

# mTOR (mammalian target of rapamycin) jelátviteli út aktivitás különbségek és azok jelentősége humán vastagbél-daganatokban

Doktori tézisek

**Sticz Tamás Béla**

Semmelweis Egyetem

Patológiai tudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Herszényi László, az MTA doktora, egyetemi docens  
Dr. Butz Henriett, Ph.D., szakorvos

Szigorlati bizottság elnöke:  
Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Kulka Janina, Ph.D., egyetemi tanár  
Dr. Moldvay Judit, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Holub Marianna, Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2017

## **Bevezetés**

### **1. A vastagbél-daganatok klinikai jelentősége, jellegzetességei és kezelése**

A colorectalis carcinomák (CRC) férfiak és nők körében is a harmadik leggyakoribb daganatot jelentik mind előfordulásukat (incidencia), mind a mortalitási adatokat tekintve. Magyarországon az incidencia 59/100.000 Fő 2015-ös adatok szerint. A CRC-ák több, mint 90%-a adenocarcinoma. A CRC-ák kezelése elsősorban sebészi beavatkozást igényel. A sikeres sebészi beavatkozás után a II. és a III. stádiumú CRC-s betegek esetében 25-60%-ban alakul ki recidív tumor, esetleg távoli metastázis. Előbbi esélyét csökkenti a műtét előtti neoadjuváns, illetve a sebészi beavatkozást követő adjuváns kemoterápia és sugárterápia. A jelenlegi standardok szerint a III. stádiumú CRC-s betegek kezelésének az alapja a fluoropyrimidine bázis alapú kemoterapikumok alkalmazása orális vagy intravénás formában, kiegészítve leucovorinnal. Jelenleg a CRC-k adjuváns kezelése a FOLFOX (leucovorine+5-FU+oxaliplatin) vagy FOLFIRI (leucovorine+5-FU+irinotecan) standardok szerint történik. Napjainkban a molekuláris onkológia gyors fejlődésének köszönhetően előtérbe kerültek a biológiai terápia lehetőségei, így vastagbél-daganatok EGFR, ill. VEGF gátlása monoklonális antitest kezeléssel. A CRC-s betegek túlélése nagymértékben függ a diagnosztizált betegség stádiumától. Az 5 éves túlélés ~90% a korai stádiumú betegeknél, 70% a regionális áttétes betegek körében, míg csupán 10% azoknál, akiknél távoli áttétek már megjelentek.

### **2. mTOR jelátviteli útvonal szabályozási zavarainak daganatbiológiai szerepe colon carcinomában**

Az mTOR (mammalian/mechanistic target of rapamycin) egy 289 kDa tömegű szerin-threonin kináz fehérje, ami a jelátviteli hálózaton belül integrálja számos sejtfelszíni receptor útvonalának különböző extracelluláris jeleit és a sejt aktuális állapotát monitorozó szignálok hatásait, így központi szerepet játszik a sejtek

növekedésének, proliferációjának, túlélésének és anyagcseréjének szabályozásában. A PI3K/Akt/mTOR útvonal szabályozási zavara a legkülönbözőbb folyamatokban (pl. tumorképződés, angiogenezis, inzulin rezisztencia, zsírsav szintézis vagy immunsejtek aktivációja) és számos betegség esetében ismert.

Az mTOR két különböző multiprotein formában fordul elő a sejtben. A két komplexnek strukturális felépítése és funkciója is különböző. Az mTOR komplex 1 (mTORC1) alkotó fehérjéi az mTOR kináz, az mLST8, a Raptor, a PRAS40 és a Deptor. Az mTOR komplex 2 (mTORC2) a következő proteinekből áll: mTOR kináz, Rictor, mSin1, Protor1/2, mLST8, Deptor. Az mTORC1 két legfontosabb célmolekulája a 4E-kötő fehérje (4EBP1) és az S6 kinázok, a p70S6K – S6K1 és a p90S6K - S6K2 izoformák. A proteinszintézis szabályozásában az mTORC1-nek kulcsszerepe van, ezen kívül jólismert az mTORC1 autofágiát gátló hatása is. Az mTORC1 az anyagcserével kapcsolatos egyéb fontos celluláris folyamatok szabályozásában is részt vesz, így pl. fokozza a hypoxia indukálható faktor (HIF1 $\alpha$ ) transzkripcióját. Más transzkripcós faktorok termelésén keresztül a lipid metabolizmus és a pirimidinek szintézisének pozitív szabályozásában is fontos tényező. Az mTORC2 egyik legfontosabb targetje az AGC kinázok közül az Akt. Az mTORC2 az aktin citoskeleton szerkezeti módosításán keresztül részt vesz a sejtmigráció szabályozásában is.

Az 1970-es évek végén fedezték fel a rapamycint, az első mTOR gátlót, amiről később kimutatták, hogy immunszuppresszív és antiproliferatív hatású. Jelenleg széles körben használják a rapamycin származékait, az un. „rapalog”-okat a gyógyászatban. A temsirolimust 2007 óta az EU-ban engedélyezték a vesesejtes vesekarcinómák terápiájában, jelenleg már elsővonalbeli kezelésként is alkalmazhatják rossz prognózisú betegeknél. Az everolimust alkalmazását 2009-ben engedélyezték olyan előrehaladott veserákokban, ahol VEGF-gátló kezelés mellett vagy az után recidív tumor alakult ki. Ezenkívül használják még neuroendokrin

pancreas tumorokban, illetve a tüdő daganataiban és a szívtranszplantációban is. A kardiológiai gyakorlatban használatosak az everolimust kibocsátó stentek is.

A rapalogókkal ellentétben, amelyek allosterikusan gátolják az mTOR kináz funkciót, az ATP-kompetitív inhibitorok az ATP kötődést blokkolják és így mindkét mTOR komplex aktivitását gátolhatják (pl. PP242 inhibitor). Az mTOR és a PI3K hasonló szekvenciája miatt bizonyos kompetitív inhibitorok gátolhatják a PI3K-t vagy az Akt-ot is ugyanúgy, mint az mTOR-t. Ezek a gátlószerek, ún. duál inhibitorok általánosan csökkentik az útvonal aktivitását a PI3K-Akt-mTOR jelátviteli hálózati tengelyben, és csökkentik a visszacsatolások következtében megmaradó vagy fokozódó aktivitásokat is (Akt vagy mTORC2 aktivitások). Az NVP-BEZ235 és a PF-04691502 egyaránt duál PI3K-mTOR inhibitorok, melyek antiproliferatív hatását igazolták in vitro és in vivo, a jelátvitel egyéb hatásainak gátlása mellett.

A PI3K/AKT/mTOR útvonal kóros aktiválódása a colon carcinomák kialakulásában és progressziójában, valamint gyógyszerrezisztenciájában is fontos szerepet játszik, ezért felmerült itt is az mTOR gátlás lehetősége. A klinikai vizsgálatok eddigi eredményei arra utalnak, hogy az mTOR gátló kezelés némi előnyt jelenthet a CRC-s betegek számára. Everrolimus fázis II. vizsgálatban 25% -os objektív válaszarány mellett 5,9 hónappal hosszabb átlagos túlélést értek el.

## **Célkitűzések**

Az mTOR jelút aktivitás változásai hozzájárulnak a legkülönbözőbb daganatsejtek proliferációjához és túléléséhez. Munkámban az mTOR aktivitás változásokat, az mTORC1 és mTORC2 komplex aktivitás változásokkal összefüggő marker fehérjék mennyiségét vizsgáltam colon carcinomák klinikai mintáiban, illetve in vitro modellekben, az alábbi célokkal:

### **I. 1. Humán klinikai colon carcinoma szövetmintákban:**

- Az mTOR aktivitással összefüggő fehérjék expressziójának in situ vizsgálata immunhisztokémiai módszerekkel;
- Az expressziós adatok és a betegek klinikai, túlélési adatai közötti összefüggések statisztikai elemzése.

### **I. 2. Humán colon carcinoma sejtvonalakban:**

- Az mTOR aktivitásának jellemzése;
- Az EGFR és mTOR inhibitor érzékenység, valamint az mTOR inhibitor kombinációs kezelések hatásának in vitro vizsgálata.

## **Módszerek**

### **3.1.1. Humán biopsziás minták mTOR aktivitás vizsgálata**

103 colon carcinomás beteg szövettani biopsziás mintáját vizsgáltam. A betegek (50 nő és 53 férfi) műtét után 5-FU és oxaliplatin komplex kezelésben részesültek. Az betegek átlag életkora 62 év (median 63 év), 34 és 78 év között. A betegek klinikai adatainak vizsgálatakor a minimális betegkövetési idő 5 év, a túlélési adatok elemzésékor 10 év volt, 77 hónap median túlélés mellett. 72 esetben a tumorok a colonban, 31 esetben a rektumban jelentek meg. Dukes klasszifikáció szerint az esetek megoszlása a következő - 30 esetben Dukes B2, 8 esetben Dukes C1, 56 esetben Dukes C2 és 9 betegnél Dukes D stádium. A nemzetközi TNM (International Union Against Cancer) csoportosítás szerint 36 beteget a II stádiumba, 60 beteget a III stádiumba és 7 beteget IV stádiumba soroltunk.

Az mTOR aktivitás szöveti szintű (in situ) meghatározásakor a jelátviteli fehérjék és foszfoproteinek mennyiségét a normál szöveti szintekhez viszonyítottuk. Szöveti multiblokk („tissue microarray” – TMA) metszeteken immunhisztokémiai reakciókat (mTOR, p-mTOR, Raptor, Rictor, p-S6, p-4EBP1, p-AMPK) végeztünk. Az immunreakciókat TBST és PBS pufferes mosások közbeiktatásával Novolink (Novocastra) kittel detektáltuk, majd az peroxidáz aktivitást diaminobenzidin (DAB) kromogén és hidrogénperoxid szubsztrát jelenlétében tettük láthatóvá, végül a sejtmagokat hematoxylinnel festettük meg. Az immunreakciók értékelését 3 független személy végezte (2 patológus + disszertáció szerzője egy patológus segítségével) előre meghatározott elvek alapján. Eltérés esetén a egy harmadik patológussal konzultálva alakítottuk ki a végleges, konszenzus értékeket. Az intenzitás alapján négy kategóriát határoztunk meg (negatív, 1+ (gyengén)/ 2+ (közepesen)/ 3+ (erősen) pozitív). Pozitívnak tekintettük a reakciót, ha a tumor sejtek legalább 10%-a mutatta a meghatározott erősségű reakciót az adott mTOR jelúthoz vagy annak aktivitásához kapcsolódó antitesttel. Ha a p-mTOR IHC 2+

vagy 3+ erősségű volt, akkor az esetet magas mTOR aktivitásúnak értékeltük. Ha az adott esetben az p-mTOR értékelés negatív volt vagy csupán gyenge (1+) reakciót adott, akkor az esetet alacsony mTOR aktivitásúnak ítéltük. A két komplex mennyiségére utaló Raptor és Rictor festések esetében Rictor/Raptor dominanciát az immunfestés intenzitás alapján állapítottuk meg. Ahhoz, hogy Rictor vagy Raptor mennyiségét dominánsnak határozzuk meg legalább egy kereszt intenzitásbeli különbséget kellett valamennyi értékelőnek megadnia. A TMA értékeléséhez 3DHistech Panoramic Viewer Programot és a Nikon E200 mikroszkópot használtuk.

### **3.1.2. Statisztika**

A túlélési adatok és az mTOR aktivitás különbségek összefüggését Kaplan-Meier módszerrel vizsgáltuk, a számoláshoz a PAST ingyenes software-t használtuk. (<http://folk.uio.no>). Multivariancia analízist is végeztünk a különböző faktorokat Cox regressziós modellel, az SPSS program csomag alkalmazásával (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA). A csoportok közötti különbségeket  $\chi^2$  próba és Pearson-féle teszt segítségével is megvizsgáltuk. Statisztikailag szignifikáns különbségnek a  $p < 0.05$ -t tekintettük.

## **3.2. *In vitro* vizsgálatok humán colon carcinoma sejtvonalakkal**

### **3.2.1. *In vitro* sejtvonalak és *in vitro* kezelések**

A vizsgálatunkhoz eltérő genetikai háttérrel (mutációs profillal) rendelkező humán colon carcinoma sejtvonalakat (SW620, SW480, HCT116, RKO, Colo205, GC3, CaCo2, HT29) választottunk.

A sejtek terápiás érzékenységét 24-72 órás kezelésekben vizsgáltuk, cetuximab, gefitinib, cisplatin, rapamycin, PP242 (ATP-kompetitív inhibitor, gátolja az mTOR kinase aktivitását az mTORC1 és az mTORC2 komplexben is), NVP-BEZ235 (dual ATP-kompetitív PI3K és mTOR inhibitor) kezeléseket végezve. A rapamycin kezelést bomlása miatt naponta ismételtük.

### **3.2.2. A proliferáció és apoptózis vizsgálatok *in vitro***

A sejtek proliferációs változásait kezelések hatására a sejtszám változás meghatározása mellett Alamar Blue proliferációs teszttel is vizsgáltuk. Az apoptózis mérésére áramlási citometriát alkalmaztunk. Az így kapott eredményeket Winlist software-el (Verity Software House) értékeltük. Apoptotikusnak tekintettük az alacsony DNS tartalmú, úgynevezett szubG1 sejteket.

### **3.2.3. Fehérjék expresszió vizsgálata – Immuncitokémia, Western blot, és Duolink festés**

Az *in vitro* sejtvonalak mTOR aktivitásának jellemzéséhez a fehérjék mennyiségének vizsgálatát többféle módszerrel végeztük. A humán biopsziás mintákhoz hasonló immunfestéseket végeztünk a sejtvonalak sejtjeiből készített cytospin lemezeken.

Egyes kezelt és kezeletlen sejtvonalakon a fehérjeszintek kvantitatív összehasonlítását Western blot módszerrel is elvégeztük.

Duolink festést - fehérje-fehérje komplexek és fehérjemódosulások kvantitatív kimutatására alkalmas technika - használtunk a foszforilált S6 fehérje illetve az mTOR-Rictor fehérje komplex detektálására és mennyiségének meghatározására bizonyos sejtvonalak esetében.

### **3.2.4. *In vitro* vizsgálatok statisztikai értékelése**

Az adott kezelések után a proliferációs változások átlagértékeiket és az SD értékeket minimum három független párhuzamosból, és lehetőség szerint három vagy több párhuzamos kísérletből számoltuk, a használt vizsgálati módszerektől függően. A Student's t-test és az egyirányú variancia analízist (ANOVA) használtunk. A  $p \leq 0,05$  értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.



## Eredmények

### 4.1. Humán colon carcinoma biopsziás minták mTOR aktivitás vizsgálata

103 biopsziás minta TMA metszetein készült mTOR, p-mTOR, p-S6, p-4EBP1, p-AMPK, Rictor és Raptor immunhisztokémiai reakció, melyek független értékeléseit összegeztük. A p-mTOR festések 76 esetben (73,8%) magas mTOR (++ vagy +++ pozitivitás) aktivitást mutattak.

A 4EBP-1 és a p70S6K jól ismert mTOR kináz target molekulák, a fehérjék foszforilációja az mTORC1 komplex aktivitásának jele. A legérzékenyebb és legmegbízhatóbb mTOR, mTORC1 aktivitás markernek azonban a legtöbb vizsgálatban a p70S6K targetjének, a riboszómális S6 fehérje foszforilált formájának megjelenését (p-S6), immunhisztokémiai vizsgálattal kimutatható p-S6 pozitivitást tartják a legkülönbözőbb humán szövetekben és biopsziás mintákban végzett vizsgálatok alapján. A p-S6, p-4EBP1 és a p-mTOR panel immunhisztokémiai értékeit minden esetben együttesen vizsgáltuk. Összességében a 76 intenzív p-mTOR expressziót mutató, magas mTOR aktivitásúnak értékelt esetből 74 esetben találtunk 2+/3+ pozitivitással értékelt p-S6 festődést és ehhez hasonló eredményeket mutatott a p-4EBP1 immunhisztokémiai reakció értékelése is. Három olyan magas mTOR aktivitást mutató eset volt, amelyekben p-4EBP1 negatív festést tapasztaltunk, ennek ellenére az esetekben a p-S6 és p-mTOR festések 2+/3+ értékelést kaptak az összes patológus elemzésében. Két olyan eset volt a p-mTOR festés alapján magas mTOR aktivitásúnak értékelt esetek között, amelyekben sem az S6, sem a 4EBP1 fehérje foszforilált formáit nem tudtuk kimutatni. Az alacsony mTOR aktivitású esetekben (27/103 eset) (26,2%), az egymással jó korrelációt mutató p-S6 és a p-mTOR immunreakciók negatív vagy + értékelése is egyértelműen alacsony mTOR aktivitásra utalt.

Az AMPK negatívan befolyásolja az mTOR aktivitást, amit az immunhisztokémiai vizsgálataink eredményei is alátámasztottak; az összes alacsony mTOR aktivitású

esetben kimutatható volt a p-AMPK pozitivitás (a kináz aktív formája), míg a magas mTOR aktivitásúnak értékelt esetekben p-AMPK pozitivitást csak egy esetben tudtuk kimutatni.

Az mTOR kináz és az mTORC1 komplex aktivitását jellemző fehérjék mellett a két komplexben karakterisztikusan megjelenő – a Raptor-mTORC1 és Rictor-mTORC2 – fehérjék expresszióját is tanulmányoztuk immunhisztokémiával. A párhuzamos Raptor és Rictor festések alapján a vizsgált mintákat 3 csoportra tudtuk osztani: a. Rictor domináns expressziót mutató tumor sejtek – azok, amelyeknél a Raptor fehérje alig volt kimutatható (nagyon gyenge Raptor festés) és lényegesen intenzívebb Rictor festést tapasztaltunk (n=51, 49,5%); b. Raptor domináns expressziót mutató tumor sejtek - azok az esetek, amelyek tumor sejtjeiben Rictor nem vagy alacsony expressziót mutatott (n=14, 13,6%) és mellette jellegzetes Raptor festődést tapasztaltunk; c. Kiegyensúlyozott Rictor és Raptor expressziót mutató tumorsejtek - amelyekben hasonló intenzitású Rictor és Raptor festődést, fehérje expressziót detektáltunk (n=38, 36,9%). Abban a két esetben, ahol magas p-mTOR expressziót figyeltünk meg az mTORC1 aktivitásra jellemző markerek expressziójának hiányában (alacsony p-S6 és nem kimutatható p-4EBP1), egyértelmű mTORC2 komplexre jellemző Rictor dominancia volt megfigyelhető. A magas mTOR aktivitású 76 esetből 39 mutatott Rictor dominanciát, 8 volt Raptor domináns, míg összesen 29 esetben figyeltünk meg hasonló szintű Rictort és Raptort expressziót.

Statisztikai módszerekkel a magas vagy alacsony mTOR aktivitás, a két komplex mennyiségének különbségei és a betegek neme, életkora vagy a diagnóziskor megadható stádiuma (Dukes) között szignifikáns összefüggéseket nem tudunk kimutatni. A betegek túlélési esélyei viszont szignifikáns összefüggést mutattak az alacsony mTOR aktivitással. Az alacsony mTOR aktivitású biopsziás mintákhoz tartozó betegcsoportban az 5 éves túlélés 77,8% volt (overall survival = OVS), míg a magas mTOR aktivitású csoportban, szignifikánsan rosszabb, 46,1%. A legjobb

túlélési adatokat abban a betegcsoportban figyeltük meg, ahol az alacsony mTOR aktivitás mellett domináns Raptor expressziót, tehát alacsony mTORC1 aktivitást mutattunk ki. Ebben a csoportban mindenki a diagnózis után a kezelést követően 5 évnél hosszabb ideig élt. A két lényegesen rosszabb prognózisú csoportban - magas mTOR aktivitású és Rictort dominánsan expresszáló illetve a magas mTOR aktivitású dominanciát nem mutató csoport között - számottevő különbséget az 5 éves túlélési adatokban (5 éves OVS 41%, 48,3%) nem tudtunk kimutatni. Előbbiek alapján a túlélési eredmények azoknak a betegeknek az esetében a legrosszabbak, akik biopsziás mintáiban magas mTOR aktivitás mellett Rictort is nagy mennyiségben expresszáltak, tehát a mintákban magas mTORC2 aktivitású tumorsejtek találhatóak. A magas mTOR aktivitású, Raptort dominánsan expresszáló csoport túlélési adatai szignifikánsan jobbak voltak, mint más magas mTORC2 komplex expressziót mutató tumoros eseteké. Ezeknek a betegeknek az 5 éves túlélése csak az alacsony mTOR aktivitású és mTORC2 komplex domináns expressziót nem mutató esetekénél volt rosszabb (5 éves OVS 62,5%).

Megvizsgáltuk a túlélési adatokat csak az mTOR komplexek mennyiségét mutató Raptor és Rictor expresszióval összefüggésben is. A Rictor expresszió, még az mTOR aktivitás (p-mTOR festés értékelése) értékektől függetlenül is mutatott összefüggést a betegség progressziójával. A legrosszabb túlélési adatokat (5 éves túlélés 49,5%) a Rictort dominánsan kifejező tumorsejtek jelenlétével jellemezhető szövetmintákhoz tartozó betegcsoportban tapasztaltunk abban az esetben, ha csak három csoportot hasonlítottunk össze (Raptor domináns, Rictor domináns és kiegyensúlyozott komplex expresszió).

Az adatok alapján elkészített Kaplan-Meier görbék is jól mutatják a tumorszövetben jellemző magas mTOR aktivitás és a hozzá kapcsolódó magas Rictor expresszió (Rictor domináns expresszió vagy kiegyensúlyozott Rictor és Raptor expresszió) esetében az mTORC2 komplex aktivitás és rövidebb túlélési idő közötti korrelációt. Cox regressziós analízis (figyelembe véve olyan változókat, mint az életkor, nem,

stádium) szignifikancia adatai igazolták, hogy a magas mTOR aktivitás és a magas Rictor expresszió (domináns vagy kiegyensúlyozott Rictor expresszió) független és a Dukes stádium meghatározásnál erősebb rizikó faktorok, jelezhetik a rossz prognózist. A kimutatott magas mTOR aktivitás vagy Rictor expresszió a többi faktortól függetlenül emelte a relatív kockázatát a rövidebb túlélésnek, rossz prognózisnak.

## **4.2. Humán colon carcinoma sejtvonalak *in vitro* vizsgálatának eredményei**

### **4.2.1. EGFR inhibitor rezisztencia kimutatása**

Intézetünk sejtvonall bankjában elérhető colon carcinoma sejtvonalak jellegzetes mutációinak (mKRAS – SW620, SW480, HCT116, mBRAF – RKO, Colo205, HT29; mPI3KCA – HCT116, RKO, HT29, mP53 – CaCo2, HT29, SW480, SW620, GC3) ismeretében feltételeztük, hogy ezek a sejtek sokféle kezeléssel, így EGFR gátlókkal szemben is rezisztensek lehetnek. *In vitro* kísérleteinkben sem a gefitinib, sem a cetuximab – más EGFR gátló szenzitív sejtek esetében hatásos dózisa - nem gátolta a proliferációt vagy indukált apoptózist 72 h-ás inkubációt követően a vizsgált sejtvonalakban. A nagy dózisu gefitinib-kezelés – amely során már a nem specifikus kináz gátló hatások is érvényesülnek – azonban szinte minden sejtvonallban szignifikáns proliferáció gátló hatást és bizonyos sejtekben, például HT29 és GC3 esetében az apoptotikus sejtek arányának emelkedését mutatta. Legtöbbször azonban, az RKO sejtvonallhoz hasonlóan, a nagy dózisu gefitinib kezelésnek is csak proliferáció gátló hatása volt *in vitro*.

### **4.2.2. Colon carcinoma sejtvonalak *in vitro* rapamycin érzékenysége és mTOR aktivitása**

Fehérje expressziós vizsgálataink a humán colon carcinoma sejtvonalakban az *in situ* biopsziás mintákban kapott eredményeinkhez hasonlóan a vastagbél daganat sejtek magas mTOR aktivitását mutatták Western blot, immuncitokémia és Duolink

módszerekkel is. A sejtvonalak egyedi expressziós különbségeket mutattak a Rictor és a Raptor mennyiségében és ennek megfelelően az mTORC2 komplex expresszió jellemzését, illetve az mTORC1 aktivitást jellemző Duolink festésekben is.

Az mTOR aktivitással összefüggő fehérjék expressziója - az aktív mTOR-kináz (p-mTOR), az mTORC1 és C2 komplex jellegzetes Raptor vagy Rictor fehérjéje, az mTORC1 komplex aktivitással összefüggő p-p70S6K és a p-p70S6K célfehérjének, a foszforilált riboszomális S6 (p-S6 ) fehérjék – összefüggést mutatott a sejtek mTOR inhibitor érzékenységével. Az érzékenység különbségeket 72 órás rapamycin, és az mTORC1 és C2 komplexet is gátló PP242, valamint duál mTOR inhibitor (NVP-BEZ25) kezelésekkel igazoltuk. Megfigyeltük, hogy a Rictort nagy mennyiségben termelő (immuncitokémiával +++) sejtek, így a GC3, HCT116 és HT29, kevésbé érzékenyek az mTORC1 inhibitor kezelésre. Míg az alacsony Rictor (mTORC2 komplexre jellemző) expressziót mutató colon carcinoma sejtekben, a C1 és C2 komplexet is gátló szerek mellett a rapamycin is szignifikánsan gátolta a proliferációt az *in vitro* kísérletekben. A Rictor expressziót nem vagy alig mutató sejtekben, pl. az mTOR gátlókkal szemben legérzékenyebb RKO sejtekben a dual inhibitor és C1-C2 komplex gátló kezelések a rapamycin kezelésnél hatásosabbnak bizonyultak. Az RKO sejtekben az mTORC1 aktivitás markerének is tekintett p-S6 fehérje mennyisége rapamycin és NVP-BEZ235 kezelés hatására már 24h alatt lecsökkent, míg a kevésbé érzékeny HT29 sejtekben 72 órás NVP-BEZ235 kezelés tudta csak szignifikánsan csökkenteni a p-S6 mennyiségét. A p-S6 fehérje mennyiségét a rapamycin és az NVP-BEZ235 is csökkentette, míg az mTORC2 komplex Rictor fehérje mennyiségét szignifikánsan csak a dual inhibitor NVP-BEZ235 csökkentette.

#### **4.2.3. mTOR inhibitor kombinált kezelés hatása humán colon carcinoma sejtekre *in vitro***

A rezisztencia egyre több célzott kezelés, így az EGFR inhibitorok (EGFRI) esetében is klinikai problémát jelent. Ezért EGFRI rezisztens colon carcinoma sejtvonalakban vizsgáltuk az EGFRI és rapamycin, illetve más mTOR inhibitor kombinációk in vitro proliferáció gátló hatásait, a kombinációs kezelések lehetséges szenzitizáló hatását. Kimutattuk, hogy a rapamycin és más mTOR inhibitorok (pl. NVP-BEZ235 és a PP242), valamint EGFR inhibitor kombinációk hatásos tumornövekedés gátlók lehetnek a legrezisztensebb vastagbél tumorsejtekben (GC3, HCT116 és HT29). Megfigyeltük azt is, hogy a proliferáció gátló hatás az mTOR inhibitor érzékeny sejtvonalakban szignifikánsan már nem fokozható az mTOR és az EGFR gátló kombinációval a rapamycin kezelés hatásaihoz képest.

Végül teszteltük, hogy az mTOR inhibitor kezelés segítheti-e más, a colon carcinomák terápiájában alkalmazott kezelés hatékonyságát. Ezért az mTOR gátló rapamycin, illetve NVP-BEZ235 és a ciszplatin kombinációk hatásait vizsgáltuk in vitro három, eltérő mTORI érzékenységgű EGFRI rezisztens colon carcinoma sejtvonalban. Eredményeink: a) megfigyeltünk ciszplatin érzékenység különbségeket a sejtvonalak között, az RKO sejtek rezisztensnek bizonyultak; b) az mTOR gátló kezelés - legjelentősebben (önmagában is szignifikánsan) a dual inhibitor NVP-BEZ235 - csökkentette a ciszplatin és EGFR inhibitor rezisztens RKO sejtek proliferációját; c) a duál mTOR inhibitor kezelés szignifikánsan fokozza a ciszplatin anti-proliferatív hatásait az mTOR inhibitor kezeléssel szemben kevésbé érzékeny, EGFR inhibitor rezisztens colon carcinoma sejtek in vitro tenyésztéseiben (HT29 and SW620) is.

## Következtetések

### I. Az mTOR jelút elemeinek vizsgálatával nyert új megfigyelések colorectális carcinoma klinikai mintáiban:

- A Dukes stádiumtól és a gradingtől függetlenül jellemző a magas mTOR aktivitás.
- A p-S6 expresszió az egyik legalkalmasabb marker, amellyel az mTORC1 aktivitását, vagy akár az mTOR kináz aktivitását meghatározhatjuk formalinban fixált, paraffinos mintákban, ha a p-mTOR, vagy más direkt target fehérjék kimutathatósága megkérdőjelezhető.
- A vizsgált colon carcinomák 2/3-ában mTORC2 komplexhez köthető a magas mTOR aktivitás.
- Az általunk kidolgozott immunhisztokémiai panel, ahol az p-mTOR kimutatása kiegészül a p-S6, p-4EBP1, Rictor és Raptor expresszió vizsgálatával, alkalmas az mTOR aktivitás in situ jellemzésére colon carcinoma szöveti metszeteiben.
- A magas mTOR aktivitás Rictor túlsúllyal (mTORC2 komplex aktivitás) szignifikáns pozitív korrelációt mutat a colon carcinomák kedvezőtlen prognózisával (mindkét paraméter független prognosztikus faktor), míg az mTORC1 komplexhez köthető alacsony mTOR aktivitás kedvezőbb kimenetellel, akár a gyógyulás esélyével járhat.

## **II. Humán colon carcinoma sejtvonalak in vitro vizsgálatával kapcsolatos új megfigyelések:**

- A duál (mTOR és PI3K) inhibitorok, illetve az mTORC1 és C2 kettős inhibitor monoterápia hatásos proliferáció-, és tumornövekedés gátló kezelésnek bizonyultak a legtöbb vizsgált EGFR rezisztens colon carcinoma sejtvonalba.
- Több tumorsejt modellben megerősítettük, hogy a vastagbél daganatok kezelésében az mTOR inhibitor kombinációk hasznosak lehetnek EGFR gátló, és akár a platina alapú, hagyományos terápia támogatásában is.



## **Saját Publikációk jegyzéke**

### **A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények**

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

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

J Clin Pathol. 2017; 70(5): 410–416. doi:10.1136/jclinpath-2016-203913

**IF: 2,687**

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

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

Mod Pathol. 2012, 25(12): 1623-1628. doi: 10.1038/modpathol.2012.141

**IF: 5,253**

Tamás Sticz\*, Anna Molnár\*, Titanilla Dankó, Zoltán Hujber, Noémi Nagy, Gyula Végső, László Kopper, Anna Sebestyén \*equal contribution

The effects of different mTOR inhibitors in EGFR inhibitor resistant colon carcinoma cells

- benyújtott közlemény, elbírálás alatt a Pathol Oncol Res. c. folyóirat

### **A disszertációtól független saját közlemények**

Karolina Nemes, Anna Sebestyén, Ágnes Márk, Melinda Hajdu, István Kenessey, Tamas Sticz, Eszter Nagy, Gábor Barna, Zsófia Váradi, Gábor Kovács, László Kopper, Mónika Csóka

Mammalian target of rapamycin (mTOR) activity dependent phospho-protein expression in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL).

Plos One. 2013; 8(4): e59335. doi: 10.1371/journal.pone.0059335 **IF: 3,534**

Ágnes Márk, Melinda Hajdu, Zsófia Váradi, Tamás Béla Sticz, Noémi Nagy, Judit Csomor, Lajos Berczi, Viktória Varga, Mónika Csóka, László Kopper, Anna Sebestyén

Characteristic mTOR activity in Hodgkin- lymphomas offers a potential therapeutic target in high risk disease – a combined tissue microarray, in vitro and in vivo study.

BMC Cancer. 2013,13: 250. doi: 10.1186/1471- 2407-13-250. **IF: 3,319**

Tímea Pócza, Anna Sebestyén, Eszter Turányi, Tibor Krenács, Ágnes Márk, Tamás Béla Sticz, Zsuzsanna Jakab, Péter Hauser

mTOR pathway as a potential target in a subset of human medulloblastoma.

Pathol Oncol Res. 2014; 20: 893-900. doi: 10.1007/s12253-014-9771-0.

**IF: 1,855**