

mTOR (mammalian target of rapamycin) aktivitás, mint hemato-onkológiai terápiás célpont

Készítette:

Nagy Noémi

II. éves biológus (Msc) hallgató

ELTE-TTK

Témavezető:

Dr. Sebestyén Anna



Semmelweis Egyetem

I. sz. Patológia és Kísérleti Rákkutató Intézet

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Budapest, 2013

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉS JEGYZÉK	3
ÖSSZEFOGLALÓ.....	4
BEVEZETÉS.....	5
mTOR FEHÉRJE.....	5
mTOR JELÁTVITELI ÚTVONAL	6
mTOR ÚTVONAL SZEREPE DAGANATOKBAN.....	8
CÉLKITŰZÉSEK	10
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	11
SEJTKULTÚRÁK.....	11
SEJTMORFOLÓGIA, SEJTCIKLUS ÉS APOPTÓZIS VIZSGÁLAT	12
WESTERN BLOT.....	13
IMMUNHISZTOKÉMIA (IHC).....	13
DUOLINK®	14
ÁLLATKÍSÉRLETEK	15
STATISZTIKAI ANALÍZIS:	16
EREDMÉNYEK	17
IN VITRO ÉS IN VIVO KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK	17
HUMÁN SZÖVETEKEN VÉGZETT EXPRESSZIÓ VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI	24
KÖVETKEZTETÉS	28
IRODALOMJEGYZÉK.....	31
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS:	35
HALGATÓI NYILATKOZAT	36

Rövidítés jegyzék

4E-BP1: Eukarióta iniciációs faktor 4-et kötő fehérje
ATP: Adenozin-trifoszfát
DEPTOR: DEP-domént tartalmazó mTOR interakciós fehérje
DLBCL: Diffúz nagy B-sejtes lymphoma
DNS: Deoxiribonukleinsav
FACS: Flow cytometer
FAT: FRAP-ATM-TRRAP domén
FATC: FAT C-terminus domén
FKBP12: FK506 kötő fehérje, 12 kDa
FoxO1/3: Forkhead Box Protein O1/3
FRB: FKBP12-rapamycin kötő domén
GβL: G protein beta subunit-like
HEAT: Huntingtin, EF3, a subunit of PP2A and TOR
HL: Hodgkin lymphoma
HRP: Tormaperoxidáz
IHC: Immunhisztokémia
IRS: Inzulin receptor szubsztrát
MCL: Köpenysejtes lymphoma
mSIN1: Mammalian stress-activated protein kinase interacting protein
mTOR: Mammalian target of rapamycin
mTORC1/2: Mammalian target of rapamycin komplex 1/2
mTORI: mTOR inhibitor
NHL: Non-Hodgkin Lymphoma
PDK: Protein-dependens kináz
PI3K: Foszfátidilinozitol 3 kináz
PIP2: Foszfátidilinozitol (4,5)-biszfoszfát
PIP3: Foszfátidilinozitol (3,4,5)-trifoszfát
PKCα: Protein kináz C alfa
PRAS40: Prolinerich AKT substrate 40 kDa
Protor-1: Protein observed with Rictor-1
pS6: Foszforilált riboszomális S6 fehérje
PTEN: Foszfátáz és tenzin homológ
Raptor: Regulatory associated protein of mTOR
RCC: Világossejtes vese carcinoma
RD: Represszor domén
RHEB: Ras homolog enriched in brain
Rictor: Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RNS: Ribonukleinsav
S6K: S6-kináz
SDS: Szódium dodecil szulfát
TMA: Tissue microarray
TSC1/2: Sclerosis tuberosa complex 1/2

Összefoglaló

Az mTOR kináz jelátviteli hálózatok központi elemeként fontos szerepet játszik a sejtek, így a lymphoid sejtek proliferációjának, túlélésének szabályozásában. Gátlószereit alkalmazzák az immunszuppresszióban és célzott terápia részeként, daganatokban is vizsgálják hatását. Az mTOR aktivitás és az inhibitoraival (mTORI) szembeni érzékenység tumortípusonként változó, lymphomákban eddig még kevésbé jellemzett.

A rapamycin és a jelenleg alkalmazott terápiás szerek hatásait vizsgáltuk lymphoma sejtekben in vitro és in vivo. Cytospin készítmények és paraffinos metszetek, áramlási citométer, western blot, és immunhisztokémia segítségével vizsgáltuk a proliferációt, apoptózist és az mTOR útvonal aktivitását jellemző fehérjék mennyiségét. Két lymphomatípus betegeinek biopsziás anyagain az mTOR aktivitás részletes jellemzését is elvégeztük tissue microarray segítségével.

Kimutattuk a rapamycin proliferáció-, tumornövekedésgátló, hosszútávon apoptózist indukáló és kemoterápiás szerek hatását fokozó tulajdonságát Hodgkin és Diffúz nagy B-sejtes lymphoma sejtvonalakban, xenograftokban. Az mTOR aktivitás és az mTORC1/C2 komplexek megjelenése a vizsgált humán tumorokban egyedi eltéréseket mutatott, ami oka lehet a jelenlegi mTORI-kal szembeni rezisztenciának. Vizsgálataink felhívják a figyelmet arra, hogy az mTOR aktivitás mellett a tumorok mTORC1 és C2 komplex arányának meghatározása is fontos a megfelelő mTORC1 vagy a fejlesztés alatt álló dual inhibitorok terápiás felhasználásakor.

Bevezetés

mTOR fehérje

Az mTOR (mammalian target of rapamycin) szerin-treonin kináz, a foszfatidilinozitol-3 kináz családba tartozik. Az mTOR útvonal aktivitása központi szerepet játszik a sejtek növekedésének, proliferációjának, metabolizmusának, túlélésének szabályozásában [1].

A TOR fehérjét először, gátlójának (rapamycin) felfedezését követően, élesztőben azonosították. Eukarióta szervezetekben a TOR egy evolúciósan erősen konzervált fehérje, a humán és az egér TOR kináz aminosav szekvenciában 95%-os megegyezést mutat. A TOR központi szerepét igazolja, hogy funkcióvesztéssel járó mutációi *Drosophila melanogaster*-ben és *Caenorhabditis elegans*-ban embrionálisan letálisak [1].

Emlősökben a TOR-t egy gén kódolja, maga az mTOR fehérje egy több doménból felépülő kináz: a katalitikus kináz domén, az FKBP12-rapamycin kötő (FRB) domén, a represszor domén (RD), az N-terminushoz közeli tandem ismétlődő HEAT motívumok, valamint az aktivitást elősegítő FAT és a C-terminusnál lévő FATC domének alkotják (1.ábra)[1].



1. ábra: mTOR fehérje doménszerkezete. A doménok balról jobbra haladva a következők: Az N-terminusnál lévő 20 tandem ismétlődő HEAT motívumokat a kináz aktivitást szabályozó FAT domén követi. Az FRB egy FKBP12-rapamycin kötő domén, mellette helyezkedik el a CD, katalitikus kináz domén majd a represszor, RD. A C-terminuson a FATC domén található.

Az mTOR kináz, eddigi ismereteink szerint, a sejteken belül két különböző komplex formájában fordul elő: mTORC1 és mTORC2. Az mTORC1 komplex tagjai: az mTOR, az mLST8/GβL, a PRAS40 (prolinerich AKT substrate 40 kDa), DEPTOR (DEP-domént tartalmazó mTOR interakciós fehérje) és a két komplex között a legfontosabb különbséget jelentő Raptor (regulatory associated protein of mTOR). Jelenlegi adatok alapján a komplexet alkotó fehérjék funkcionális feladata nehezen határozható meg pontosan, de az bizonyos hogy az mTORC1 fehérje komplex összeszerelődését és a szubsztrátok toborzását a Raptor fehérje indukálja [2]. Az mTORC2 komplex felépítő fehérjei az mTOR-on kívül a Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), továbbá mLST8/GβL és mSIN1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein), Protor-1 (protein observed with Rictor-1), DEPTOR. Rictor (az mTORC1 komplexben található Raptornak megfelelően) és mSIN

stabilizálja a komplexet, megteremtve az mTORC2 strukturális alapját [3, 4]. Az mTORC2 pontos működése teljesen még nem ismert, de funkciói elsősorban a citoskeletális rendszerhez köthetők.

mTORC1 számos metabolikus funkcióján (fehérje, lipid, ATP szintézis) keresztül pozitívan szabályozza a sejtek növekedését és proliferációját és párhuzamosan a lebontó (katabolikus) folyamatok szintjét (pl. autofágia) visszaszorítja. Az mTORC1 komplex működésének feltérképezését segítette specifikus gátlójának a rapamycinnek megismerése és hatásainak vizsgálata. A rapamycin bakteriális antibiotikum, melyet a RAPA-NUI szigetéről származó *Streptomyces hygroscopicus* fajtából izoláltak [1]. Sejten belül a rapamycin az FKBP12-höz kapcsolódva (FK506-binding protein of 12 kDa) az mTOR FRB doménjéhez köt, ezzel specifikusan gátolja az mTORC1 komplex funkcionális működését. A rapamycin hatását a mTORC1 komplex funkcióival kapcsolatosan igazolták, az mTORC2 komplexre gyakorolt hatásai vitatottak (alacsony dózisban az mTORC2 rapamycinnel szemben érzéketlen, hosszantartó magas dózisú alkalmazása az mTORC2 komplexet is gátolhatja), de az mTORC2-t alapvetően rapamycin rezisztensnek tartják [5, 6].

mTOR jelátviteli útvonala

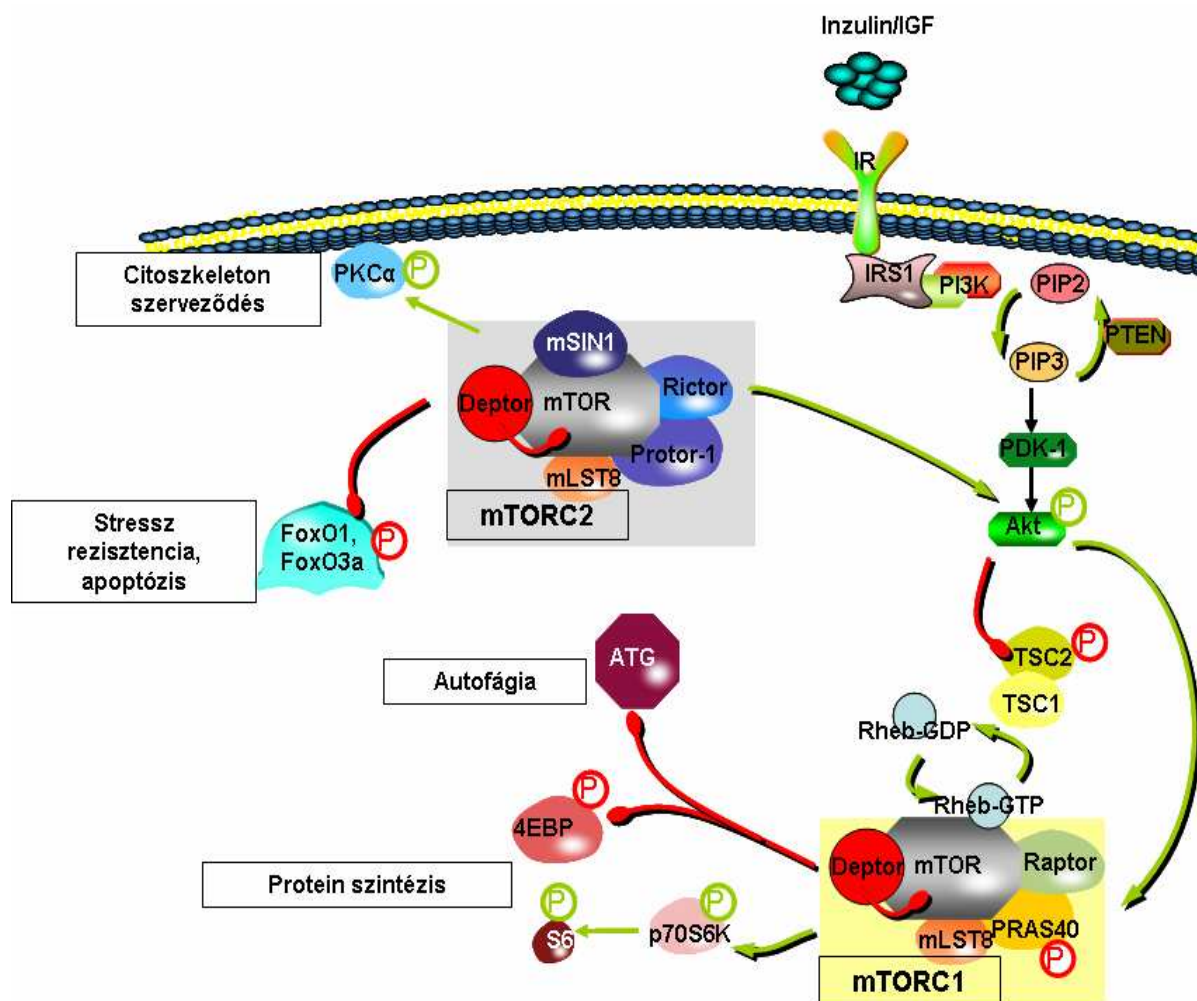
Az mTORC1 aktivitása a sejten belüli komplex jelátviteli hálózat egyik központi elemeként függ számos növekedési faktor aktuális aktivitásától, illetve a sejt energetikai állapotától, tápanyag ellátottságától (ATP, oxigén, aminosavak, stb. szintje).

Számos receptor tirozinkináz (pl.: humán epidermális növekedési faktor, az inzulin, és az inzulinszerű növekedési faktorok vagy más növekedési faktorok receptorai) közvetlenül, vagy intermediér szubsztráton keresztül egy foszforilációs kaszkádot indíthat, ekkor aktiválódik a foszfatidilinozitol-3 kináz (PI3K), mely a foszfatidilinozitol (4,5)-biszfoszfátot (PIP₂) foszforilálja. A keletkező foszfatidilinozitol (3,4,5)-trifoszfátnak (PIP₃) visszalakításában a PTEN fehérje játszik fontos negatív regulátor szerepet. PIP₃ létrejötte aktiválja protein-dependes kinázt (PDK), ami pedig az Akt fehérje aktiválódását eredményezi. Az Akt számos proliferatív és anti-apoptotikus útvonalban központi szerepet betöltő szerintreonin kináz fehérje, a sclerosis tuberosa komplex (TSC1/2) gátlásával képes az mTOR-t aktiválni. A TSC1/2 komplex gátolja az mTOR közvetlen aktivátorát a RHEB-et (kis GTP kötő fehérje), így a TSC1/2 foszforilációs gátlása az mTOR aktiválását eredményezi [7]

Az mTORC2 komplex aktivitásának szabályozásáról a rendelkezésre álló ismeretek még hiányosak, annak ellenére, hogy az utóbbi időben sok olyan eredményt közöltek, mely az

mTORC2 működésének fontosságát hangsúlyozza a sejt túlélésben, metabolikus folyamatokban, proliferációban és a citoskeletális rendszer szerveződésében. Ezen útvonalakban az Akt a kulcs regulátor fehérje. Sokáig Akt aktivátornak csak a PDK1 kinázt tartották, az Akt foszforilációs folyamataiban azonban az mTORC2 komplex is részt vehet [8, 9]. Az mTORC1 és az mTORC2 komplex hatása különböző szubsztrátok foszforilálásán keresztül történik. Az mTORC1 fontos szubsztrátjai között szerepel: az S6K (riboszómális S6 kináz), a 4E-BP1 (eukarióta iniciációs faktor 4-et kötő fehérje), ezek a transzlációt aktiváló folyamatok fontos szabályozó elemei; a két komplex aktivitása az ATG13, foszforilációjával az autofágia gátlásában, míg HIF-1 α -n keresztül az oxigénhiányhoz való alkalmazkodásban is vesz részt.

Az mTORC2 komplex az aktin citoskeletális rendszer szerveződését segíti a PKC α foszforilálásával, a FoxO1 és FoxO3 transzkripciós faktorokon keresztül pedig a stressz rezisztencia, metabolizmus és sejtciklus leállító gének átírását indukálja. Mindemellett az mTORC1 útvonal aktiválását is képes befolyásolni az Akt fehérjén keresztül [9, 10] (2. ábra)



2.ábra: mTORC1, mTORC2 útvonal. Az ábramagyarázat a szövegben olvasható. A piros nyilak gátlást a zöld nyilak aktivációt jelölnek; P: foszforiláció

mTOR útvonal szerepe daganatokban

Az mTOR útvonal befolyásolja a sejtek túlélését és proliferációját, így fontos terápiás célpont lehet a legkülönbözőbb daganatok (elsősorban epitheliális eredetű carcinomák) esetében. Emelkedett mTOR aktivitást egyre több tumor esetében írnak le, mutatnak ki. Az mTOR kináz aktivitására utaló hiperfoszforilációját mutatták ki például az S6K és a 4E-BP fehérjének emlő és ovárium daganatokban [10].

Az mTOR számos jelátviteli útvonallal áll kapcsolatban, ezeket aktiváló illetve, negatív szabályzó fehérjéit érintő mutációit a legkülönbözőbb tumorok kialakulásának hátterében kimutatták már, mint egyes lehetséges tényezők. Mint pl. a PI3K katalitikus alegységében vagy a PTEN és a TSC1/2 fehérjékben adott tumortípusokban eltérő gyakorisággal előforduló mutációk.

A PI3K kináz fehérjében megfigyelt szomatikus mutációk többek között tüdőrák (4%), colorectális (32%) és emlő carcinomák (8%) esetében fordul elő [11]. A prosztata (14), központi idegrendszer (20%) és az endometrium (38%) tumoros szöveteiben gyakori a PTEN fehérje mutálódása [12]. A TSC1/2 mint az mTORC1 fő gátló fehérjeje szintén fontos szerepet tölt be az mTOR útvonal működésében. Mutációjukat az agytumoroknál, a vese carcinomáknál, a tüdő-, és a bőrráknál is leírták [13].

Az mTOR gátlók terápiás alkalmazása a szervtranszplantációban kezdődött, a rapamycin és rapalógok immunszuppresszív hatásainak korai felismerése után. Felismerték, hogy antiproliferációs hatásuk, a sejtciklus gátlásán (vagy akár a spontán apoptózis fokozásán) keresztül immunszuppresszív hatásuk mellett a tumor képződés gátlásához is vezethet. A rapamycinnek és származékainak (rapalógok), mint például CCI-779 (temsirolimus), RAD001 (everolimus) és az AP23573 (ridaforlimus) proliferáció gátló hatásait ma már több tumor esetében vizsgálják. Jelenleg világos sejtes vesecarcinomákban (RCC) és a köpenysejtes lymphomákban (MCL) alkalmazható a temsirolimus kezelés, és egyre több klinikai vizsgálat igazolja más tumor esetében is a rapalógok várható hatásait. A klinikai eredmények értékelése azonban nehéz, mivel jelenleg csak mTORC1 inhibitorokkal vannak klinikai eredmények, és azokat ritkán vetik össze az eredeti tumorok mTOR aktivitásával. Az mTORC1 gátlás bizonyos esetekben (pl. S6K negatív feedback hatásának hiányában, a korábban aktiválódott receptortól érkező jel erősege nem csillapodik) fokozhatja az mTORC2 aktiválását keresztül az Akt útvonal hatásait, így gátlásával akár ellentétes hatások is tapasztalhatóak, igaz csak bizonyos, egyenlőre kevésbé jellemzett tumorok esetében [14].

Előbbiek miatt jelenleg az az álláspont elfogadott, hogy megfelelő klinikai eredményhez olyan mTOR aktivitást célzó terápiás eljárások vezethetnek, amelyek vagy mindkét komplex (mTORC1, C2) gátlásán alapulnak (kettős gátlók, dualinhibitorok). Előfordulhat azonban, hogy hasonló hatásokat jelenleg már ismert, fázis kísérletekben már alkalmazott, az egyéb jelút tagjait gátló inhibitorokat egymással kombinálva alkalmazzák (PI3K, Akt, mTOR).

Emlőtumorok esetében a PI3KCA mutációja az esetek 20-25%-ában jellemző, ez hozzájárulhat a tumorok kialakulásához, a tumorsejtek túléléséhez, így a jelenlegi terápiában alkalmazott hormonkezelésekkel szembeni rezisztenciához is. A jelenlegi kezelések PI3K gátlókkal vagy mTOR gátlókkal vagy utóbbi kettő kombinációjával kiegészítve a hormonterápia érzékenység helyreállítását segítve lényegesen hatékonyabb kezelést eredményezhetnek [7].

Bizonyos non-Hodgkin-lymphomák esetében szintén a PI3K útvonal szabályozási zavaraként, az mTOR útvonal túlműködése figyelhető meg. Egyes follikuláris lymphomás egér modell kísérletekben az mTOR aktivitás gátlást kombinálva a PI3K inhibitor kezeléssel jelentős tumor méret csökkenést és apoptózis indukciót figyeltek meg, ami a két útvonal egyéb (nemcsak a köpenysejtes lymphomák) lymphomák kialakulásában és túlélésében/proliferációjában játszott szerepét erősíti. [15]. Köpenysejtes lymphomákban igazolták, hogy a magas cyclin D1 expresszió és az ezzel összefüggésbe hozható proliferációs aktivitás összefügg az mTORC1 aktivitásfokozódással. Más lymphomák esetében azonban ilyen összefüggések még nem ismertek. Kevés adat áll rendelkezésre a lymphoma sejtek mTOR aktivitásáról, a rendelkezésre álló adatok csak statisztikailag nem értékelhető alacsony esetszámú vizsgálatokat, vagy esetleírásokat, néhány kísérleti adatot jelentenek. Mindezek ellenére bizonyos rossz prognózisú leukémiák és magas malignitású lymphomák vagy végstádiumú betegek esetében már elindultak klinikai kísérletek rapalógokkal.

Célkitűzések

- Az mTOR aktivitás, valamint Raptor (mTORC1 komplexre jellemző fehérje), Rictor (mTORC2 komplexre jellemző) fehérjék mennyiségének vizsgálata bizonyos humán lymphoma sejtvonalakban (Hodgkin, diffúz nagy B-sejtes és Burkitt lymphoma) és humán lymphoma mintákban
- Rapamycin kezelés in vitro és in vivo hatásainak vizsgálata (apoptotikus és proliferációs hatás, mTOR aktivitás változás, valamint Rictor/Raptor mennyiség)
- Rapamycin és más kemoterápiás szerek kombinációinak in vitro hatás vizsgálata különböző lymphoma sejtvonalakban

Anyagok és módszerek

Sejtkultúrák

A sejtvonalakat, HT58 (humán, B sejtes non-Hodgkin, Burkitt lymphoma; NHL), KM-H2 (humán, Hodgkin-lymphoma; HL) és BHD-1 (humán non-Hodgkin, diffúz nagy B-sejtes lymphoma; DLBCL), RPMI 1640-es (Sigma) médiumban tartottuk fenn (BHD1 sejtvonal esetében RPMI 41640-es Iscoves médium 1:3 arányú keverékét alkalmaztuk), amihez 10%-os főtális borjúsavót (Gibco), 0,03% L-glutamint és antibiotikumot (penicillin, streptomycin, gentamycin,) adtunk. A sejtenyészetet 5% CO₂ mellett 37°C-on tartottuk. 72 órás kezeléseket 48 lyukú plate-eken (100-150 ezer/lyuk sejtszám) végeztük.

Az in vitro alkalmazott kezelések a következők voltak: rapamycin 50 ng/ml (Rapamycin, Sigma), methotrexate 50 nM (Methotrexate-Teva, Pharmachemie BV), cytosine arabinoside 10 µg/ml (Alexan, Ebewe Pharma), doxorubicin 0,2 µM (Doxorubicin „Ebewe”, Ebewe Pharma), vincristine 10 nM és 3 nM (Vincristin liquid, Richter Gedeon Nyrt.), etoposide 1 µM (Etoposide-Teva, Pharmachemie BV), methylprednisolone 1 µM, 0,1 µM (Methyl-prednisolon-Human, TEVA), cyclophosphamide 1 µM (Endoxan, Baxter Oncology GmbH) és epirubicin 200 nM (epirubici-hidroklorid, TEVA).

Sejtmorfológia, sejtciklus és apoptózis vizsgálat

Cytospin preparátumot 5 perces 500 rpm centrifugálást követő -20°C-os 80%-os methanol fixálással készítettünk. A mintákat hematoxilin-eozin, vagy immunhisztokémiai festés után fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

Az apoptotikus sejtek %-os arányát Mihalik R. által leírt és bevezetett áramlás citometriás módszerrel határoztuk meg. A technika lépései röviden: centrifugálás után a sejteket 70%-os ethanolban fixáltuk, majd alkalikus extrakciót végeztünk (extrakciós puffer: 200 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4, 500 μl /minta), az RNS mentesítéshez RN-áz A enzimet használtunk (1 μg /100 μl extrakciós puffer, Sigma). A DNS festés propidium jodiddal (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1:100/minta, Sigma) történt.

A sejtciklus és apoptózis mérést FACSscan áramlási cytométerrel (BD Biosciences) végeztük, mintánként 10-20000 „sejtet” vizsgálva FL2, FSC tartományban. Az adatokat Winlist programmal értékeltük ki. Ezzel a módszerrel jól kimutathatóak az apoptotikus sejtek; a lúgos hidrolízis során az apoptotikus sejtek fragmentált DNS-e a permeabilizált membránon át kidiffundál a sejtekből, így ezek alacsony DNS tartalmú populációként (sub G1) jól elkülöníthetőek az élő (sejtciklus adott fázisában levő megfelelő DNS tartalmú) sejtektől (3.ábra).



3. ábra Áramlási citometria (FACS): KMH2 (HL) sejtek 96h-ás tenyészet áramlás citometriai mérés kiértékelése; az ábrán az apoptotikus sejtek %-a van feltüntetve, valamint sejtciklus G1 és G2 fázisai.

Western blot

A fehérje produktivitás kimutatására western blot technikát is alkalmaztunk, mely során a fehérjét molekulásúly alapján választottuk külön a többi fehérjétől és jelölt ellenanyagok segítségével kifejeződésük mértékét vizsgálhattuk.

A sejteket lizáltuk SDS mintapufferben (50 mM Tris-HCl, pH7,5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 0,5 mM sodium vanadát, 10 µg/ml leupeptid és 10% glicerol) 1-10 µg mennyiségű fehérjét (különböző minták esetében mindig azonos mennyiségű fehérje futtatása, összehasonlító vizsgálatok esetében) SDS gélen elektroforézissel szétválasztottuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk. Blokkolást követően (az ellenanyag aspecifikus bekötődését csökkenti) a membránt anti-foszfo-mTOR (p-mTOR, Ser2448), anti-mTOR, anti-foszfo-p70S6K (p-p70S6K, Thr389), anti-foszfo-S6 (p-S6, Ser235/236) (Cell Signaling) és anti-Rictor (Abcam) ellenanyagokkal inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on.

Következő nap Vectastain Elite ABC másodlagos előhívó kittel (Vector) és kemilumineszcens előhívási technika (Pierce ECL Western Blotting Substrate előhívás KODAK készülék) segítségével detektáltuk a membránon a megfelelő méretű fehérjét. A minták összehasonlíthatóságát a membrán anti-actin monoklonális egér ellenanyag inkubációt követő előhívással (A2228, Sigma) is ellenőriztük.

Immunhisztokémia (IHC)

Paraffinba ágyazott szöveti microarray metszeteken (Tissue microarray - TMA), hagyományos biopsziás metszeteken valamint sejttenyészetből készült cytospin preparátumokon vizsgáltuk a fehérjék mennyiségét. A cytospin preparátumokat metanolban fixáltuk.

A TMA blokkokban a szöveti minták 2 mm átmérőjűek (70 különböző darab/tárgylemezen), így lehetőség van egyszerre több különböző eset együttes tanulmányozására. A vizsgált szövetek között egy TMA-ban különböző kontroll minták és reaktív lymphoid szövetek, IHC kontroll szövetek is vannak. A metszeteken a deparafinálást xylollal, majd leszálló alkoholsorral, a feltárást pedig pH6-os citrát pufferrel kuktában (20-30') végeztük el.

Endogén peroxidáz blokkolást (perjódsav 2,3 mg/ml, Na-borohidrid 0,1 mg/ml PBS-ben oldva, hidrogénperoxid 1,5 ml metanol 48,5 ml elegy) végeztünk. Az elsődleges ellenanyaggal éjszaka +4°C-on vagy szobahőmérsékleten 2 óráig inkubáltuk a lemezeket.

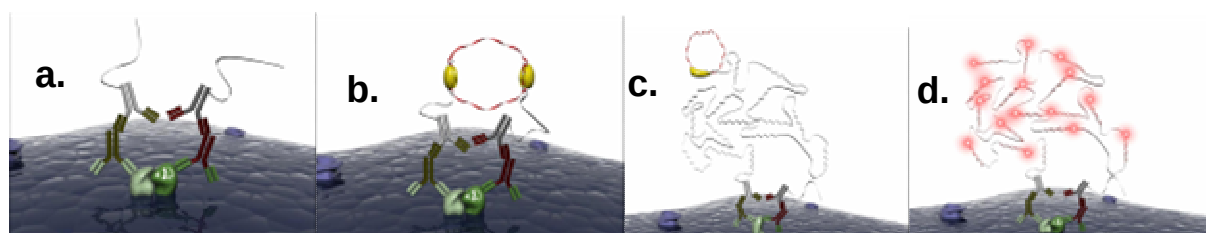
A felhasznált primer ellenanyagok: anti-foszfo-S6 (pS6, 1:100; Cell Signaling), anti-foszfo-mTOR (pmTOR, 1:50;), anti-foszfo-p70S6K, anti-foszfo-4E-BP1 (1:200, Dako), anti-Rictor (1:100, Abcam), anti-Raptor (1:100, Novusbio), anti-cleaved (aktív) kaszpáz-3 (1:100, Cell Signaling), és anti-foszfo-Hisztón H3 (1: 200, Cell Signaling). Univerzális (anti-nyúl és anti-egér) polimer-HRP konjugált másodlagos ellenanyagot tartalmazó Novolink detection system (Novocastra) kit és DAB (3,3'-diaminobenzidin, Dako) segítségével enyhe hematoxilin háttérfestéssel tettük a reakciót láthatóvá, és ezt patológus segítségével értékeltük.

Duolink®

A fehérjeműködés és fehérje-fehérje kölcsönhatások in situ vizsgálata a daganatpatológiai kutatásokban egyre nagyobb szerepet kap. Munkánk során számos kérdés megválaszolásához van szükség a fehérjék mennyiségi, foszforilációs változásainak, fehérje komplexek sejten belüli lokalizációjának vizsgálatára.

A duolink módszer lehetőséget ad fehérjemolekulák, fehérje-fehérje interakciók és fehérjemódosulások pontos, lokalizációjának, és elvileg (leírása szerint) mennyiségének meghatározására is. A rendszer fluoreszcens előhívás esetén jól meghatározható, számolható, pontos jeleket ad, amely komputeres analízissel értékelhető.

A Duolink® módszer in situ PLA® (proximity ligation assay; oligonukleotid jelölt másodlagos ellenanyagok) technikán alapszik. Két különböző eredetű másodlagos ellenanyag meghatározott távolságon belüli bekötése esetén kapunk jelet, ami lehetőséget ad egy fehérje módosulásának (pl. foszforiláció) vagy két fehérje adott távolságon belüli elhelyezkedésének (fehérje komplexek) pontos IHC detektálására. Ezt az eltérő eredetű elsődleges, illetve a hozzá bekötött kétféle másodlagos ellenanyaghoz kötőd oligonukleotidok segítik. Ezek a megfelelő távolság esetén, kellően közel kerülve képesek hibridizálni ugyanahhoz a próbához (4.ábra).



4. ábra: Duolink lépésenként: oligonukleotiddal kapcsolt másodlagos ellenanyagok bekötése (a.); próba hibridizálása ligáz segítségével (b); amplifikáció (c); fluoreszcensen jelölt próbák bekötése (d.)

Vizsgálatainkban az elkészített cytospin preparátumokat paraformaldehidben fixáltuk (10'), TRITON –X-el permeabilizáltuk (0,4%), majd blokkolást követően az elsődleges ellenanyagokat hozzáadva 30 percet szobahőmérsékleten inkubáltuk. Eddig használt elsődleges ellenanyagaink: anti-p-S6 (1:100, Cell Signaling) és anti-S6 (1:100, Cell Signaling). Az oligonukleotiddal kapcsolt másodlagos ellenanyagokkal 37°C-on 2 órát inkubáltunk. A soronkövetkező lépéseket a detektációs protokoll alapján végeztük. A hibridizációs, és a ligáz tartalmazó oldat segítségével a közel helyezkedő oligonukleotidok kapcsolódtak a próbához. Az amplifikációs oldat és a benne lévő polimeráz enzim segítségével elindult a rolling circle átírás, mindez konkatamereket eredményezve felsokszorozta a kezdeti oligonukleotid mennyiséget. Utolsó lépésként a fluoreszcensen jelölt próbákat adtunk, ami hibridizált a amplifikált nukleotidokkal, fluoreszcens mikroszkóppal láthatóvá tette, a mi esetünkben a foszforilált S6 fehérjét. Minden oldat előtt a mosást TBST-vel (0,1% Tween20 TBS-ben) végeztük. A fehérjék pontszerű megjelenését BlobFinder program segítségével kvantitatíve értékeltük ki.

Állatkísérletek

Immunhányos (SCID) egerek háti régiójába az állatházi asszisztensek segítségével oltattuk be humán lymphoid tumor sejteket (30 millió sejt/állat – HT58 -; vagy 30 millió sejt/200 µl mátrigél (Sigma) /állat – KMH2, BHD1). Hodgkin-lymphoma és diffúz nagy B-sejtes xenograftok esetén a már xenotranszplantált tumorok 2x2 mm-es darabjait oltottuk további egerekbe.

Az egereken különböző kezeléseket végeztünk. A kezeléseket akkor kezdtük, amikor a tumorok tapinthatóvá váltak (HT58 esetében 2-3 héttel a sejtek beoltása, a KMH2 és BHD1 esetében 2 hónappal a tumorok tovább oltása után; utóbbi tumorok növekedése lassabb). Alkalmazott kezelések Rapamune (szájon át, 3mg/kg) Torisel (Temsirolimus, intra peritoneálisan, 10mg/kg, Wyeth). A kezeléseket egy héten háromszor végeztük, a tumorok átmérőit lehetőség szerint 3-5 naponta mértük. A kezelések végén az eltávolított tumorok súlyát lemértük. A tumordarabokat formaldehidben fixáltuk és paraffinba ágyasztuk, metszeteket készítettünk belőlük és morfológiai valamint IHC vizsgálatokat is végeztünk.

Statisztikai analízis:

Az adatokat kiértékelve számtani középértéket és szórást számoltunk majd T-próbával meghatároztuk a szignifikanciát. Akkor tekintettük az eredményt szignifikánsnak, ha p értéke $<0,05$.

A munkacsoportunk a vizsgált betegek túlélési adatait (minimum 5 éves) és az mTOR aktivitási adatokat is feldolgozta. A különböző mTOR aktivitású csoportok túlélését Kaplan-Meier módszerrel az SPSS szoftver segítségével vizsgálta.

Eredmények

In vitro és in vivo kísérleti eredmények

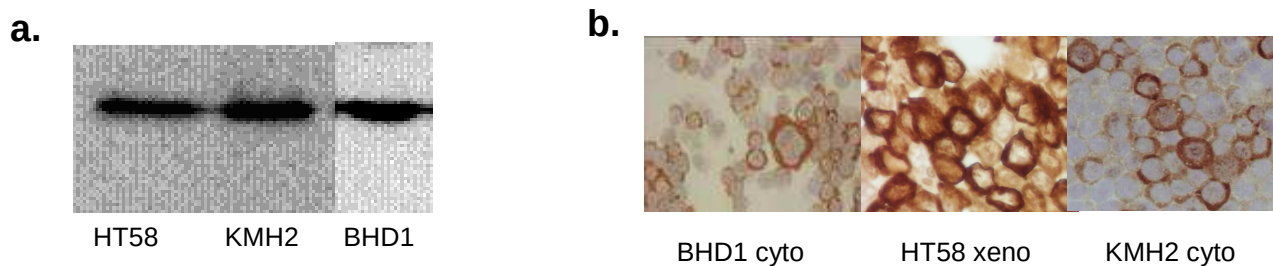
A munkacsoport amelyben dolgoztam különböző humán lymphoma TMA mintákon már korábban vizsgálta az mTOR aktivitást (ezzel kapcsolatos közlemény kézírata előkészületben). Több lymphoma típus (1. táblázat, 5.ábra) esetében kimutatták az mTOR fokozott aktivitását a normál lymphoid szövethez képest. Az eddig jól ismert köpenysejtes lymphomák mellett magas mTOR aktivitás jellemezte a Burkitt, a DLBCL és a HL lymphomákat, ezért aktivitásuk alapján ezt a három lymphoma típust választottuk in vitro és in vivo kísérleteimhez.

Munkám során szöveti mintákon és a cytospines preparátumokon IHC eljárással nem csak közvetlenül p-mTOR mennyiségét, hanem az mTOR útvonal célfehérjéinek aktív, foszforilált formáinak (pl. pS6) jelenlétét is vizsgáltam, előbbi lymphomatípusok pontosabb mTOR aktivitás jellemzése érdekében. Az mTOR aktivitásra jellemző fehérjék expresszióját Western blot technikával is sikerült igazolnom a 3 kiválasztott (Hodgkin lymphoma – KMH2, Non-Hodgkin Burkitt-lymphoma - HT58, Non-Hodgkin Diffúz nagy B-sejtes lymphoma - BHD1) sejtvonal esetében (5.ábra).

	mTOR aktivitás
Hodgkin lymphoma (HL)	+
Burkitt lymphoma (NHL)	+
Diffúz nagy B-sejtes lymphoma (DLBCL - GC)	-
Diffúz nagy B-sejtes lymphoma (DLBCL - non GC)	+
Anaplasticus nagy B-sejtes lymphoma (ALCL)	+
Köpenysejtes lymphoma (MCL)	+
Marginális zóna lymphoma (MZL)	-
Perifériás T-sejtes lymphoma	-
Lymphoplasmocytás lymphoma	+
Krónikus lymphocytás leukémia (CLL)	-

1.táblázat: mTOR aktivitás vizsgálat TMA mintákon

3 immunfestés (p-S6, p-p70S6K, p-mTOR) alapján értékeltük a minták mTOR aktivitását, mTOR aktív lymphoma típusnak értékeltük a legalább 2 immunfestéssel igazolt mTOR aktivitást az esetek több, mint 60%-ában

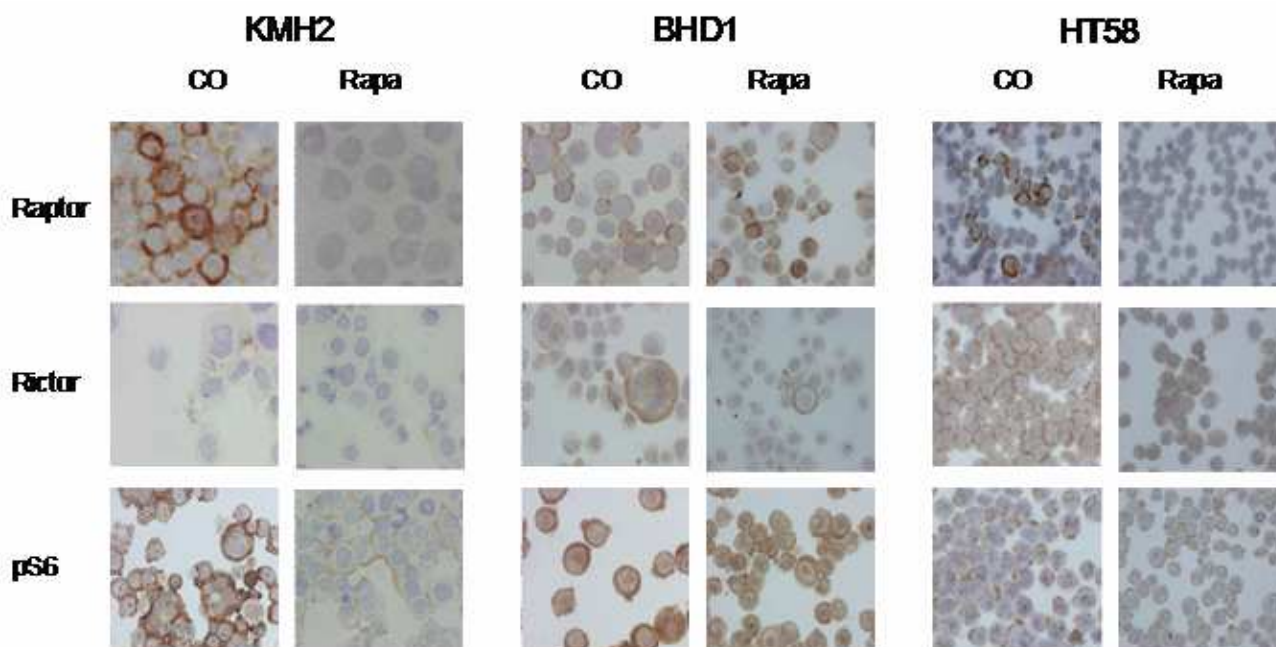


5.ábra mTOR aktivitás vizsgálata az általunk használt modellekben (HT58-Burkitt lymphoma, BHD1- DLBCL, KMH2-HL)

a. : Western blot - pS6 (32 kDa) kimutatása a sejtvonalakban

b. : Cytospin (cyto) és xenograft (xeno) mintákban pS6 IHC festés (Nagyítás: 20x, 40x)

A három kiválasztott lymphoma sejtvonalban megvizsgáltuk a Rictor és Raptor expresszióját is, így az mTORC1 és mTORC2 komplexek jelenlétéről kaptunk adatokat. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált sejtvonalakra általánosan jellemző a magas mTOR aktivitás, míg az mTORC1 és C2 komplexek aránya a sejtvonalakban eltérő lehet. A HT58 (Burkitt) sejtekben inkább az mTORC1 komplex, a KMH2 (HL) és BHD1 (DLBCL) sejtekben az mTORC2 komplex mennyisége dominál (6.ábra).



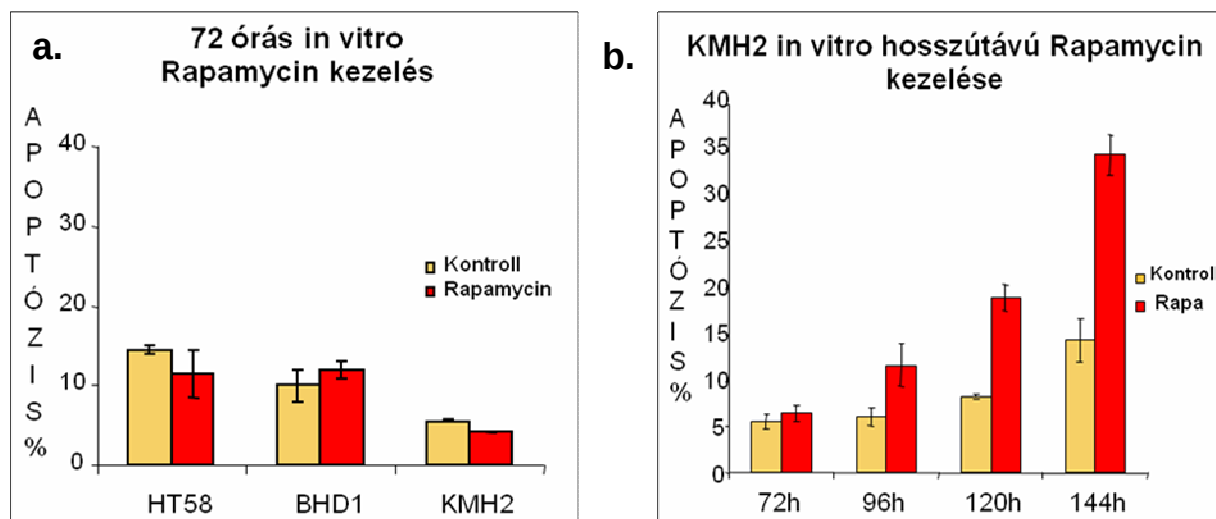
6.ábra: In vitro kezelt lymphoma sejtek IHC festése.

Raptor, Rictor, pS6 expresszió összehasonlítása rapamycin kezelt és nem kezelt sejteken (Nagyítás: 20x, 40x)

A rapamycin in vitro hatásait is vizsgáltuk ezekben a különböző mTORC1/2 expressziójú lymphomasejtekben. A rapamycin kezelés gátolta az mTORC1 aktivitást, ennek eredményeként kimutatható volt a pS6 expresszió csökkenés és mellette módosult a Rictor és Raptor expressziója is.(6. ábra).

Az mTORC2 komplex rapamycin érzékenysége vitatott, magas Rictor expresszió esetén azt vártuk, hogy az a rapamycin kezelés gyenge hatásával jár. Ezt igazolták in vitro eredményeink a HT58 Burkitt-lymphoma és BHD1 DLBCL sejtekben. HT58 sejtekben, ahol az mTORC1 komplex dominált, rapamycin érzékenységet, míg a BHD1 ahol mTORC2 komplex dominált, rapamycin rezisztenciát figyeltünk meg in vitro. A HL sejtekben viszont rapamycin proliferációgátló és apoptotikus hatásait annak ellenére is ki tudtuk mutatni, hogy ezekben a sejtekben az mTORC2 komplex fokozott expresszióját figyeltük meg.

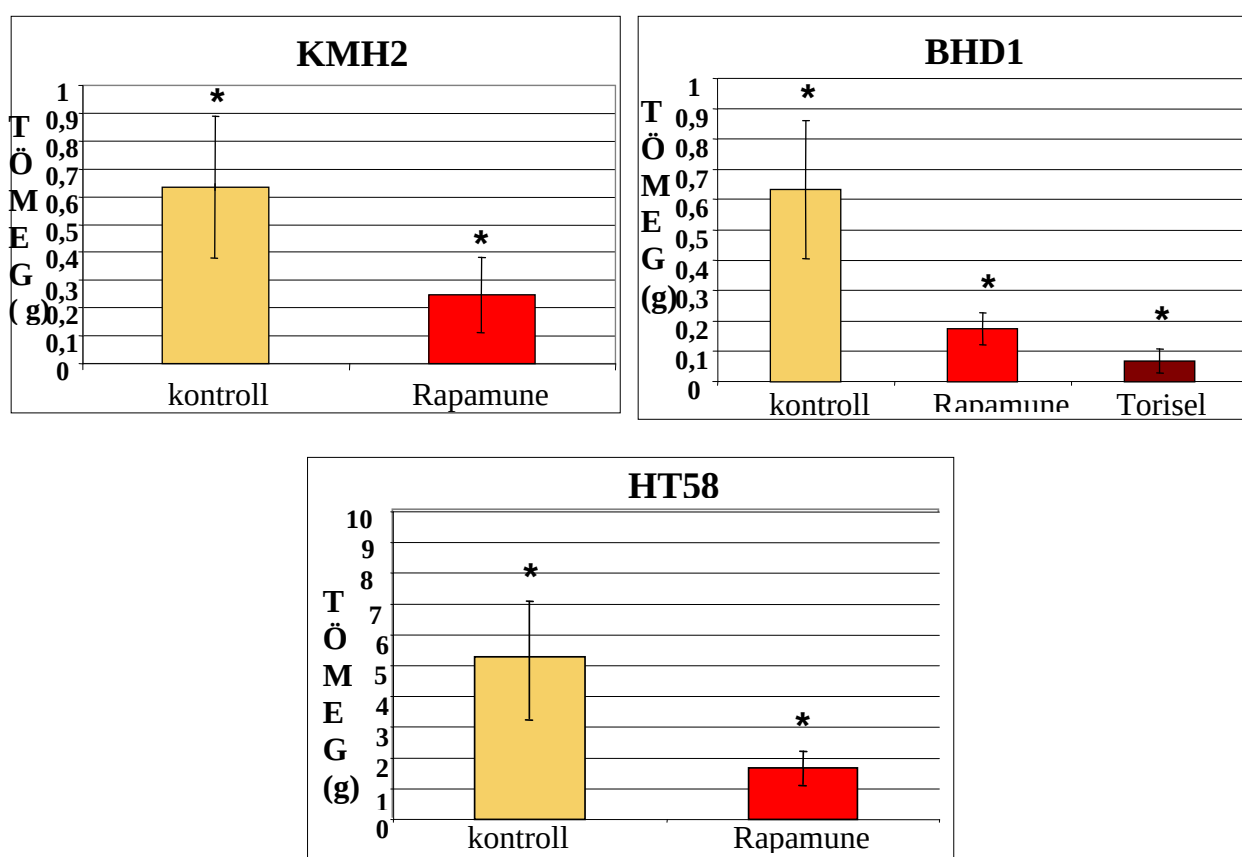
72 órás in vitro kezelés esetén a rapamycin érzékenység - a különböző lymphomák esetében - csupán proliferációgátló hatásként jelentkezett (7a.ábra). Rapamycin kezelés hatására a sejtek megrekedtek a G1 fázisban. Ez az állapot azonban hosszútávon sejtpusztulást, apoptózist indukálhat. Nagy dózisu kezelés esetén is csak proliferációgátló hatást tapasztaltunk a HT58 és a BHD1 sejtek esetében, míg HL sejtvonalban a hosszútávú kezelés már apoptózist indukált (7b.ábra).



7.ábra A rapamycin in vitro hatásai

A lymphoma sejtekben 72h rapamycin kezelés után proliferációgátló hatást figyeltünk meg, apoptózis indukciót nem (a.); hosszútávú rapamycin kezelés a KMH2 sejtekben apoptózist indukált (b.).

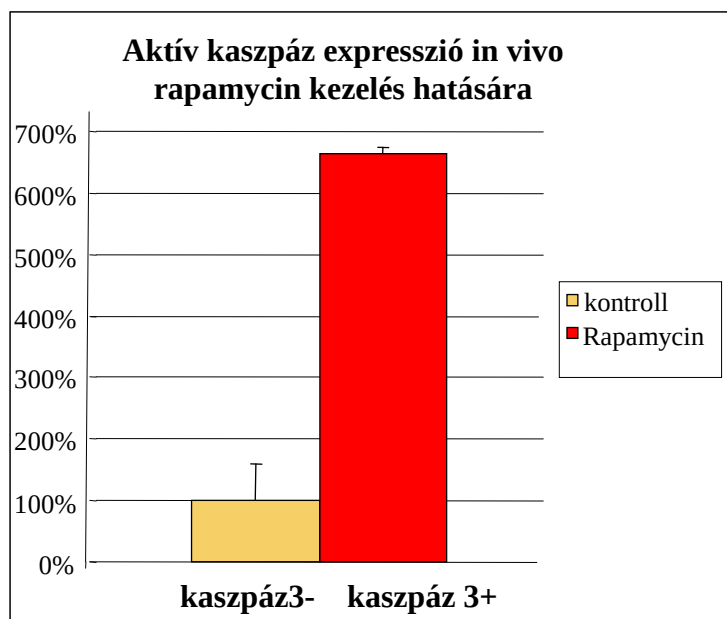
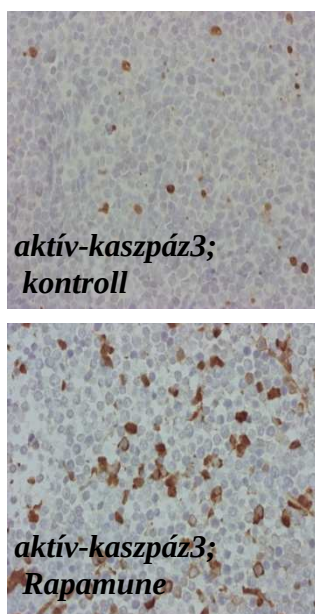
Az mTOR gátlók hatásait *in vivo* modellekben is ki tudtuk mutatni. A rapamune vagy Torisel kezelés már 2-3 hét alatt jelentősen gátolta a tumorok növekedését, a kezelt állatokban a tumorok súlya jelentősen csökkent. A xenograftokban a rapamune és torisel kezelés után a tumor tömegeket összehasonlítva szignifikáns tumornövekedésgátlást figyeltünk meg. Ezt mindhárom lymphoma típus esetében megfigyelhettük (8.ábra), sőt HT58 és KMH2 xenograft esetében aktivált caspase-3 immunhisztokémiai reakcióval igazoltuk a kezelés spontán apoptózist indukáló hatását is (9.ábra a HT58 esetében kapott eredményeket mutatja)[16].*



8. ábra Rapalógok *in vivo* tumornövekedést gátló hatása

KMH2, BHD1 és HT58 lymphoma xenograftokban mért tumor tömeg csökkenés. Az ábrán a kontroll és kezelt tumorok tömegei (g) láthatóak; *: $p < 0,05$

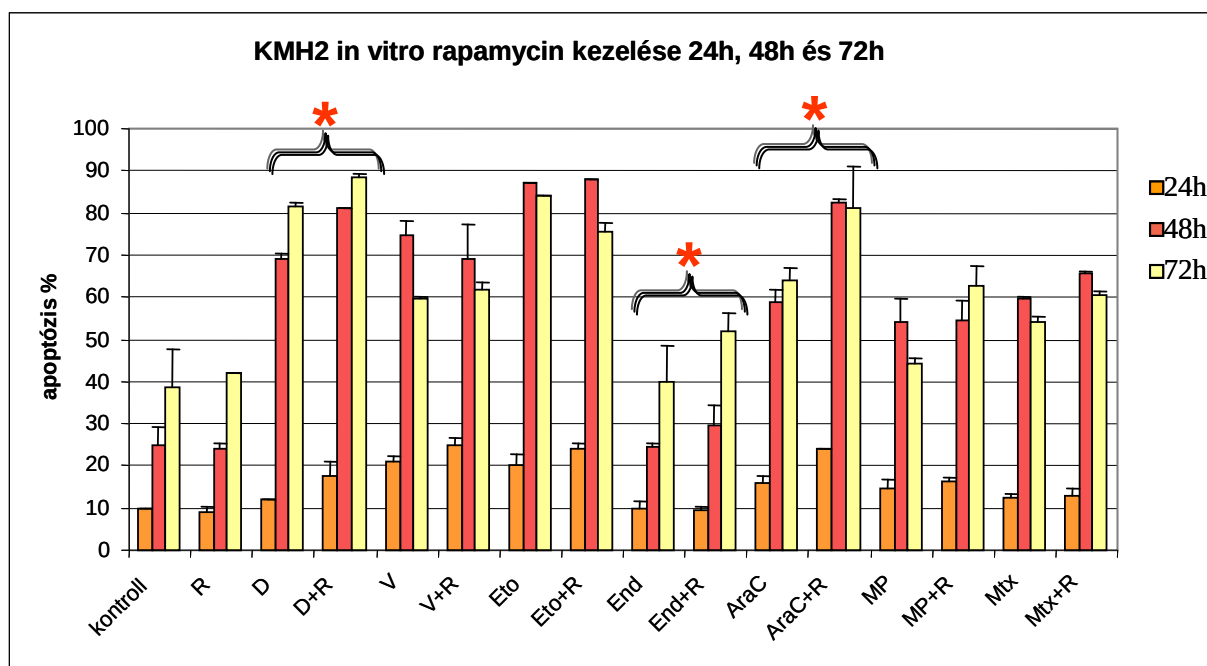
*A HT58-cal kapcsolatos eredményeink várhatóan közlésre kerülnek egy nemzetközi folyóiratban, a cikk előkészületben van.



9. ábra Aktív (Hasítlott)–caspase-3 pozitív (apoptotikus) sejtek száma emelkedett a 3 hétig rapamune kezelt HT58 xenograftban

In vitro kísérleteinkben a lymphomák kezelésében alkalmazott szerek és a rapamycin kombinációjának hatásait is vizsgáltuk. A rapamycin kezelés emelte az spontán apoptózis mértékét a HL sejtvonalnál. Doxorubicin, Endoxan és Cytosine arabinoside kezelések apoptotikus hatásait pedig hozzáadott rapamycin képes volt tovább emelni. (10. ábra, 2.a, b táblázat)

Ez az eredmény illetve a munkacsoport által korábban leírt jelenség, amely szerint a rapamycin képes fokozni a TGF β indukált apoptotikus hatásokat lymphomákban azt mutatják, hogy a rapamycin képes érzékenyíteni a lymphomasejteket negatív szabályozóikkal szemben.



10. ábra In vitro kombinált rapamycin kezelés KMH2 (HL) sejtvonalon

A rapamycin kombinált kezelésben apoptózist fokozó hatását a Doxorubicin, Endoxan és a Cytosine arabinoside kemoterápiás szerekhez hozzáadva fejtette ki

(AraC: Cytosine arabinoside Rapa: Rapamycin; D: Doxorubicin; End: Endoxan; Epi: epirubicin; Eto: Etoposide; Mp: Medrol; Mtx: Methotrexate; Vin: Vincristine);

a.

	24h	48h	72h
kontroll	10 ± 0	25 ± 4,2	38,5 ± 9,1
R	9 ± 1,4	24 ± 1,4	42 ± 0
D	12 ± 0	69 ± 1,4	81,5 ± 0,7
D+R	17,5 ± 3,5	81 ± 0	88,5 ± 0,7
V	21 ± 1,4	74,5 ± 3,5	59,5 ± 0,7
V+R	25 ± 1,4	69 ± 8,4	62 ± 1,4
Eto	20 ± 2,8	87 ± 0	84 ± 0
Eto+R	24 ± 1,4	88 ± 0	75,5 ± 2,12
End	10 ± 1,4	24,5 ± 0,7	40 ± 8,4
End+R	9,5 ± 0,7	29,5 ± 4,9	52 ± 4,2
AraC	16 ± 1,4	59 ± 2,8	64 ± 2,8
AraC+R	24 ± 0	82,5 ± 0,2	81 ± 9,9
Med	14,5 ± 2,1	54 ± 5,6	44 ± 1,4
Med+R	16,5 ± 0,7	54,5 ± 4,9	62,5 ± 4,9
Mtx	12,5 ± 0,7	59,5 ± 0,7	54 ± 1,4
Mtx+R	13 ± 1,4	65,5 ± 0,7	60,5 ± 0,7

b.

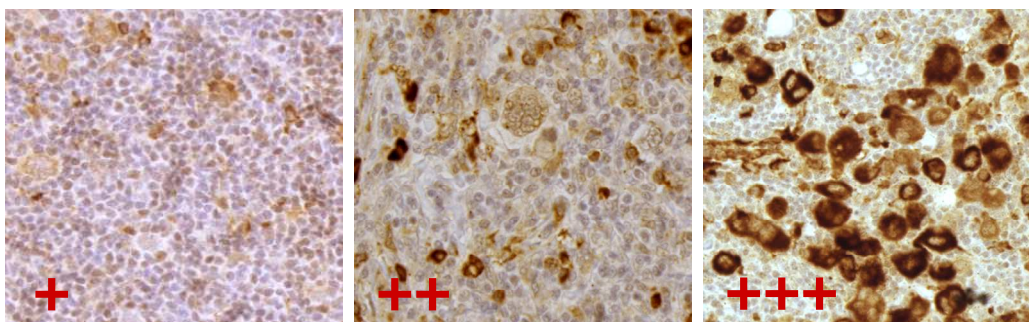
	72h
kontroll	3,9 ± 0,6
R	4 ± 0,2
Med	7,9 ± 1
Med. + R	10,5 ± 0
Vin	22,5 ± 1
Vin. + R	14,45 ± 1,1
Epi	29 ± 0,3
Epi. + R	28,4 ± 0,1

2. táblázat: Lymhoma sejtvonalak citosztatikumok + rapamycin kombinált kezelése in vitro
KMH2 (HL) sejtek (a); BHD1 (DLBCL) sejtek (b) kezelése; a pirossal bekeretezett
kezelőszereknel tapasztaltunk apoptózis% emelkedést

(AraC: Cytosine arabinoside Rapa: Rapamycin; Doxo: Doxorubicin; End: Endoxan; Epi: epirubicin; Eto: Etoposide; Med: Medrol; Mtx: Methotrexate; Vin: Vincristine)

Humán szöveteken végzett expresszió vizsgálatok eredményei

Megvizsgáltuk, hogy a Hodgkin lymphomás (HL) betegek esetében az mTOR aktivitás kimutatható-e a biopsziás mintákban. Azt tapasztaltuk, hogy az mTOR aktivitás átlagosan jellemző a vizsgált HL-es betegek daganatsejteiben, a Hodgkin és Sternberg Reed sejtek egyértelműen pozitívak voltak pS6 IHC festéssel, ugyanakkor az aktivitás mértéke betegenként eltérést mutatott. A klinikai adatokkal összevetve előbbi eredményeinket azt tapasztaltuk, hogy valamennyi alacsony mTOR (+) aktivitást mutató beteg (7db) esetében az első kezelést követően több mint 5 éven keresztül a betegek tünetmentesnek bizonyultak, jelenleg is tünetmentesek (gyakorlatilag gyógyultnak tekinthetők). A magas mTOR aktivitású (+++) betegek (92%) között voltak az előbbi csoportba tartozó betegekhez hasonló jó prognózisú esetek is, de nagy számban visszaesést követően gyógyuló esetek és sajnos nem gyógyuló esetek is tartoztak ebbe a csoportba. Mindegyik rossz prognózisú, nem gyógyult, az 5 éves követési periódusban elvesztett beteg esetében magas mTOR aktivitást (+++) tapasztaltunk. (11.ábra) [17].**



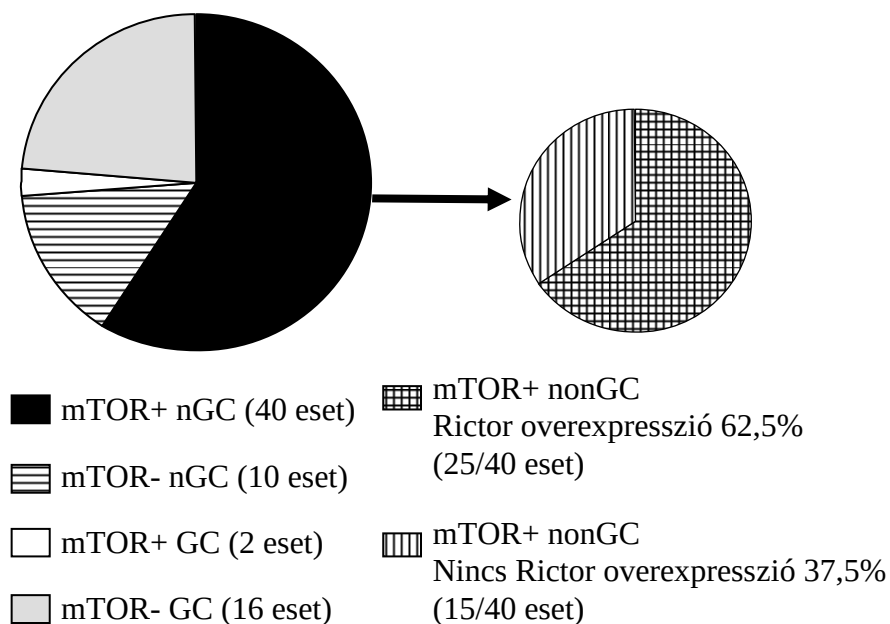
11. ábra: HL betegek biopszia mintáin IHC festéssel pS6 expresszió vizsgálata.

7 esetben alacsony mTOR aktivitást figyeltünk meg (+), de 79 esetben a fokozott mTOR aktivitás volt jellemző (++; +++).

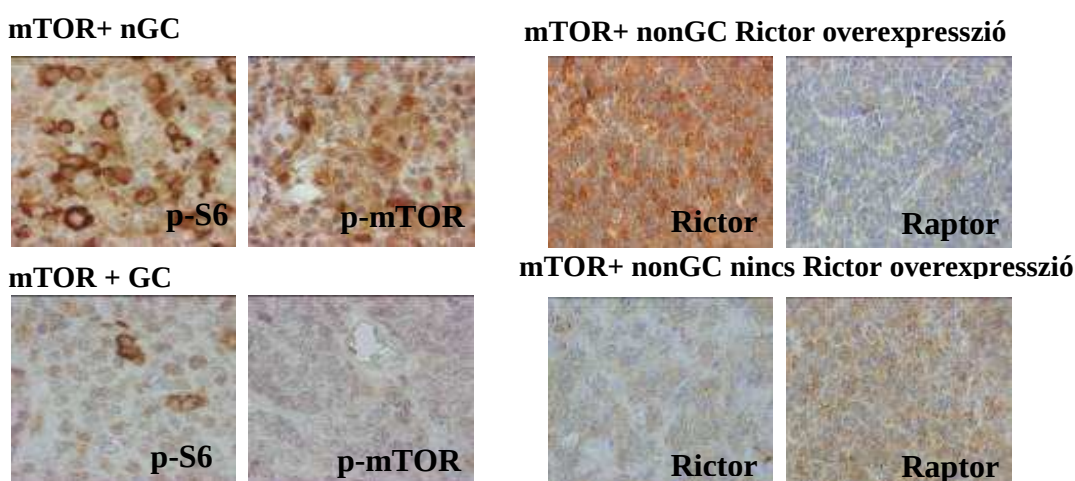
TMA lemezekon 68 humán DLBCL-s beteg biopsziás mintáit is megvizsgáltunk. p-S6 (IHC-vel legmegbízhatóbb markere az mTOR aktivitásnak) emelkedett expresszió jellemezte a DLBCL-ek aktivált B sejtjes eredetű (vagy más néven nem centrum germinatívum eredetű – non GC) típusait (80%-ban, 40/50), míg a jobb prognózisú centrum germinatívum eredetű DLBCL-ek esetében gyakorlatilag nem tudtunk mTOR aktivitást kimutatni (18 esetből csak kettőben találtunk enyhe pS6 pozitivitást).

A HL-es DLBCL-es mintákban a két különböző mTOR komplexre jellemző fehérjék mennyiségét is megvizsgáltuk. A Hodgkin lymphoma sejtek a normál sejtekéhez hasonló Rictor (+), Raptor (+) expressziót mutattak, Rictor dominanciát egyetlen egy esetben figyeltünk csak meg. Ezzel ellentétben az mTOR aktivitást mutató DLBCL-es esetek közel két harmadában (62,5%) a Rictor, tehát az mTORC2 komplex domináns expresszióját tudtuk kimutatni (12.ábra). **

a.



b.

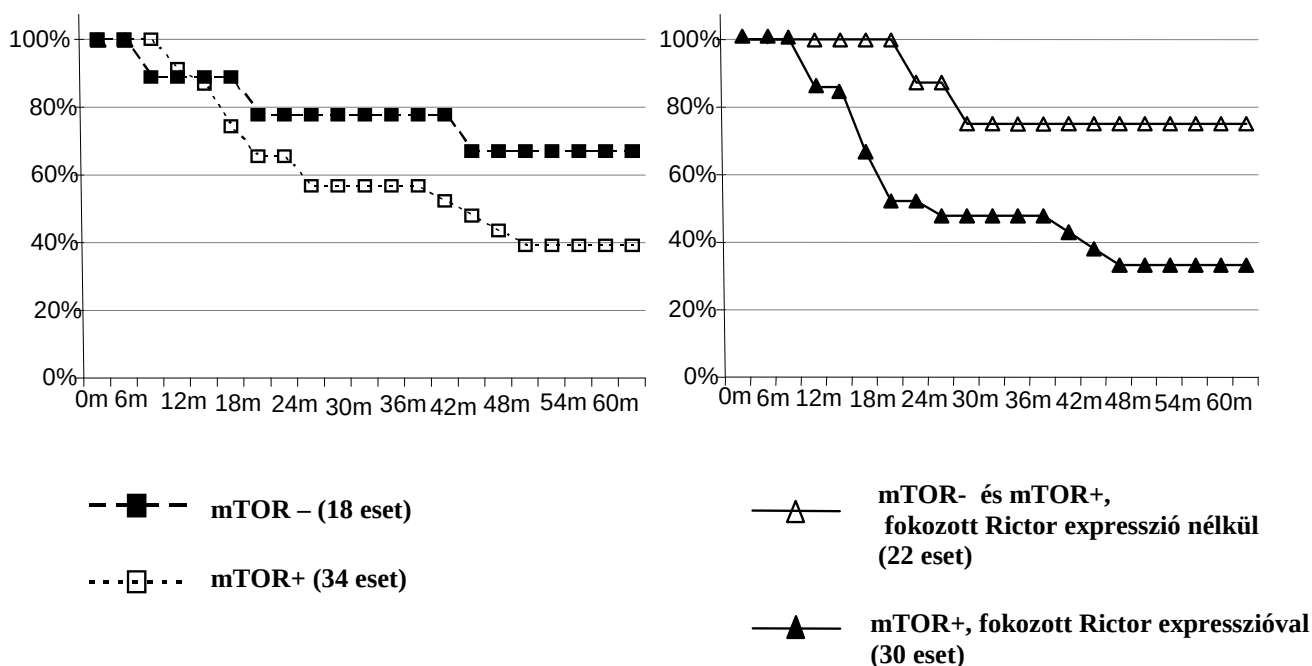


12. ábra DLBCL-ek mTOR aktivitása

a. Nem centrum germinativum és centrum germinativum eredetű DLBCL-ek mTOR aktivitásának ábrázolás a kördiagrammon, azon belül is az mTOR aktív non GC eredetűek Rictor, Raptor expressziója; **b.** : pS6, p-mTOR, Rictor, Raptor IHC festések (nagyítás: 20x)

** A HL-val kapcsolatos eredményeink várhatóan közlésre kerülnek, a kézirat előkészületben van.

A betegek túlélési adatait is összevetettük az mTOR aktivitással és a két komplex expressziójával. Eredményeink alapján az mTOR aktivitás, illetve az mTORC2 (Rictor) domináns expressziója mTOR aktivitással szignifikánsan rosszabb túlélési eredményeket mutat DLBCL-es betegek esetében (9. ábra) [18].***



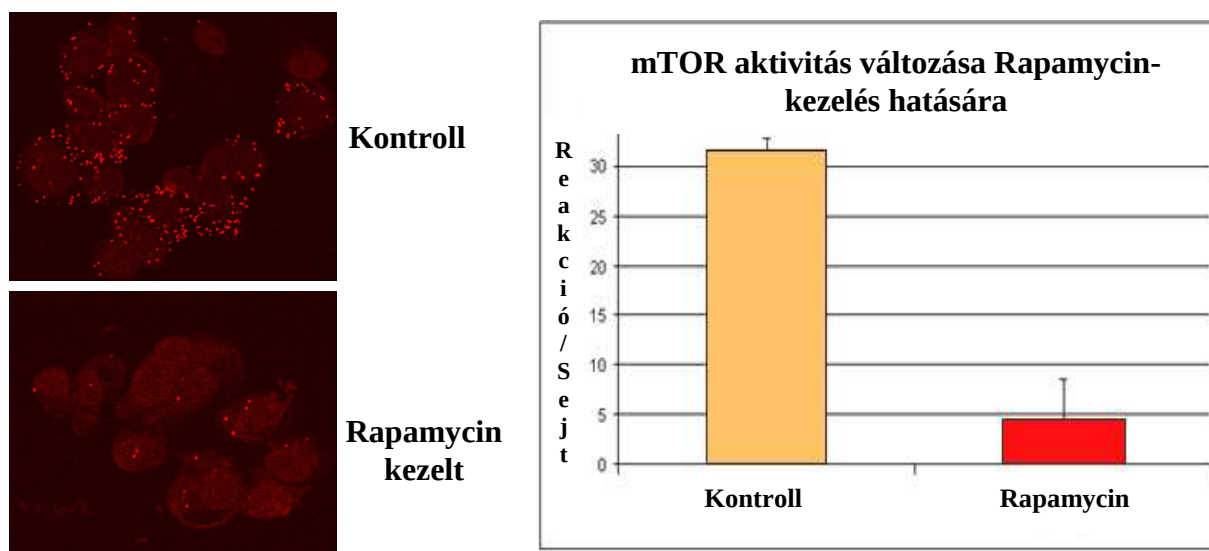
9. ábra DLBCL-es betegek túlélése mTOR és mTORC2 expressziójának függvényében.

A vizsgált mTOR inaktív és mTOR aktív DLBCL-es betegek 5 éves túlélése (Kaplan-Meier görbe)

*** A DLBCL-val kapcsolatos eredményeink várhatóan közlésre kerülnek egy nemzetközi folyóiratban, a cikk elbírálás alatt van.

Vizsgálataink és más tumorok esetében is az mTOR potenciális terápiás target lehet, nem minegy azonban, hogy a jövőben adott betegek esetében melyik mTOR inhibitor alkalmazása célszerű. Ehhez az mTOR aktivitás, ezen belül a két komplex (mTORC1/C2) aktivitás mértékének pontos meghatározása fontos lehet. Erre jelenleg kidolgozott kvantitatív módszer nem áll rendelkezésünkre. A Duolink technika segítségével, melynek beállítását megkezdjük, pontosan lokalizálható és kvantitatív módon meghatározható különböző foszforilált fehérjék és/vagy fehérje komplexek mennyisége in situ. A pS6-S6 expresszió változását rapamycin kezelt és nem kezelt sejteken ezzel a módszerrel vizsgálni tudtuk. Kimutattuk, hogy a rapamycin kezelést követően IHC-Duolink technikával detektálható, számszerűsíthető az mTOR aktivitás csökkenése. Vizsgálataink alátámasztják, hogy a technika valóban alkalmas az immunhisztokémiai eredmények hasonló kvantitatív értékelésére.

Mivel ez a módszer alkalmas foszfoproteinek és fehérjekomplexek kimutatására is, két különböző ellenanyag felhasználásával, a továbbiakban ezzel a módszerrel az aktív mTORC1 (Raptor-pmTOR) és aktív mTORC2 komplexek (Rictor-pmTOR) mennyiségét is szeretnénk meghatározni cytospineken és párhuzamos metszeteken.



9.ábra 24 órás in vitro rapamycin kezelés hatása az mTOR aktivitásra. S6-pS6 duolink jelöléses eljárásall in situ kvantitatív kiértékelhető. A rapamycin kezelésre a sejtenkénti fehérje expresszió jelentősen lecsökkent.

Következtetés

Vizsgálataink során több lymphoma típusban is magas mTOR aktivitást tapasztaltunk, amelyek hátterében a már más tumorok és lymphomák esetében előforduló PI3K/Akt útvonalon bekövetkező fehérje módosulások, hiperaktivációk állhatnak [19].

Az mTORC1 és mTORC2 komplexek elemeinek expresszió vizsgálatában kimutattam, hogy a választott HL és DLBCL sejtvonalakban az mTORC2, míg a Burkitt lymphoma sejtvonalban az mTORC1 komplex expressziója kifejezettebb.

A rapamycin/rapalóg kezeléseket immunszuppresszív hatása már korábban ismert, szervtranszplantációs gyakorlatból. Rapalóg kezelés pozitív hatásait mutatták ki köpenysejtes lymphoma, Kaposi sarcoma, és bizonyos végstádiumú non-HL-ák esetében [20]. A rapamycin/rapalógok elsődleges célpontja azonban az mTORC1 komplex, az mTORC2-re gyakorolt hatása vitatott [21, 22]. In vitro rapamycin kezelés az általunk vizsgált lymphoma sejtekben proliferációgátlást eredményezett (a sejtciklus blokk, G1 fázisban). Hosszabb távú kezelés a HL sejtek esetében már apoptózist is indukált. Ez alátámasztja mások in vitro eredményeit, ahol rapamycin kezelés anti-proliferációs hatásait mutatták ki [23]

In vivo xenograft kísérleteinkben a rapamycin és rapalóg kezelések a tumornövekedés gátlását, a xenograftok esetében a spontán apoptózis mértékének szignifikáns emelkedését is ki tudtuk mutatni. Hasonló eredményeket (mTOR gátló sejt pusztulás és tumorméret csökkentő hatását) eddig egy egér follikuláris lymphoma modellben igazolták [23, 15]. Ezek az in vivo kísérleti eredmények megerősítik, hogy az mTOR inhibitorok valóban hatékony tumornövekedés gátló kezelést jelenthetnek több, és nemcsak magas malignitású lymphoma esetében. A rapamycin in vivo jelentősebb hatásai magyarázhatóak egyrészt a kezelési időtartam meghosszabbodásával illetve azzal, hogy a rapamycin képes helyreállítani a daganatsejtekben a tumornövekedést negatívan szabályozó növekedési faktorok, citokinek, egyéb mikrokörnyezeti elemek hatásait (ezek in vitro hiányoznak, hiányozhatnak) is. Az mTOR gátlás ilyen szerepét mutatták ki bizonyos növekedési faktor útvonalakkal kapcsolatosan pl. VEGF (a tumor növekedést segítő hatásai mellett, segíti a tumorok beereződését, a daganatsejtek migrációját, ezen keresztül metasztázisát, ezek a hatások [24] szerint mTOR gátló kezelésekkel jelentősen gátolhatóak). Hasonló eredményeket kapott a munkacsoport, amelyben dolgozom korábban a TGF β negatív regulációjának helyreállításával kapcsolatosan in vitro [16] is.

A DLBCL-es és HL-s betegek TMA-IHC vizsgálata során megállapítottuk, hogy az mTOR aktivitási adatok és betegek túlélési adatai összefüggést mutatnak. A magas mTOR aktivitás a HL lymphomák 92%-ában és a non-GC DLBCL-ek esetében jellemző, mindkét esetben korrelál a rosszabb prognózissal. Ezt figyelembevéve elmondható, hogy a lymphomák esetében (az MCL-ek mellett) a magas mTOR aktivitás potenciális terápiás target lehet.

A humán lymphomákban a vizsgált különböző sejtvonalakhoz hasonlóan tapasztaltuk az mTORC1 és mTORC2 expresszió egyedi eltéréseit. A magas mTOR aktivitású non-GC DLBCL-ek esetében az esetek több mint 60%-ában mutattunk ki fokozott Rictor expressziót, ami jelentős mTORC2 expresszióra utal. Ez felveti ezeknek az eseteknek eltérő rapalóg érzékenységet.

A kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztencia áttörése és hatékonyabb kezelés részeként a rapalógok vagy más mTOR inhibitorok alkalmazása célzott terápiás eszköz lehet egyre több tumor esetében a jövőben [25, 26]. KMH2 és BHD1 lymphoma sejteken végzett in vitro kísérleteink különböző citosztatikumok kombinációival, valamint eredményeink a rapamycin in vivo hatásairól megerősítik az eddigi adatokat (kimutatott fokozott spontán apoptózis emelkedését, a tumor növekedés visszaszorítását rapamycin kombinált kezelésekből) [21, 23]. Emellett a különböző vizsgálatokból az is ismert, hogy a rapalóg kezelések mellett, hogy meggátolhatják a tumor növekedését, stabilizálhatják a beteg állapotát, kevésbé citotoxikusak [27]. Ugyanakkor mTORC1 gátlása az mTORC2 gátlás hiányában aktiválhatja az Akt útvonalat, újabb antiapoptotikus és túlélési faktorok aktiválódhatnak, ami korlátozza a rapalógok felhasználási lehetőségét, ez és az általunk is több esetben kimutatott mTORC2 expresszió felveti a dual inhibitorok szükségességét és mindenképpen körültekintő betegcsoport meghatározást igényel [8, 28].

A kapott eredményeink alátámasztják a terápiás várakozásokat és az eddigi klinikai kísérletek eredményeire is magyarázatot adhatnak [20, 29]. A vizsgált humán lymphomákban általunk kimutatott Rictor overexpresszió felhívja a figyelmet arra, hogy ezeknek az mTORC2 komplex expressziót mutató eseteknek a rapalógokkal szembeni érzékenysége eltérő (rapalóg rezisztencia) lehet [7, 30]. A többszörösen visszaesett illetve végstádiumú humán DLBCL-es betegek esetében közlésre került adatok szerint csak a vizsgált esetek ~30-35%-ában tudtak terápiás választ kimutatni rapalóg kezeléssel a nem reagáló esetek 65-70% a magyarázható lehet többek között a közel ilyen arányban általunk kimutatott mTORC2 expresszióval is, de természetesen ez a feltételezés további vizsgálatokat igényel [31]. Primer effusionális lymphoma (PEL) sejtvonalakon végzett in vitro kísérletek is alátámasztják az előbbieket. PEL

sejtvonalak esetében kimutatták, hogy az mTORC1 inhibitor és PI3K gátlószer kombinált alkalmazása hatékonyabb az mTORC1 gátló kezelésnél [24].

Az mTOR inhibitorok várható klinikai hatásai az általunk vizsgált lymphomák esetében különösen fontosak lehetnek, a jelenleg is gyengébb terápiás eredményeket mutató non-GC DLBCL-ek és a visszaeső, nem gyógyuló HL lymphomás betegek (~20%) esetében [32, 33]. Fontos kiemelni, hogy az mTORC1/2 komplex, illetve az aktív mTORC1/C2 pontos mennyiségi meghatározása a betegek tumorsejtjeiben információt adhat a várható rapamycin érzékenységről a rapalóg vagy akár dual inhibitor kezelések előtt.

Aktív mTORC1/C2 komplexek mennyiségének meghatározásához nyújthat lehetőséget a Duolink technika, mely beállítását végezzük, segítségével in situ kvantitatív meghatározhatóvá válhat biopsziás anyagokban, az mTOR fokozott aktivitása, sőt emellett az aktív mTORC1 (pmTOR-Raptor komplex) és mTORC2 (pmTOR-Rictor komplex) mennyisége is. Mindez nemcsak lymphomák, de akár más tumorok esetében is alkalmazható lehet, segítheti annak eldöntését, hogy az adott igazoltan magas mTOR aktivitású tumor esetében a rapalógok vagy dual inhibitorok (mTORC1 és C2-t; illetve Akt és mTORC1-t; vagy PI3K és mTORC1-et is gátló, jelenleg fejlesztés alatt álló szerek) alkalmazása ígér-e jobb terápiás eredményeket. Ez pedig hozzájárulhat a valódi egyénre szabott, célzott kezelések jövőbeni tervezéséhez.

Irodalomjegyzék

1. Bjornsti, M. A., Houghton, P.J.
The TOR pathway: a target for cancer therapy.
Nature Rev. Cancer 2004; 4, 335-348.
2. Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., Yonezawa, K.
Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action.
Cell 2002; 110 (2): 177-189.
3. Zhou¹, H., Huang, S.
The complexes of mammalian target of rapamycin.
Current Protein & Peptide Science 2011; 11 (6): 409–424.
4. Frias, M. A., Thoreen, C. C., Jaffe, J. D., Schroder, W., Sculley, T., Carr, S. A., Sabatini D. M.
mSin1 Is Necessary for Akt/PKB Phosphorylation, and Its Isoforms Define Three Distinct mTORC2s.
Current Biology 2006; 16 (18): 1865-1870.
5. Sarbassov, D.D, Guertin, D. A., Ali, S. M., Sabatini, D. M.
Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB.
Molecular Cell 2006, 22 (2): 159-168.
6. Laplante, M., Sabatini, D. M.
mTor signaling at a glance.
Journal of Cell Science 2009; 122: 3589-3594.
7. Baselga, J.
Target the Phosphoinositide-3 (PI3) Kinase Pathway in Breast Cancer.
The Oncologist 2011; 16: 12-19.
8. Sarbassov, D.D, Guertin, D. A., Ali, S. M., Sabatini, D. M.
Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex.
Science 2005; 307 (5712): 1098-1101.
9. Ogita, S., LoRusso, P.
Targeting phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)-Akt beyond rapalogs.
Targeted Oncology 2011; 6 (2):103-117.
10. Ryan, J., Dowling, O., Topisirovic, I., Fonseca, B. D., Sonenberg, N.
Dissecting the role of mTOR: Lessons from mTOR inhibitors.
Biochimica et Biophysica Acta 2010; 1804: 433–439.

11. Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., M. Powell, S., J. Riggins, G., K. V. Willson, J., Markowitz, S., W. Kinzler, K., Vogelstein, B., E. Velculescu, V.,
High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers
Science 2004; 30: 554

12. Nader Chalhoub, J. Baker, S.,
PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer
Annu Review of Pathology 2009; 4:127–150

13. Jingxiang, H., Shulin, W., Chin-Lee, W., D. Manning, B.
Signaling events downstream of mTOR complex 2 are attenuated in cells and tumors deficient for the tuberous sclerosis complex tumor suppressors
Cancer Research 2009; 69 (15): 6107–6114

14. 11. Markman, B., Dienstmann, R., Tabernero, J.
Targeting the PI3K/Akt/mTOR Pathway – Beyond Rapalogs.
Oncotarget 2010; 1 (7): 530–543.

15. García-Martínez, JM., Wullschleger, S., Preston, G., Guichard, S., Fleming, S., Alessi, DR., Duce, SL.
Effect of PI3K- and mTOR-specific inhibitors on spontaneous B-cell follicular lymphomas in PTEN/LKB1-deficient mice
British Journal of Cancer 2011; 104: 1116 – 1125

16. Sebestyén A., Márk Á., Hajdu M., Barna G., Nagy N., Varga V., Kopper L.
HT58 rapamycin can restore the negative regulatory role of TGFβ in high grade lymphomas
a cikk előkészületben

17. Márk Ágnes
mTOR jelátviteli út és aktivitásához kapcsolódó fehérjék vizsgálata Hodgkin-lymphomában
a kézirat előkészületben

18. Sebestyén A., Sticz T., Márk Á., Hajdu M., Botond T., Nemes K., Nagy N., Váradi Zs. Kopper L.,
Activity and complexes of mTOR in diffuse large B-cell lymphomas – a tissue microarray study
Modern Pathology 2012; elbírálás alatt

19. Argyriou, P., Economopoulou, P., Papageorgiou, S.
The Role of mTOR Inhibitors for the Treatment of B-Cell Lymphomas.
Advances in Hematology 2011; 2012: ID 435342.

20. Dutton, A., Reynolds, G. M., Dawson, C. W., Young, L. S., Murray, P. G.
Constitutive activation of phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cells through a mechanism involving Akt kinase and mTOR.
The Journal of Pathology 2005; 205 (4): 498-506.

21. Wang, X., Yue, P., Kim Y.A., Fu H., Khuri, F. R., Sun S.H. Enhancing Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)–Targeted Cancer Therapy by Preventing mTOR/Raptor Inhibition-Initiated, mTOR/Rictor-Independent Akt Activation. *Cancer* 2008; 68: (18): 7409- 7418.

22. Marzec, M., Liu, X., Wysocka, M., Rook, A. H., Odum, N. Wasik M.A. Simultaneous Inhibition of mTOR-Containing Complex 1 (mTORC1) and MNK Induces apoptosis of Cutaneous TCell Lymphoma (CTCL) Cells. *PloS one* 2011; 6 (9): e24849.

23. Jundt, F., Raetzl, N., Müller, C., Calkhoven, C.F., Kley, K., Mathas, S., Lietz, A., Leutz, A., Dörken, P. Arapamycin derivative (everolimus) controls proliferation through down-regulation of truncated CCAAT enhancer binding protein β and NF- κ B activity in Hodgkin and anaplastic large cell lymphomas. *Blood* 2005; 106 (5): 1801-1807.

24. P. Bhatt, A., M. Bhende, P., Sang-Hoon, S., Debasmita, R., P. Dittmer, D., Damania, B. Dual inhibition of PI3K and mTOR inhibits autocrine and paracrine proliferative loops in PI3K/Akt/mTOR-addicted lymphomas 2010; 115 (22): 4455-4463

25. Alvarado, Y., Mita, M. M., Vemulapalli, S., Mahalingam, D., Mita A. C. Clinical activity of mammalian target of rapamycin inhibitors in solid tumors. *Targeted Oncology* 2011; 6 (2): 69-94.

26. Wander, S. A., Hennessy, B. T., Slingerland, J. M. Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *The Journal of Clinical Investigation* 2011; 121 (4): 1231–1241.

27. M. Wolpin, B., F. Hezel, A., Abrams, T., S. Blaszkowsky, L., A. Meyerhardt, J., A. Chan, J., C. Enzinger, P., Allen, B., W. Clark, J., P. Ryan, D., S. Fuchs, C. Oral mTOR Inhibitor Everolimus in Patients With Gemcitabine-Refractory Metastatic Pancreatic Cancer *Journal of Clinical Oncology* 2009; 22 (2): 193-198

28. Mondesire, W. H., Jian W., Zhang, H., Ensor, J., Hung M. C., Mills, G. B., Bernstam, F. M. Targeting Mammalian Target of Rapamycin Synergistically Enhances Chemotherapy-Induced Cytotoxicity in Breast Cancer Cells. *Clinical Cancer* 2004; 10: 7031–7042.

29. Schatz, J. H. Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Non-Hodgkin’s Lymphoma: Results, Biology, and Development Strategies. *Current Oncology Reports* 2011; 13 (5): 398-406.

30. David A. Guertin and David M. Sabatini
The Pharmacology of mTOR Inhibition.
Science Signaling 2009; 2 (67): pe24.
31. Gutiérrez-García, G., Cardesa-Salzmman, T., Climent, F., González-Barca, E., Mercadal, S., L. Mate, H., M. Sancho, J., Arenillas, L., Serrano, S., Escoda, L., S., Martínez, Valera, A., Martínez, A., Jares, P., Pinyol, M., García-Herrera, A., Martínez-Trillos, A., Giné, E., Villamor, N., Campo, E., Colomo, L., López-Guillermo, A., (GELCAB) Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy
Blood 2011; 117 (18): 4836-4843
32. Favier, O., Heutte, N., Stamatoullas-Bastard, A., Carde, P., B. van't Veer, M., Aleman, B. M. P, Noordijk, E. M., Thomas, J., Ferme, C. Henry-Amar, M.
Survival After Hodgkin Lymphoma.
Cancer 2009; 115 (18): 1680–1691.
33. Macos-Gragera, R., Allemani, C., Tereanu, C., De Angelis, R., Capocaccia, R., Maynadie, M., Luminari, S., Ferretti, S., Johannesen, T. B., Sankila, R., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Simonetti, A., Martos, M. C., Råphael, M., Giraldo, P., HAEMACRE Working Group, Sant, M.
Survival of European parients diagnosed with lymphoid neoplasms in 2000-2002: results of the HAEMACARE project.
Haematologica 2011; 96 (5): 720-728.

Köszönetnyilvánítás:

Köszönöm A SE I. sz. Patológia és Kísérleti Rákkutató Intézetnek, Matolcsy András intézetvezető és Kopper László Professzor Úrának, hogy intéztében, laborjában folytathatom kutatásaimat. Köszönöm témavezetőmnek Dr. Sebestyén Annának és a Tumorbiológia (Kopper) laboratóriumban dolgozó munkatársaknak – Márk Ágnes, Csorba Gézáné, Dr. Sticz Tamás, Dr. Hajdu Melinda, Mallászné Bagi Györgyi; valamint Dr. Barna Gábornak, Sztodola Andrásnak, Varga Viktóriának.

Hallgatói Nyilatkozat

Alulírott Nagy Noémi, ELTE TTK Biológus Msc II. évfolyamos hallgató nyilatkozom, hogy a XXXI. Országos Tudományos Diákköri Konferenciára „mTOR (mammalian target of rapamycin) aktivitás, mint hemato-onkológiai terápiás célpont” címmel benyújtott pályamunka a saját munkám, a felhasznált irodalmakat a szerzői jogoknak megfelelően kezeltem.

Budapest, 2012. május 15.

.....Nagy Noémi sk.....

Hallgató aláírása