztott első szerzős közlemény) **IF: 2,3**

Szalai F, Krencz I, Moldvai D, Petővári G, Dankó T, Nagy N, Papp G, Pápay J, Sebestyén A, **Sztankovics D**. Az mTOR-hiperaktivitás és a RICTOR amplifikáció jelentősége, és az ezzel összefüggő célzott terápiás lehetőségek rosszindulatú daganatokban. *Magy Onkol.* 2023;67(3):165-180. **IF:-**

Moldvai D, **Sztankovics D**, Dankó T, Szalai F, Miyaura R, Petővári G, Krencz I, Gelencsér R, Sebestyén A. 3D szöveti szerkezet hatása a gyógyszerérzékenységre – 3D bionyomtatott „szövetmodellek” a daganatkutatásban. *Magy Onkol.* 2023;67(3):237-246. **IF:-**

Moldvai D, **Sztankovics D**, Dankó T, Vetlényi E, Petővári G, Márk Á, Patonai A, Végső G, Piros L, Hosszú Á, Pápay J, Krencz I, Sebestyén A. Tumorigenic role of tacrolimus through mTORC1/C2 activation in post-transplant renal cell carcinomas. *Br J Cancer.* 2024;130(7):1119-1130. **IF: 6,4**

Krencz I, **Sztankovics D**, Sebestyén A, Pápay J, Dankó T, Moldvai D, Lutz E, Khoor A. RICTOR amplification is associated with Rictor membrane staining and does not correlate with PD-L1 expression in lung squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2024;30:1611593. **IF: 2,3**

Kocsis D, Dhinakaran S, Pandey D, Laki AJ, Laki M, **Sztankovics D**, Lengyel M, Vrábel J, Naszlady MB, Sebestyén A, Ponmozhi J, Antal I, Erdő F. Fluid Dynamics Optimization of Microfluidic Diffusion Systems for Assessment of Transdermal Drug Delivery: An Experimental and Simulation Study. *Sci. Pharm.* 2024;92:35. **IF: 2,3**

11.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném hálámat kifejezni mindazoknak, akik segítséget és támogatást nyújtottak PhD-munkám során:

Témavezetőmnek, dr. Sebestyén Annának, aki szinte ismeretlenként, bizalommal fogadott be a munkacsoportjába, és az azóta eltelt időben megosztotta velem tudását és szakmai tapasztalatait, példát mutatva a kutatói szemléletével és gondolkodásmódjával. Köszönöm neki, hogy bármikor fordulhattam hozzá kérdéseimmel és azt is, hogy mindvégig támogatott doktori munkámban, előmenetelben.

Külön köszönettel tartozom dr. Krencz Ildikónak, aki a doktori képzésem elején felkarolt és pótolhatatlan segítséget, támogatást, valamint egyéb építő tanácsokat adott, véleményére mindig számíthattam.

Köszönettel tartozom dr. Matolcsy András professzor úrnak és a Doktori Iskola vezetőségének, hogy PhD-munkámat a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben, a Patológia és Onkológia Tagozat Molekuláris és experimentális onkológia programjában végezhettem.

Szeretnék köszönetet mondani a Tumorbiológia Munkacsoport volt és jelenlegi PhD-hallgatóinak és munkatársainak, kiemelten dr. Dankó Titanillának, dr. Petővári Gábornak, dr. Moldvai Dorottyának, Raffay Reginának, dr. Vetlényi Enikőnek, dr. Varga Viktóriának, Risa Miyaurának és dr. Szalai Fatimének, a baráti légkör és motiváló szakmai környezet kialakításáért. Szerencsés vagyok, hogy egy ilyen jó hangulatú, összetartó közösségben dolgozhattam.

Köszönöm a Tumorbiológia Munkacsoport volt és jelenlegi TDK-hallgatóinak, Gelencsér Rebekának, Csikós Bálintnak, Föhrécz Nórának és Varga Izabellának a kísérletekben való lelkes közreműködésüket.

Továbbá köszönöm a Molekuláris Onkohematológia Kutatócsoport vezetőjének, dr. Bödör Csabának, valamint dr. Nagy Noéminek és dr. Nagy Ákosnak, hogy segítették a *RICTOR* ddPCR beállítását intézetünkben. Köszönöm még dr. Zajta Eriknek és Hegyi Lajosnak a rutin diagnosztikai NGS TSO500 tesztek elvégzését, valamint dr. Bedics Gábornak a TSO500 eredmények összegyűjtését és a klinikai adatok megosztását.

Köszönöm dr. Papp Gergőnek és Kapczár Dórának a *RICTOR* FISH-vizsgálatokban nyújtott segítséget. Szakértelmük és precizitásuk példaértékű számomra.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet patológusainak, akik részt vettek a vizsgálatainkba bevont esetek összegyűjtésében és patológiai diagnosztizálásban, kiemelten dr. Sápi Zoltánnak, dr. Pápay Juditnak, dr. Dezső Katalinnak, dr. Rókusz Andrásnak és dr. Scheich Bálintnak. Továbbá a Semmelweis Egyetem Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézetből dr. Tőkés Anna-Máriának.

Az *in vivo* kísérletekben való segítséget szeretném megköszönni a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Állatházában dolgozó munkatársaknak, különösképpen Sztodola Andrásnak.

Külön köszönet illeti a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Biopszia laborjának munkatársait a metszetkészítésben nyújtott technikai segítségükért, valamint a metszetek archiválásáért. Köszönöm Kurucz Csillának, Tamási Annának, Uzseka Ritának és Bertalan Rebekának a segítséget.

Szeretném megköszönni Laczik Ceciliának a Doktori Iskolával kapcsolatos ügyek intézésben való segítségét.

Köszönöm továbbá a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet minden munkatársának, kollégáimnak a sok segítséget és támogatást.

Köszönöm dr. Döme Balásznak, hogy a kissejtes tüdőcarcinoma sejtvonalakat biztosította számunkra, valamint köszönettel tartozunk Bárány Nándornak a sejtenyésztéssel kapcsolatos hasznos tanácsaiért.

Köszönöm dr. Khoór Andrásnak és Tracy Majewicz-nek a tudományos együttműködés kezdeményezését és a *RICTOR*-amplifikációval kapcsolatos vizsgálatokban való segítséget.

Köszönöm dr. Regős Eszternek, hogy elvállalta dolgozatom házi bírálatát, meglátásaival, hasznos tanácsaival segítette munkámat. Köszönöm a dolgozatom hivatalos bírálóinak, is, hogy időt fordítottak a disszertációm áttanulmányozására.

Végezetül köszönöm családomnak, különösképpen a nagyszüleimnek, hogy mindvégig támogattak céljaim elérésében.