

XXXII. OTDK Biológia Szekció

**VASTAGBÉLDAGANATOK mTOR
(MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN)
AKTIVITÁSÁNAK ÉS mTOR-GÁTLÓK HATÁSÁNAK
VIZSGÁLATA**

Molnár Anna

ELTE TTK Biológia BSc III.
Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet,
Tumorbiológiai Labor

TÉMAVEZETŐ: Dr. Sebestyén Anna

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	3
ABSZTRAKT	6
BEVEZETÉS	7
Vastagbél-tumорок	8
Az EGFR- és PI3K/Akt/mTOR-útvonalak tumorbiológiai jelentősége, mint vastagbél-daganatok esetében támadható két terápiás célpont	9
EGFR	9
A PI3K-AKT-mTOR jelút	10
Az mTOR	13
Célzott terápiás szerek hatásmechanizmusai	13
EGFR-gátlók hatásmechanizmusa	13
mTOR-gátlók hatásmechanizmusa	14
CÉLKITŰZÉS	15
ANYAG ÉS MÓDSZER	16
Sejtenyésztés, in vitro kezelések	16
Proliferáció és apoptózis mérés	17
Immuncitokémia	17
Western blot	17
Immunhisztokémiai vizsgálatok (TMA)	18
Statisztikai elemzések	18
EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESÜK	19
Sejtvonalak kezeléseinek eredményei	19
A sejtvonalak mTOR aktivitásának jellemzése fehérje expressziós eredmények alapján	21
Immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei	21
ÖSSZEFOGLALÁS	25
TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	27
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	28
ÁBRÁK FORRÁSAI	28
IRODALOM	29

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

4EBP1: 4E-kötő fehérje

ABC: aktivált B-sejtek

ACC: acetyl-CoA karboxiláz

ACLY: ATP citrate lyase

AKT: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog

AMPK: AMP activated protein kinase

ATG1: autophagy-related protein kinase 1

BAD: Bcl-2-associated death promoter protein

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

BCR: B-sejt receptor

B-Raf: B-rapidly accelerated fibrosarcoma proto-oncogene serine/threonine-protein kinase

CD19: Cluster of Differentiation 19 (B-limfocita antigén)

c-myc: cellular myelocytomatosis oncogene (proto-oncogene protein)

DAB: Disabled-1 protein

DEPTOR: DEP domain-containing mTOR-interacting protein

Dvl: Dishevelled protein

EGFR: epidermális növekedési faktor receptor

elf4B: elongációs faktor-4B

ErbB3: Proto-Oncogene-Like Protein C-ErbB-3

ERK: extracellular signal-regulated kinase

FASN: Fatty acid synthase

FGFR: fibroblast growth factor receptor

FIP200: FAK-family interacting protein of 200 kDa

FKBP12: FK506 kötő fehérje 12

FKHR: forkhead transzkripció faktor

FOXO: Forkhead transzkripció faktor

FRB-domén: FK506-rapamycin kötő domén

G6PD: glükóz-6-foszfát dehidrogenáz

GAB1: GRB2-associated-binding protein 1

GRB: Growth factor receptor-bound protein

GSK: glikogén-szintáz-kináz

HIF1 α : hypoxia indukálta faktor 1 α

IGFR: inzulinszerű növekedési faktor receptor

IKK β : Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta

INS: inzulin

IRS: inzulin receptor szubsztrát

JAK: Janus kináz

K-RAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LKB1: liver kinase B1

LRP: alacsony denzitású lipoprotein-receptorhoz kapcsolódó fehérje

MAPK: mitogen activated protein kinase

MET: mezenchimális-epiteliális átmenet

mLST8: mammalian lethal with sec-13 protein 8

MMP: mátrix metalloproteáz	Raptor: regulatory-associated protein of mTOR
MO25: Mouse protein - 25	REDD: transcriptional regulator RedD protein
mSin1: mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1	RHEB: Ras homolog enriched in brain
mTOR: mammalian target of rapamycin	Rictor: rapamycin insensitive companion of mTOR: mammalian/mechanistic target of rapamycin
mTORC1: mTOR-komplex 1	RSK: ribosomális fehérje S6 kináz
mTORC2: mTOR-komplex 2	RTK: receptor tirozin kináz
NFκB: nuclear factor κB	S6K1: ribosomális S6 kináz 1
OVS: overall survival	SD1: S-receptor-like serine/threonine-protein kinase
p27Kip: P27-like cyclin-dependent kinase inhibitor	SDS: Na-dodecil-szulfát
p53: tumor protein-53 / tumor szuppresszor-53	SGK1: serum/glucocorticoid-regulated kinase 1
PDK: 3-foszfoinozítid-függő protein-kináz	SHIP2: inozitol-5'-foszfátáz-2
PGD: foszfoglükonát dehidrogenáz	SOS: son of sevenless
PI3K: fosztfatidilinozitol-3 kináz	SREBP1: Sterol regulatory element-binding protein
PI3KCA: PI3K p110α alegységét kódoló gén	STAT: Signal transducer and activator of transcription
PIKK: fosztfatidilinozitol-3 kinázhoz kapcsolódó fehérjék	STRAD: STE20-related adapter protein
PIP2: fosztfatidilinozitol-biszfoszfát	SYK: spleen tyrosine kinase
PIP3: fosztfatidilinozitol-triszfoszfát	Tel2: Telomere length regulation protein
PKB: protein kináz B	TGFβ: transzformáló növekedési faktor β
PKCα: Protein kináz C α	TKR: tirozin kináz receptor
PLCγ: foszfolipáz-gamma-1	TLR: Toll-like receptor
PRAS40: proline-rich AKT substrate of 40 kDa	TMA: tissue micro array
PTEN: phosphatase and tensin homolog	TNFα: tumor nekrosis faktor α
PVDF: polyvinylidene difluoride	TOR: target of rapamycin
Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	

TSC1/2: Sclerosis tuberosa komplex 1/2

TSC1: hamartin

TSC2: tuberin

Tti1: TELO2-interacting protein 1

ULK1: Unc-51-like kinase 1

VEGF: vaszkuláris növekedési faktor

VEGFR: vaszkuláris növekedési faktor
receptor

Wnt: wingless-related MMTV integration
site 1

ABSZTRAKT

A vastagbél tumorok esetében gondot jelent a kezelésekkel szembeni rezisztencia. Daganatokban az mTOR-kináz működési zavara hozzájárulhat a sejtek korlátlan szaporodásához. Az mTOR kétféle, gátlószereivel szemben eltérő érzékenységgű komplexben (mTORC1/C2) fordulhat elő.

Humán vastagbél daganatos esetekben vizsgáltuk az mTOR aktivitását és sejtvonalakban (eltérő terápiás érzékenységgű, különböző mutációkkal rendelkező) az mTOR gátlószereinek (rapamycin, PP-242, NVP-BEZ-235) hatásait, az érzékenységek különbségek hátterét. A sejtekben az mTOR- és EGFR-gátló kombinációs kezelések proliferációs hatásait alamar blue-teszt segítségével mértük. Az mTOR aktivitását és a komplexeket jellemző fehérjék mennyiségét immuncito- és immunhisztokémiai módszerekkel vizsgáltuk.

Kimutattuk, hogy humán vastagbél tumorok 70%-ában az mTOR aktivitás fokozott, és ez közel 50%-ban Rictor (mTORC2-es komplex) overexpresszióval jár együtt. In vitro a mTORC1- és C2-komplexeket is gátló kezelések hatékonyabbak voltak azokban a sejtvonalakban, ahol a Rictor fokozott mennyiségét tudtuk kimutatni, alacsony Raptor expresszió mellett. Ezért a Rictor fehérje mennyisége (az mTORC2-komplex dominanciája) fontos szerepet játszhat az mTOR-gátló kezelések hatékonyságában.

Eredményeink alapján az mTOR-komplexek aktivitása fontos terápiás célpont lehet vastagbél daganatokban. Ennek meghatározását, az egyénre szabott kezelések tervezését egy új diagnosztikai eljárással –melynek kidolgozása célunk- segíthetjük.

Támogatás OTKA-84262.

BEVEZETÉS

Napjainkban a vastagbél-daganatok a nők körében a harmadik, férfiaknál pedig a negyedik leggyakoribb rákos megbetegedés a világon¹. Több mint 1,2 millió embert érint ez a daganatos megbetegedés (GLOBOCAN)². Az elmúlt évtizedben új molekuláris célpontokat és a tumorok kialakulásához és fejlődéséhez kapcsolódó, azokban részt vevő szabályozási zavarokat azonosítottak, így új célzott gyógyszereket tudtak kifejleszteni. Ez az úgynevezett célzott (targeted) terápia olyan molekuláris hibákat támad, melyek a daganat növekedését segítő fehérjék megváltozott funkcióiért és a sejtműködés-szabályozási zavarokért lehetnek felelősek. Bizonyos tumorok esetében a terápiás eredmények sikeresek, de több esetben nem várt toxikus tünetek és rezisztencia problémák jelentkeztek, jelentkeznek. A rezisztencia molekuláris okait kutatva, újabb mutációkat, új megkerülő mechanizmusokat írnak le³.

Az említett célzott terápiák egyik legismertebb célpontja a PI3K-AKT-mTOR jelátviteli útvonal. Ez az útvonal szinte minden, jeleket átvevő és közvetítő receptorral kapcsolatban áll (1. ábra), a legtöbb sejtfunkció szabályozásában részt vesz, pl. túlélés/apoptózis, specifikus sejtfunkciók (proliferáció, differenciáció, stb.) vagy a funkciók ellátásához szükséges tápanyag- és oxigénellátás. Nem véletlen, hogy ha ebben a jelútban valamilyen szabályozási zavar történik, akkor olyan kóros folyamatokat befolyásolhat, mint a daganatok keletkezése, növekedése és terjedése⁴.

A daganatsejtek korlátlan osztódását, növekedését elősegítő mutációk közül több érinti (pl. PI3KCA, PTEN, TSC1/2) az előbbi szabályozási hálózat, a PI3K/AKT/mTOR útvonal elemeit, így szerepet játszhat az mTOR (mammalian target of rapamycin) kináz aktivitásának fokozódásában (1. ábra). Célzott terápiák egyik célpontja lehet az mTOR kináz aktivitás is⁵. Az mTOR kétféle fehérjekomplex formájában fordul elő: mTORC1 és mTORC2. A jelenlegi klinikai gyakorlatban az mTORC1-gátlókat (rapamycin származékokat (rapalógokat): rapamycin, everolimus, temsirolimus) immunszuppresszív hatásuk miatt szervtranszplantációban, míg daganatellenes hatásukat rossz prognózisú vesesejtes daganatokban, köpenysejtes lymphomákban és bizonyos emlő carcinomákban használják ki^{6, 7}. Klinikai vizsgálatok számos daganat esetében folynak, sajnos sok esetben a várt hatás nem mutatható ki (rezisztencia). Ennek a rezisztenciának magyarázata lehet az egyedi eltérést mutató mTORC1/C2-komplex-arány. Ugyanis, pl. ha csak mTORC1-gátlás történik, az mTORC2 fennmaradó aktivitásán keresztül az AKT-útvonal hatásai

fokozódhatnak is vagy más negatív visszacsatolások eshetnek ki, így az mTOR gátlásával akár ellentétes hatások is tapasztalhatók. Emiatt az mTORC2-komplexet is gátló szerek (mTOR-kináz-gátlók), valamint úgynevezett kettős (PI3K-mTOR) gátlószerek fejlesztése, tesztelése zajlik⁸.

Vastagbélrákban már vannak fáziskísérletek az mTOR-gátlók klinikai hatásosságáról, viszont, hogy milyen összefüggés van a jelenlegi terápiás beavatkozások sikere/sikertelensége és a két komplex aktivitása között kevés, ellentmondásos adat áll rendelkezésre.

VASTAGBÉLTUMOROK

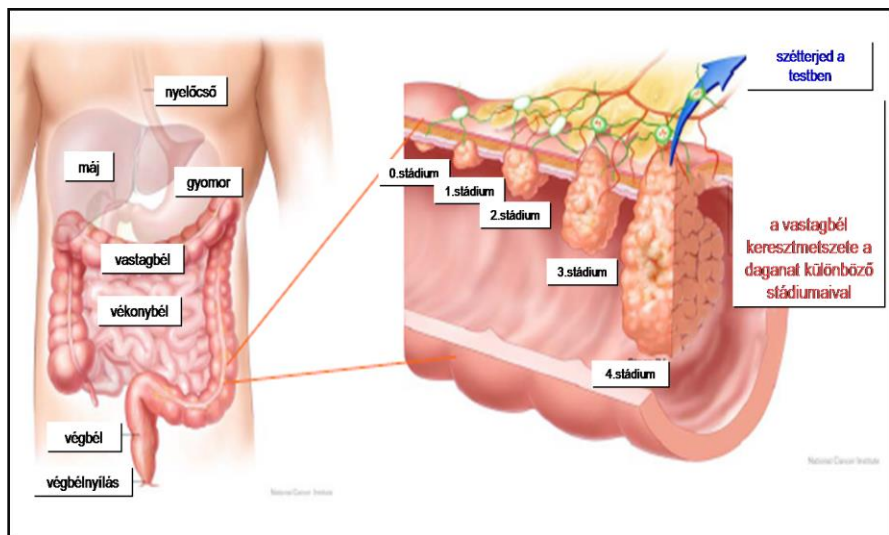
A vastagbélrák kialakulásában genetikai és környezeti hatások egyaránt részt vesznek. Kialakulásuk közben éveken át tünetmentesek, fokozatosan jelennek meg. Kialakulásuk két legfontosabb mechanizmusa az adenoma-carcinoma átalakulás (polipok talaján alakulnak ki), ill. a DNS-repair gének defektusával (mikroszatellita instabilitás) jellemezhető. A tumorok a differenciáltság különböző fokát mutató, többnyire mirigyeket formáló daganatsejtekből állnak. Ezek növekvő polipok vagy körkörös, a béllument szűkítő elváltozások formájában jelenhetnek meg (1. kép). Kórlefolyásuk

legfontosabb független tényezője a tumor kiterjedése (stage), amelyet a diagnózis felállításakor határoznak meg.

A kemoterápiás kezelés megválasztásához elengedhetetlen a betegség stádiumának ismerete.

Adjuváns kemoterápia

elsősorban nyirokcsomó áttétekkel járó esetekben indokolt. Ha a daganat nem terjedt át a bélfalon, rutinszerűen nem végeznek kemoterápiát, rendszerint sebészi kezeléssel meggyógyíthatók. A rosszabb stádiumú betegekben a műtétet követően kötelező az adjuváns kezelés, végül szisztémás kemoterápia alkalmazható (a különböző kezelési protokollokban előforduló szerek: 5-fluorouracil, leucovorin, oxiplatin, irinotecan)⁹.



1. kép A vastagbélrák stádiumai

Az előrehaladott vastagbélrák kezelésében újabb lehetőség a molekuláris célzott terápia (target-kezelés): a véréreképzést gátló antitestek csoportjából a bevacizumab; a növekedési faktor-receptor (EGFR)-gátló antitestek közül a cetuximab és a panitumumab alkalmazása lehetséges⁹.

AZ EGFR- ÉS PI3K/AKT/MTOR-ÚTVONALAK TUMORBIOLÓGIAI JELENTŐSÉGE, MINT VASTAGBÉLDAGANATOK ESETÉBEN TÁMADHATÓ KÉT TERÁPIÁS CÉLPONT

A daganat fejlődése során és a különböző génhibák felhalmozódásával párhuzamosan különböző „hibakészletű” daganatsejtcsoportok alakulhatnak ki. Ebben a heterogén sejtpopulációban a szelekciós mechanizmusokon keresztül a különböző kezelések mellett a sejtek terápiával szembeni szerzett rezisztenciájának valószínűsége nagyobb.

Fontos megismerni az adott daganatban a legfőbb molekuláris hibákat, és a terápia során ezeket célozni, így gátolni a tumor növekedését és terjedését. Az említett heterogenitás miatt, egyetlen fajta célzott beavatkozástól hosszan tartó terápiás hatás nem valószínű, inkább eltérő célpontok elleni terápiás szerek kombinált használata eredményezhet hosszabb távú megoldást. Ha egy daganat a várakozásokon felül jól reagál valamely szerre, feltételezhetjük, hogy az éppen támadott molekuláris célpont az adott daganat túléléséhez nélkülözhetetlen³.

A következőkben olyan, ligandokban/receptorokban vagy jelutakban jelentkező molekuláris hibákról lesz szó, melyek e dolgozat szorosabb témájához kapcsolódnak és a kísérletekben használt kezelések céljainak megértéséhez elengedhetetlenül fontosak. A jelátviteli utak leírásának könnyebb megértését segíti az 1. ábra!

EGFR

Az EGFR (epidermal growth factor receptor)-család tagjai (EGFR1, -2, -3, -4) transzmembrán, tirozin-kináz-receptorok. Attól függően, hogy milyen ligandot kötnek, melyek a dimerizációs partnerek és melyik részén foszforilálódik, különböző jelátviteli utak aktiválódhatnak: leggyakrabban a RAS-út és a PI3K-út, emellett a JAK/STAT-út és a PLC γ (1. ábra).

Az EGFR-út szabályozása a következő okok miatt szenvedhet zavart, például: ha az EGFR ligandjai és/vagy maga a receptor fokozottan termelődik; vagy ha a receptor a ligand kötése nélkül is képes aktiválódni és a jelutat elindítani; vagy ha az egyik aktivációs ponton a fehérje

folyamatosan regulált állapotban marad (mert mutáns, vagy mert nem inaktiválódik vagy mert nem bomlik le); vagy az ezt az útvonalat gátló molekula szabályozó funkciója kiesik.

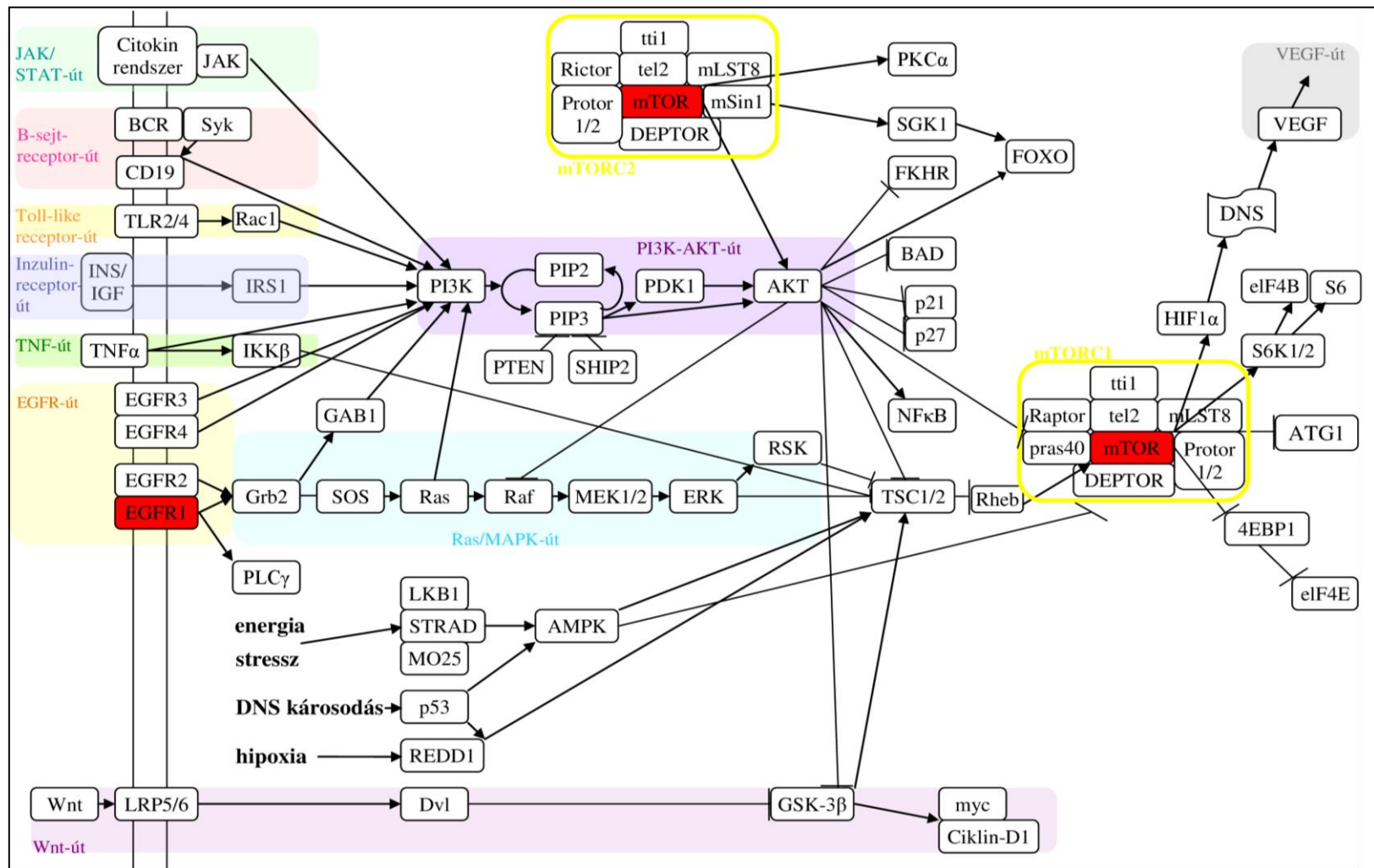
A PI3K-AKT-úthoz közvetlenül és közvetetten is kapcsolódnak az EGF-receptorok: az EGFR1 és EGFR2 a GRB2 és a GAB1-en keresztül, az EGFR3 és -4 viszont közvetlenül kötődik a PI3K p85 alegységhez, és így képes aktiválni (1. ábra). Az utóbbi egyben „menekülési utat”, azaz rezisztenciát is jelenthet a daganatsejtek számára, amikor a többi EGFR-családtagot támadó tirozin-kináz-gátlót alkalmaznak. Ez a jelenség részben az EGFR1-et támadó monoklonális antitestekkel (ilyen pl. az általunk is használt cetuximab) szembeni rezisztenciáért is felelős lehet. Ilyen esetekben az EGFR3 aktiválása más tirozin-kináz-receptorokhoz (pl. MET) köthetők^{3,15}.

A PI3K-AKT-MTOR JELÚT

A PI3K (foszfatidil-inozitol-3-kináz) a receptorokról érkező jelek egyik legfontosabb átkapcsoló állomása, és így szinte minden sejtfunkcióval kapcsolatban áll és a daganatsejtek túlélésének, szaporodásának, terjedésének szabályozásában is részt vesz. A jelek több irányból érkezhetnek, így pl. az EGFR, IGFR, FGFR, hormonok (ösztrogén, pajzsmirigyhormonok), vitaminok, integrinek, intracelluláris kalcium és a RAS-függő MAPK-út felől³. Az aktivált PI3K elősegíti a PIP₃ keletkezését, ami képes kötni és aktiválni a PDK1-t. A PDK1 felelős az AKT aktiválásáért. A PI3K-utat a PTEN (tumorszupresszor) és a SHIP2 gátolja (a PIP₃ szintjén), melynek során a PIP₃-at defoszforilálják PIP₂-vé¹⁰.

Az AKT egy szerin-treonin-kináz, mely a PI3K-ról érkező jel egyik központi továbbítója. A sejt túlélése és proliferációja nagyban függ az AKT működésétől. Az AKT-nak számos funkciója van, pl. a daganatsejtek túlélését biztosítja a p21 és p27 gátlásával, a ciklin-D1 termelésének és stabilizálásának elősegítésével (proliferáció támogatása), a BAD és a hasonló FKHR gátlásával, az NFκB aktiválásával. Az AKT az mTORC1-kompleksszel is kapcsolatban van, ami kiemelkedő fontosságú a daganat szempontjából. Ez a komplex csak részben áll a PI3K-AKT-út szabályozása alatt, mert aktivitását számos más irányból (pl. növekedési faktorok, a sejt energiaállapota, tápanyag- és oxigénellátottság) érkező jelek is befolyásolják. Az mTORC2-komplex az AKT-ot aktiválja¹⁰.

Az mTOR (melynek részletes elemzése a következő alfejezetben található) tehát két komplexben fordul elő. Az mTORC1 a fentebb említetteken kívül másik úton keresztül is aktiválódhat még a cAMP-kináz és a TSC1 és -2 komplex felől.

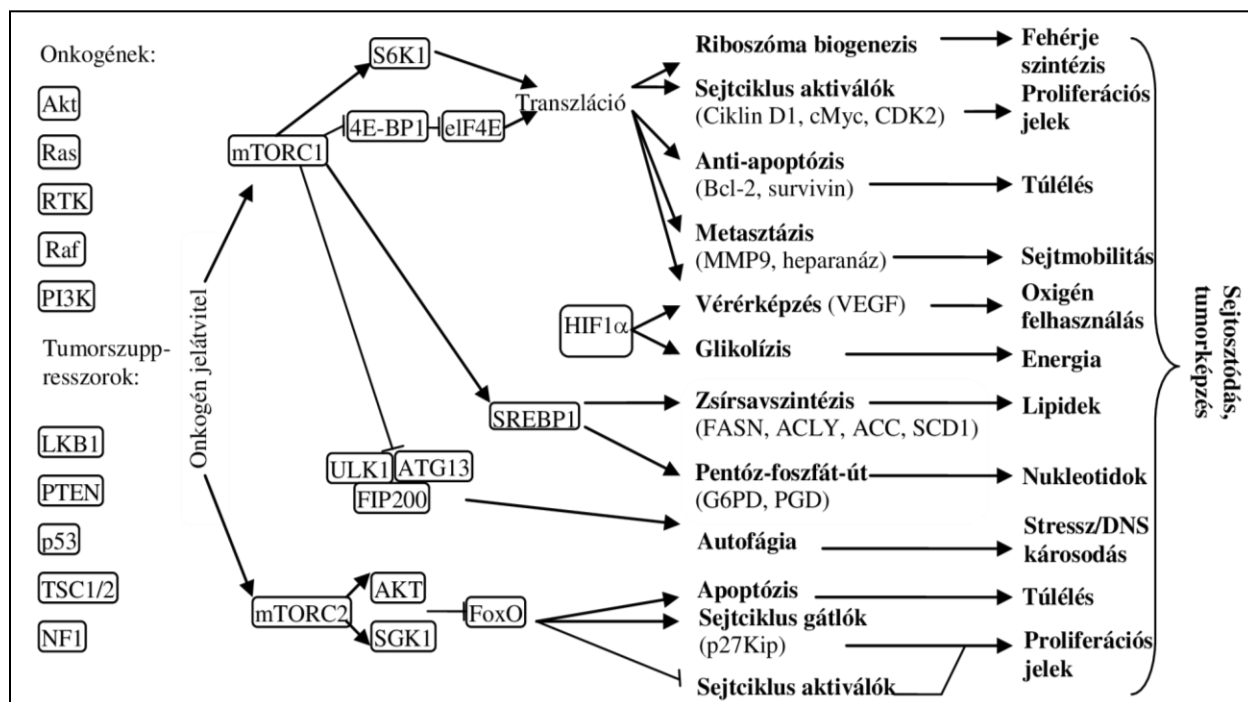


1. ábra Az mTOR-komplexekhez kapcsolódó fontosabb jelátviteli útvonalak

Ez az út a RHEB-et inaktiválja, ezáltal gátolja az mTOR-kinázt, ha nincs elegendő táplálék és energia¹¹. A két mTOR-komplex eltérő szubsztátokat foszforilál. Az mTORC1 fokozza a cap-függő transzláció elindulását két fő célpontján keresztül: 4E-BP és az S6-kinázok (S6K1 és -2), ezáltal befolyásolja a proliferációt. Az S6-kinázok valószínűleg az eIF4B-n és a PDCD4-en keresztül szabályozzák a transzlációt. Az mTOR foszforilációja gátolja a 4E-BP-család tagjait, melyek gátolnák a transzlációt, (az eIF4E-hez való kötődéssel)¹⁰.

Az mTORC2 pontos működése kevésbé ismert, mint a C1-komplexé. A citoskeletális rendszer szerveződését segíti a PKC α foszforilálásával, a stressz rezisztencia, metabolizmus és sejtciklus leállító gének átírását indukálja a FoxO1 és FoxO3 transzkripciós faktorokon keresztül. Mindemellett, az mTORC1-útvonal aktiválását is képes befolyásolni az AKT fehérjén keresztül¹².

Az mTOR-jelút onkogének általi aktiválása számos folyamatot indukál a daganatsejtek növekedéséhez, túléléséhez és szaporodásához (2. ábra)¹⁰. A PI3K-út folyamatosan aktivált igen sok humán daganatban^{11, 12, 17}.



2. ábra Az aktivált mTOR-komplexek hatásai a daganat növekedésére, túlélésére, szaporodására¹⁰

AZ MTOR

Az mTOR (mammalian target of rapamycin) egy szerin-treonin-kináz, a foszfatidil-inozitol-3-kináz kináz (PIKK) családba tartozik, amely rendkívül fontos és központi szerepet játszik a sejtek anyagcseréjének, növekedésének és osztódásának szabályozásában¹⁰. Az mTOR szabályozásának zavarai számos betegség kialakulásában játszanak fontos szerepet pl. tumorok kialakulása, 2-es típusú cukorbetegség, elhízás és neurodegeneráció¹⁰. Az mTOR fontos szereplő lehet még az élettartam szabályozásában (több állatfajban kimutatták, hogy gátlása jelentősen növelte az élethosszt, valamint funkcióvesztéses mutációja *Drosophila melanogaster*-ben és *Caenorhabditis elegans*-ban is letális embrionálisan⁵).

A TOR kinázt először gátlójának (rapamycin) felfedezését követően élesztőben azonosították¹³. Eukariótákban a TOR egy evolúciósan erősen konzervált fehérje, emlősökben a TOR-t egy gén kódolja. Maga az mTOR fehérje egy több doménből felépülő kináz: a katalitikus kinázdomén, az FKBP12-rapamycin kötő domén, a represszordomén, az N-terminushoz közeli tandem ismétlődő HEAT motívumok, valamint az aktiválást elősegítő FAT és a C-terminusnál lévő FATC domének építik fel⁵. Az mTOR kináz, eddigi ismereteink szerint, a sejteken belül két különböző komplex formájában fordul elő: mTORC1 és mTORC2. Az mTORC1-komplex tagjai (1. ábra): az mTOR, mLST8/GβL, PRAS40, DEPTOR, Tti1/Tel2-komplex és a két komplex között a legfontosabb különbséget jelentő Raptor. Az mTORC2-komplex felépítő fehérjei (1. ábra) az mTOR-on kívül a Rictor, mLST8/GβL, mSIN1, Protor1/2, Tti1/Tel2-komplex és DEPTOR¹⁰.

CÉLZOTT TERÁPIÁS SZEREK HATÁSMECHANIZMUSAI

Kísérleteink során az EGFR-t gátoltuk cetuximabbal és gefitinibbel, az mTOR-t pedig rapamycinnel, PP-242-vel és NVP-BEZ235-tel, ezért csak ezeknek a szereknek elemezzük a következőkben a hatásmechanizmusát.

EGFR-GÁTLÓK HATÁSMECHANIZMUSA

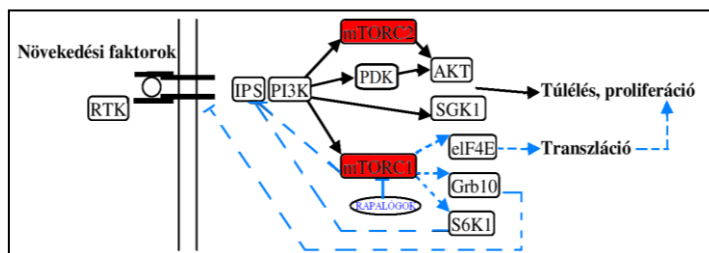
Az EGFR1 extracelluláris doménje elleni rekombináns monoklonális antitestek egyik legismertebb tagja a **cetuximab (Erbixux)**, amely egér/humán hibrid IgG1-típusú monoklonális kiméra antitest. A receptor normális ligandjaihoz (EGF, TNFα) képest a cetuximab jobban kötődik a receptor extracelluláris doménjéhez. A szer kötődésekor a receptor internalizálódik és lebomlik, így az nem foszforilálódhat és aktiválódhat. Gátolja a daganatsejtek proliferációját,

migrációját, a vérképzést. A daganatok közül elsősorban vastagbélrák, fej-nyak rákok és tüdődaganatok ellen alkalmazzák. Alkalmazásának egyik legfontosabb feltétele, hogy az adott daganatban ne legyen KRAS-mutáció, mert ez -az EGFR-gátlás ellenére- már önmagában átveszi a jelátviteli út aktiválásának szerepét^{3, 14}.

Az EGFR elleni kis molekulású tirozin-kináz-gátlók közül az egyik legjobban jellemzett a **gefitinib (Iressa)**. Az EGFR1 intracelluláris részén levő ATP-kötő helyekre kötődik be és ezzel kompetitíven akadályozza a receptor foszforilációját. Könnyebben bejut a tumorszövetbe és a -sejtekbe, mint a monoklonális antitestek, és elvileg hatékony lehet akkor is, ha a receptor extracelluláris részén az antitestkötő domén hiányzik^{3, 15}.

MTOR-GÁTLÓK HATÁSMECHANIZMUSA

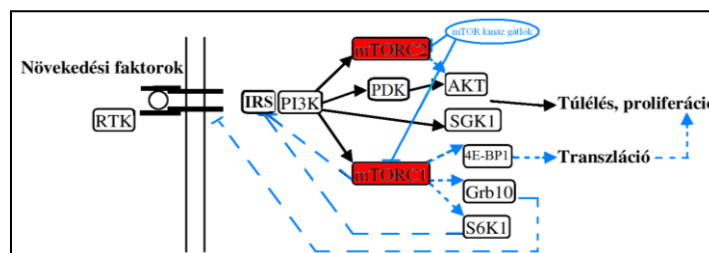
A **rapamycin** a legismertebb mTOR-gátló. Ez egy makrolid antibiotikum, melyet a Rapa-Nui szigetéről származó *Streptomyces hygroscopicus* baktériumfajból izoláltak. A sejten belül az FKBP12-höz kapcsolódik, az mTOR FRB-doménjéhez köt és ezáltal szelektíven gátolja az mTORC1 funkcionális működését. A rapamycin



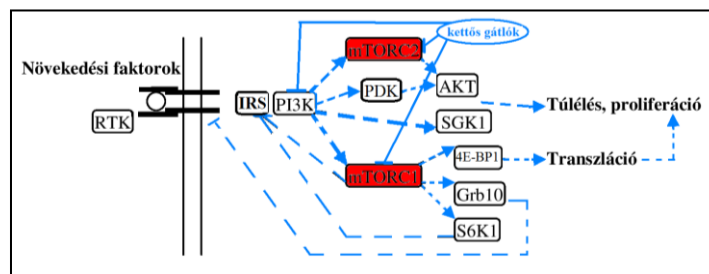
3/A. ábra A rapalógok hatásmechanizmusa¹⁰

hatását az mTORC1-komplex funkcióival kapcsolatosan igazolták, az mTORC2-re gyakorolt hatásai vitatottak, alapvetően rapamycin rezisztensnek tartják^{5, 16}.

A rapamycin és analógjai (rapalógok) limitált hatékonyságát a számos negatív visszacsatolás okozhatja, ugyanis, ha az mTORC1 gátlásával ezek a negatív visszacsatolások kiesnek, akkor a PI3K/AKT-út zavartalanul működhet¹⁷ (lásd 3/A ábra!).



3/B. ábra Az mTOR-kináz-gátlók hatásmechanizmusa¹⁰



3/C. ábra A kettős gátlók hatásmechanizmusa¹⁰

Ha rapalógokkal csak az mTORC1-t gátoljuk, az mTORC2-komplex még képes az AKT-ot foszforilálni és így

korlátozhatja a rapalógok hatását (3/A ábra). Ezért kifejlesztettek olyan ATP-kompetitív molekulákat (ezek közül mi a **PP-242**-t használtuk), melyek közvetlenül az mTOR kináz aktivitását, tehát mindkét komplexet gátolják (3/B ábra)⁸. Fontos azonban látni, hogy a rapalógokhoz hasonlóan, ezeknek az mTOR-kináz-gátlóknak a hatását is ronthatják a negatív visszacsatolások. Az mTOR-kináz-gátlók hatására megemelkedett RTK-PI3K-PDK1 aktivitás elősegítheti az AKT foszforilációját, ami így a sejt túléléséhez vezethet¹⁰.

Az mTOR és a PI3K katalitikus doménjeinek hasonlóságát kihasználva, kifejlesztettek olyan molekulákat, melyek egyszerre gátolják az mTORC1-t, C2-t és a PI3K-t vagy az Akt-ot is (3/C ábra). Ezáltal gátolják az AKT, S6K1 és a 4E-BP1 foszforilálódását is. Ilyen kettős (dual) gátlószer az általunk is használt **NVP-BEZ235 (Novartis)**¹⁰.

Vastagbélrákok kb. 80 %-ában fokozottan termelődik az EGFR, melyről feltételezték, hogy kiemelkedő szerepe lehet a daganat kialakulásában és progressziójában. Ezért a klinikumban EGFR1-gátló monoklonális antitesteket (cetuximab, panitumumab) alkalmaznak vastagbélrákok kezelésében. A kísérleteinkben is használt cetuximabot olyan betegeknél használják, akiknek EGFR1-et expresszáló, KRAS vad típusú áttétképző vastagbélrákjuk (illetve fej-nyak laphámrákjuk) van³. Annak ellenére, hogy a kismolekulasúlyú EGFR-gátlók (mint az általunk használt gefitinib) érdemleges klinikai hatást nem mutattak, sejttenyészeteken végzett kezeléseink során a gefitinib legalább olyan hatékony volt, mint a cetuximab.

Vastagbélrákokban kevés adat áll rendelkezésre arról, hogy mTOR-gátlók hogyan befolyásolják a betegek kezelésének hatékonyságát, illetve egyéb kezelések hatásossága összefüggésben áll-e tumorsejtekben az mTORC1/C2 komplexek arányával.

CÉLKITŰZÉS

- Különböző mutációkkal rendelkező humán vastagbél-tumor-sejtvonalak mTOR-gátlókkal szembeni érzékenységének vizsgálata
- Fokozható-e/érzékenyíthető-e az EGFR-gátlók hatása mTOR-gátlókkal kombinált kezelésekkel?
- Humán vastagbél-daganatok mTOR aktivitásának és az mTORC1-, C2-komplexekre jellemző fehérjék expressziójának vizsgálata és összevetése a betegek klinikai és túlélési adataival

ANYAG ÉS MÓDSZER

SEJTNYÉSZTÉS, IN VITRO KEZELÉSEK

In vitro sejtnyészeteken végzett kísérleteinket a következő hat humán vastagbél-tumor-sejtvonalon végeztük: RKO, Colo-205, CaCo-2, SW620, HCT116, GC3.

A COSMIC (Catalogue of somatic mutations in cancer) adatbázisa alapján a témánkhoz kapcsolódó következő (1. táblázat) mutációkkal^{1*} rendelkeznek ezek a sejtvonalak. Ezeknek az adatoknak a megerősítése, illetve a CaCo-2 és

sejtvonal	RKO	Colo-205	CaCo-2	SW620	HCT116	GC3
mutáns gének*	BRAF, mTOR	BRAF, PIK3C2A	nincs adat	KRAS	BRAF, ERBB3	nincs adat
NEM mutáns gének*	KRAS, AKT	AKT, EGFR	nincs adat	BRAF	EGFR, AKT, mTOR, MAPK	nincs adat

1. táblázat A vizsgált sejtvonalaink mutáns, ill. nem mutáns génjei a COSMIC adatbázisa szerint*

GC3 esetében a mutációk vizsgálatát megkezdjük.

A sejteket 10% (CaCo-2 esetében 20%) hő-inaktivált főtális borjú savót (FCS-Gibco, HyClone) és 1% antibiotikumot (penicillin, streptomycin, Sigma) tartalmazó RPMI 1640 médiumban (CaCo-2 esetében HMEM, Gibco, HyClone) tenyésztettük. A sejtnyészeteiket 5% CO₂ mellett 37 °C-on tartottuk termosztátban.

A 72 órás *in vitro* kezeléseket 96-lyukú plate-ken végeztük. A kezelőszereket 24 órával a kirakás és letapadási idő után adtuk a sejtekhez, a gefitinib-kezelést naponta ismételtük.

EGFR-gátló monoklonális antitestet (cetuximab), EGFR-gátló kis molekulású gátlót (gefitinib), mTORC1- (rapamycin), mTORC1-, C2- (PP-242) és PI3K/mTOR-kettős gátlót használtunk (NVP-BEZ235) (2. táblázat).

	kezelőszér	típusa	kísérleteinkben használt koncentráció
EGFR-gátlók	CETUXIMAB	monoklonális antitest	10 µg/ml
	GEFITINIB	kis molekulású gátló	5 µM
mTOR-gátlók	RAPAMYCIN	mTORC1-gátló	50 ng/ml
	PP-242	mTORC1-, C2-gátló	25 mM
	NVP-BEZ235	PI3K/mTOR-kettős gátló	1µM

2. táblázat A kísérleteinkben használt kezelőszerek és használt koncentrációik

*Az 1. és 3. táblázat "mutáns gének" és "NEM mutáns gének" névvel jelölt soraiban olyan géneket gyűjtöttünk össze, melyek ismert, a jelátviteli folyamatok szempontjából fontos mutációkkal rendelkezhetnek

PROLIFERÁCIÓ ÉS APOPTÓZIS MÉRÉS

A kezelések proliferáció gátló hatásait Alamar Blue-tesztel mutattuk ki. Az Alamar Blue oldatot (resazurin, 7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one- 10-oxide, Life Technologies) 10 µg/ml végső koncentrációban alkalmaztuk és 37 °C-on, 5%-os CO₂ tartalmú termosztátban inkubáltuk a sejtekkel 4 óráig. A metabolikusan aktív sejtek átalakítják a reagenst, így a festék színe a sejtek proliferációjától függően változik. Az inkubációs idő elteltével a minták fluoreszcencia értékeit spektrofotométer segítségével mértük le (abszorbancia mérés: 570-590 nm, Ascent szoftver, Fluoroskan Ascent FL, Labsystems).

A kezelések apoptotikus hatásait áramlási citométer (FACS) segítségével is vizsgálhatóak, ezek eredményeit a dolgozatban még nem mutatjuk be.

IMMUNCITOKÉMIA

Az immuncitokémiai festéshez a metanol fixált (80%-os, -20°C, 10') cytospineket, endogén peroxidáz (Na-borohidrid-oldat 10', perjódsavas oldat 10', 30 %-os hidrogén peroxidáz és metanol 1:9 arányú keveréke 20') és lószérumos blokkolást (3%-os, 30') követően különböző elsődleges ellenanyagokkal inkubáltuk (4°C-on, éjszaka) az alábbi hígításokban: anti-foszfo-S6 - 1:100 és anti-foszfo-mTOR - 1:50/1:25 (Cell Signaling); anti-ricor - 1:300; anti-raptor - 1:100, (Leica, Novocastra/Peptrotech). A detektálás Novolink (Novocastra) polimer rendszerrel, a vizualizálás DAB-al (Dako), a háttérfestés hematoxilinnal történt. A kiértékelés a festődés intenzitása alapján történt.

WESTERN BLOT

A sejteket SDS minta pufferben lizáltuk, majd 15 percig 20000 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk. Az egyes minták fehérjetartalmát (Qubit Fluorométer, Invitrogen) meghatároztuk. 10-150µg mennyiségű fehérjét a protokollnak megfelelően 8-15%-os SDS gélen elektroforézissel elválasztottuk, majd PVDF membránra (BioRad) blottoltuk. Blokkolást követően a membránt anti-foszfo-S6 (1:1000, p-S6, Ser235/236) (Cell Signaling) és anti-Rictor (1:1000, Abcam) ellenanyagokkal inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on. Vectastain Elite ABC másodlagos előhívó kitet (Vector) használtunk, majd a membránokat kemilumineszcens előhívással (ECL Western Blotting Substrate, Pierce) és KODAK Image Station 4000 MM kamerával (Eastman Kodak) fényképeztük. A minták összehasonlíthatóságát a minták β-aktin

expressziójának (1:2500 Sigma) vizsgálatával is ellenőriztük a blottok újrafelhasználásával (ReBlot-oldat, Millipore).

IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATOK (TMA)

A Tissue Micro Array (TMA) lemezeken végzett immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatokba is bekapcsolódhattam munkám során. Az mTOR aktivitását jellemző foszfo-proteinek (p-mTOR, p-S6,) és az mTORC1-komplekre jellemző Raptor fehérje, ill. az mTORC2-komplekre jellemző Rictor expresszióját 103 esetben vizsgáltuk.

A 103 betegből 82 esetben a klinikai és túlélési adatokat is össze tudtuk gyűjteni. Ezekben az esetekben statisztikailag elemeztük a betegek klinikai adatait az IHC-eredményekkel összehasonlítva. A vizsgálatokhoz az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet archivált formalinban fixált, paraffinba ágyazott biopsziás mintáiból gyűjtöttük az eseteket és a biopszia reprezentatív területeiből 2 mm átmérőjű szövethengereket szűrtünk ki és illesztettünk be a 70 mintás TMA blokkokba. (A TMA-lemezek 70 különböző minta egyidejű festését teszik lehetővé.)

A paraffinos metszeteket deparaffináltuk, majd endogén peroxidáz blokkolás után megfelelő pufferben elektromos kuktában tártuk fel. A mintákat lószérumos (3%) pufferben blokkoltuk, majd az elsődleges ellenanyagokkal (a hígítás az immuncitokémiánál leírtakkal egyező) 4°C-on inkubáltuk éjszaka. Novolink (Novocastra), ill. Vectastain (Vector) másodlagos előhívó rendszereket használtunk, majd DAB kromogénnel tettük láthatóvá a reakciókat.

A foszfoproteinek esetében az IHC-t a reakció intenzitása alapján értékeltük. Ha gyenge reakció volt a tumorsejtek kevesebb, mint 10%-ában, akkor 1+ -ra értékeltük. Ha közepes erősségű volt a reakció több, mint 10%-ban, akkor 2+. Ha intenzív volt a reakció, akkor 3+-ra értékeltük.

A Rictor és a Raptor értékelésnél csak az intenzitás alapján értékeltünk (-, 1+, 2+, 3+), függetlenül a pozitív tumorsejtek arányától.

STATISZTIKAI ELEMZÉSEK

A 103 betegből 82 esetben a klinikai és túlélési adataikat is össze tudtuk gyűjteni. Az IHC-eredményeket a betegek prognózisával, az 5 évnél hosszabb túlélésükkel (OVS) vetettük össze. Az *in vitro* kísérletek eredményeinek szignifikanciáját T-próbával és Mann-Whitney tesztel állapítottuk meg (p értéke: <0.05). A betegek klinikai adatai és a különböző IHC eredmények közti szignifikáns összefüggéseket χ^2 próbával (log-rank teszt) határoztuk meg.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

SEJTVONALAK KEZELÉSEINEK EREDMÉNYEI

A hat sejtvonalon végzett kezeléseink proliferációt gátló (Alamar Blue-teszt) eredményeit a 3. táblázatban foglaltam össze.

	PROLIFERÁCIÓ %	RKO	Colo-205	CaCo-2	SW620	HCT116	GC3
	Kontroll	100%	100%	100%	100%	100%	100%
EGFR-gátlók	Cetuximab	92%	89%	80%	98%	86%	100%
	Gefitinib	45%	64%	58%	43%	67%	87%
mTOR-gátlók	Rapamycin	58%	73%	55%	60%	91%	101%
	PP-242	43%	56%	92%	70%	80%	87%
	NVP-BEZ235	45%	60%	40%	48%	96%	90%
Kombinációk	Gefitinib+ Rapamycin	32%	43%	54%	34%	78%	75%
	Gefitinib+ PP-242	26%	37%	51%	42%	76%	53%
	Gefitinib+ NVP-BEZ235	23%	44%	35%	35%	70%	74%
	Cetuximab+ Rapamycin	57%	57%	50%	52%	66%	88%
Immunitokémia	RICTOR:RAPTOR	Ri>Ra	-	Ri>Ra	Ri>Ra, Ra=0	Ri=Ra	Ri=Ra
	p-S6 (mTOR aktivitás)	2+	-	2+	2+	2+	2+/3+
	mutáns gének*	BRAF, mTOR	BRAF, PIK3C2A		KRAS	BRAF, ERBB3	
	NEM mutáns gének*	KRAS, AKT	AKT, EGFR		BRAF	EGFR, mTOR, MAPK, AKT,	

3.táblázat A sejtvonalak in vitro kezeléseinek proliferáció-gátló hatásainak, a p-S6, Raptor, Rictor immunitokémiai kiértékelések eredményei és a sejtvonalak mutációi (lásd 16.o. *lábjegyzet)

Kísérleteink szerint a sejtvonalakon a gefitinib legalább olyan hatékony, mint a cetuximab, ezért *in vitro* kombinációban a gefitinibet alkalmaztuk annak hosszabb szavatossága miatt. Eredményeink alapján eltérő az egyes sejtvonalak mTOR-gátlókkal szembeni érzékenysége. Az EGFR-gátlókat mTOR-gátlókkal kombinálva is használtuk, általánosságban elmondhatjuk, hogy az EGFR-gátlók hatását fokozták az mTOR-gátlók. Kezeléseinkben a gefitinib hatását a mTOR-gátlók növelték, de a hatból két sejtvonalnál (HCT116, SW620) nem tapasztaltuk ezt a hatást.

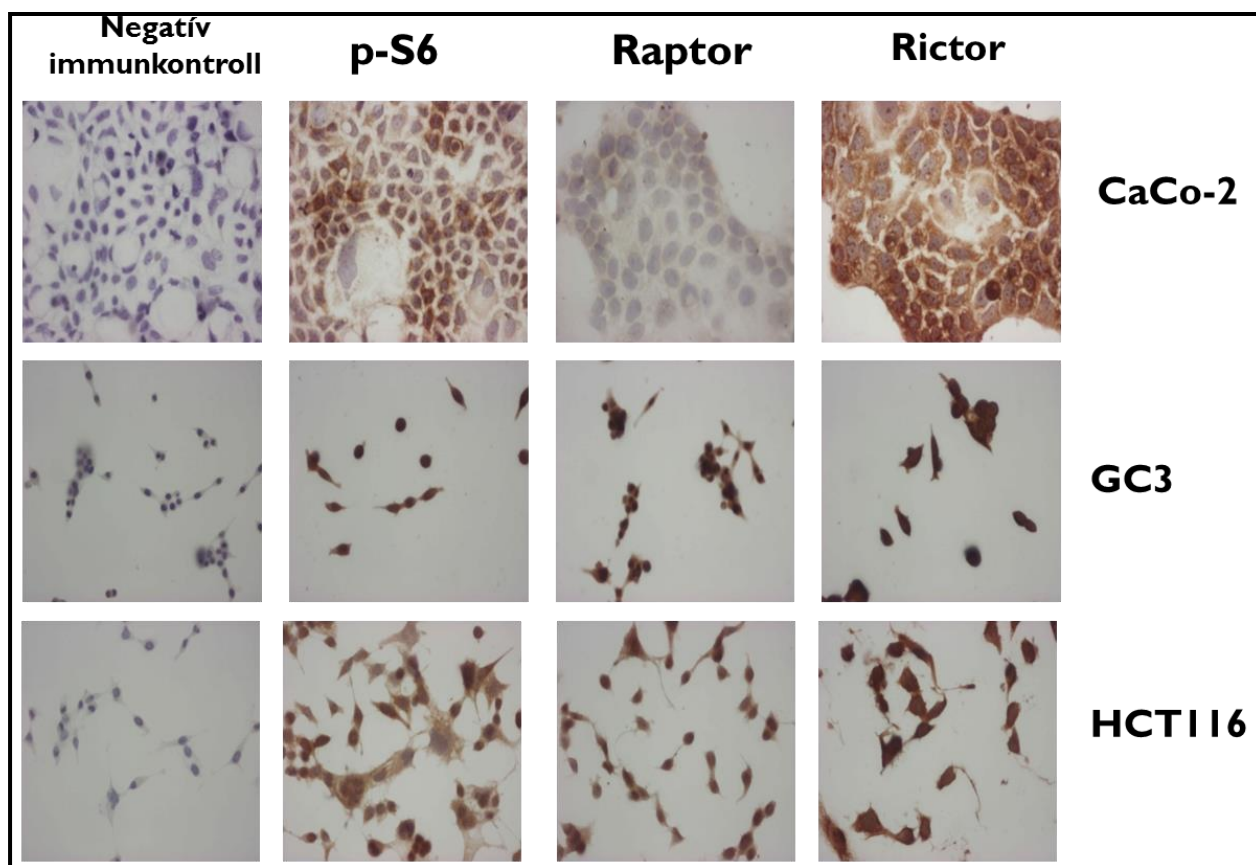
A hat sejtvonalat a kezelési eredményeink szerint (3. táblázat) jellemezhetjük:

Az RKO volt a hat sejtvonal közül a legérzékenyebb, bár a cetuximab kezelésre szinte egyáltalán nem reagált. A gefitinibet és a három mTOR-gátlót önmagukban alkalmazva hasonló (~40-50%) proliferáció-gátló hatást mutattak. A gefitinib hatását mTOR-gátlók a következő hatásfokok tendenciája szerint növelték (rapamycin<NVP-BEZ235<PP-242). A legjobb kezelési eredményt (26 % proliferáció) a gefitinib és a PP-242 kombinálásával érték el. Érzékenység szempontjából

a második legérzékenyebb sejtvonal a Colo-205 volt. Az mTOR-gátlók közül viszont a várttal ellentétben nem a NVP-BEZ235 kettős gátló bizonyult a leghatékonyabbnak, hanem az mTORC1 és C2-komplexet gátló PP-242. Ebben a sejtvonalban is a legjobb hatást a gefitinib és a PP-242 kombinálásával értük el. A CaCo-2 néhány esetben eltért az előbbiektől. Az mTOR-gátlók közül a kettős gátlószer volt a leghatékonyabb (PP-242 (92%) <rapamycin (55%) < NVP-BEZ235 (40%)). Érdekes, hogy az elvileg csak az mTORC1-et gátló rapamycin hatásosabb volt, mint a PP242. Ezek az arányok a gefitinib kombinációs kezeléseknél is megjelennek. Az SW620 sejtekben az mTOR-gátlókat önmagukban alkalmazva a CaCo-2 sejtvonalnál tapasztaltakhoz hasonló eredményt kaptunk. Kombinációban a PP-242 nem javította, míg a másik két mTOR-gátló is csak kis mértékben javították a gefitinib hatását. A HCT116-nál az mTOR-gátlókat önmagukban alkalmazva gyenge hatékonyságot tapasztaltunk és kombinációban sem javították, sőt csökkentették az EGFR-gátló gefitinib hatását. A GC3 sejtvonal bizonyult a legrezisztensebbnek, bár néhány esetben hasonló tendenciákat mutat a HCT116-hoz. Az mTOR-gátlókat önmagukban alkalmazva a HCT116-hoz hasonlóan nem bizonyultak hatékonyaknak és bár a GC3-nál a gefitinibet mTOR-gátlókkal kombinálva jobb kezelési eredményeket kaptunk, ez lényegesen elmaradt a többi sejt esetében kimutatott hatásoktól.

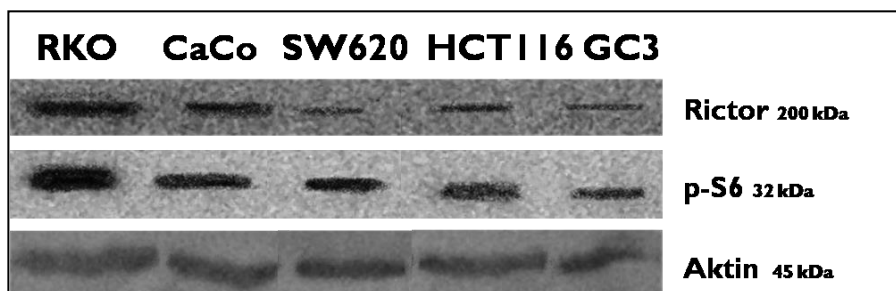
A SEJTVONALAK MTOR AKTIVITÁSÁNAK JELLEMZÉSE FEHÉRJE EXPRESSZIÓS EREDMÉNYEK ALAPJÁN

Az mTOR foszforilált célmolekulája, a p-S6, mennyisége arányos az mTOR aktivitás mértékével. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy hasonló (~2+) mTOR aktivitás mellett, eltérő a különböző sejtvonalak mTORC1-, illetve mTORC2 komplexeket jellemző foszfoprotein (Raptor, Rictor) expressziója (3. táblázat, 4. ábra).



4. ábra A p-S6, Raptor, Rictor immuncitokémiai festéseinek néhány fényképe

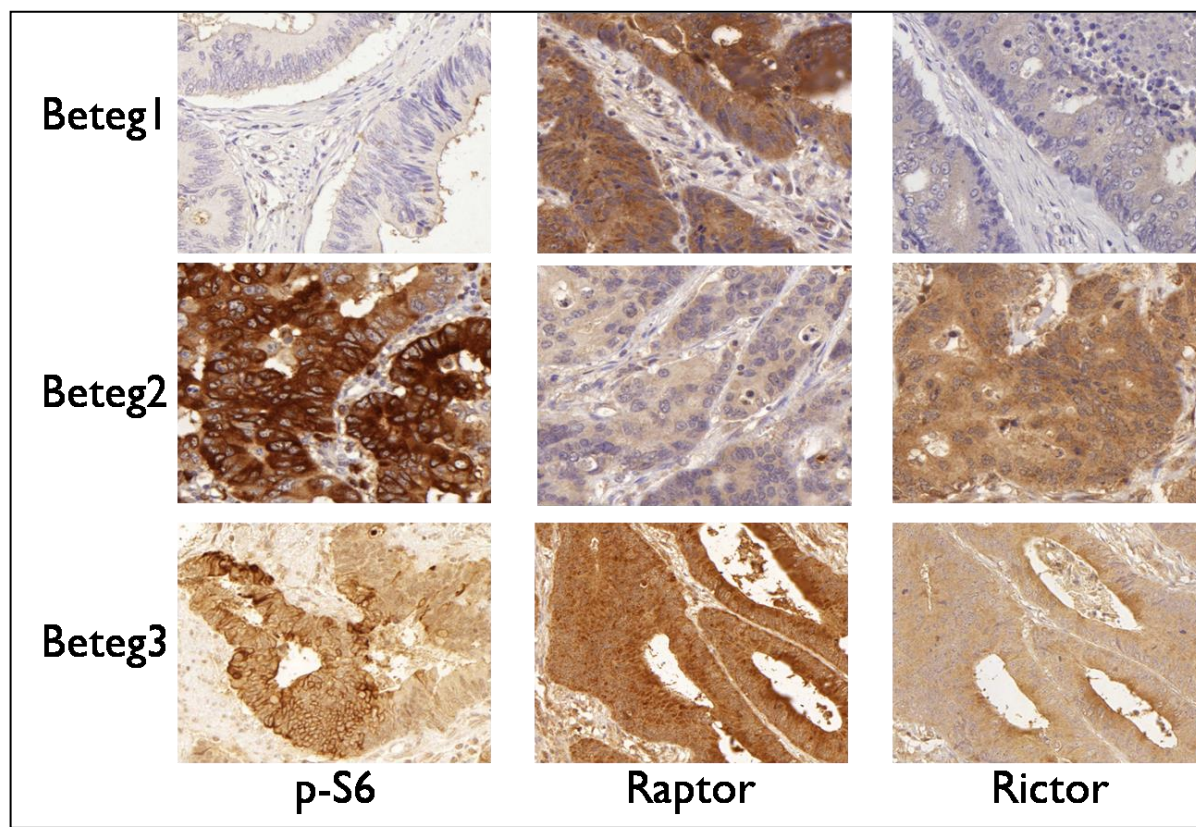
Ezt a megfigyelésünket a p-S6 és Rictor Western blot eredményeink is alátámasztják (5. ábra).



5. ábra A sejtvonalakban Western blottal kimutatott p-S6 és Rictor expresszió eredményei

IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

Az mTOR aktivitásra a p-mTOR és p-S6 immunhisztokémiai festődése alapján következtettünk: 3+ vagy 2+ pozitivitás magas, az 1+ vagy negatív IHC reakció alacsony aktivitást jelentett. Ezek alapján az esetek 73,8%-a mutatott magas p-mTOR expressziót. E 76 eset közül, 74-nél tudtunk szintén magas (2+ vagy 3+) p-S6 expressziót kimutatni. Olyan esetet



6. ábra A p-S6, Raptor, Rictor immunhisztokémiai festések néhány esete

nem találtunk, ahol a p-mTOR alacsony aktivitását a p-S6 magas aktivitása kísérte volna.

Az mTOR-komplexek expresszióira a Raptor (az mTORC1-komplex része) és Rictor (az mTORC2 része) mennyiségének vizsgálatából következtettünk. A Raptor és a Rictor IHC reakciók (6. ábra) alapján a betegeket 3 csoportba tudtuk tovább osztani (4. táblázat). Az első csoportban a Rictor overexpressziója (49,5%), a második csoportban a Raptor overexpressziója volt jellemző (13,6%), a harmadikban (36,9%) a két fehérje expressziója jelentősen nem tért el egymástól (nem volt legalább 1+ különbség a Raptor és Rictor IHC értékelésében). Rictor overexpresszió összesen 51 betegre volt jellemző. Ebben a csoportban a betegek 76,5%-nak (39 beteg) volt magas az mTOR aktivitás. Raptor overexpressziót 14 betegnél tudtunk kimutatni.

Ennek a csoportnak 57,1%-a mutatott magas mTOR aktivitást (8 beteg), míg 6 beteg alacsony mTOR aktivitással rendelkezett. A harmadik csoportban a Rictor és a Raptor hasonló mértékben expresszáldott, ebbe a csoportba 38 beteg tartozott. Ezt a csoportot is két részre bontottuk az mTOR aktivitás alapján, a betegek 76,3%-ának volt magas az mTOR aktivitása (29 beteg).

ELLENANYAG	KIMUTATÁSI SZEREP	eset-szám	összes eset (103) hány %-a	az esetekből hány magas mTOR aktivitású	esetek hány %-a magas mTOR aktivitású
Raptor dominancia	mTORC1-komplex része	14	13,6%	8	57,1%
Rictor dominancia	mTORC2-komplex része	51	49,5%	39	76,5%
nincs dominancia		38	36,9%	29	76,3%

4. táblázat A Rictor, Raptor immunhisztokémiai kiértékelések eredményei

A betegek túlélési adatait összevetettük a kapott IHC eredményekkel (5. táblázat). Az alacsony mTOR aktivitás egyértelműen a jobb prognózissal függött össze (5 évnél hosszabb túlélés (OVS) alacsony mTOR aktivitás esetén 74,1%, míg a magas mTOR aktivitás esetén 39,5%). Ha nemcsak az mTOR aktivitást, hanem az mTOR komplexre (mTORC1/2) jellemző Raptor és Rictor mennyiségét is figyelembe vettük, akkor a legrosszabb prognózisú csoportnak a magas mTOR aktivitású és a Rictort overexpresszáló betegek bizonyultak (OVS 35,9%), míg az alacsony mTOR aktivitású és Raptor overexpressziót mutató valamennyi beteg a túlélése meghaladta az 5 évet (OVS 100%). A magas mTOR aktivitást mutató esetek között a legjobb túlélési eredményeket a Raptor overexpressziót mutató esetek adták (OVS 50%). Míg abban az esetben, amikor a két komplexre utaló Rictor és Raptor expressziójában nincs különbség, az mTOR magas aktivitású (OVS 41,3%) csoport túlélési adatai hasonlóak a Rictort overexpresszáló és magas mTOR aktivitású csoportéhoz (OVS 35,9%), attól szignifikánsan nem különböző eredményeket találtunk.

	összes eset		magas mTOR aktivitás		alacsony mTOR aktivitás	
összes eset	103	100%	76	73,8%	27	26,2%
OVS >5 év	50	48,5%	30	39,5%	20	74,1%
Rictor dominancia	51	49,5%	39	76,5%	12	23,5%
OVS >5 év	20	39,2%	14	35,9%	6	50%
Raptor dominancia	14	13,6%	8	57,1%	6	42,9%
OVS >5 év	10	71,4%	4	50%	6	100%
nincs dominancia	38	36,9%	29	76,3%	9	23,7%
OVS >5 év	20	52,6%	12	41,3%	8	88,9%

5. táblázat Az mTOR aktivitás, Rictor-Raptor dominancia és túlélés alapján kiértékelt esetszámok

Az mTOR aktivitást összevetettük más klinikai adatokkal is. A statisztikai elemzés nem mutatott összefüggést a nemek, a betegek kora és az mTOR aktivitás között.

ÖSSZEFOGLALÁS

Összegezve, a sejtvonalakon végzett vizsgálataink eredményei azt mutatják, hogy a különböző vastagbél-tumor-sejtvonalak mTOR aktivitása, így mTOR-gátlókkal szembeni érzékenysége eltérő. Ennek hátterében állhatnak az mTORC1 és mTORC2-komplexek expressziós különbségei, amelyek a sejtvonalakra jellemző egyedi eltéréseket mutatnak. Azok a sejtvonalak (RKO, CaCo-2, SW620), melyekben Rictor (mTORC2-komplex) dominanciát találtunk, sokkal érzékenyebbek voltak a mindkét komplexet gátló (PP-242, NVP-BEZ235) kezelésekre, mint azok a sejtvonalak, ahol a Rictor és Raptor expresszió hasonló volt. Ezek az eredmények más kutatók más típusú sejtvonalakon végzett kísérleteik eredményeihez^{18, 19} hasonlóan, megerősítik a két komplex expresszió-különbségeinek fontosságát. Ezek szerint a fokozott Rictor expresszió kapcsolatba hozható az mTORC1-gátló rapalóg-rezisztenciával.

Több közlemény utal rá^{20, 21, 22}, hogy az mTOR-gátló kezelések fokozhatják más kezelések hatékonyságát. Eredményeink alátámasztják, hogy a célzott EGFR-terápia hatékonysága mTOR gátlással növelhető (lásd *in vitro* adataink). Ez egy új terápiás lehetőséget jelenthet a RAS-, EGFR-mutáns esetekben, de segítheti a vad RAS-fenotípusú, cetuximab-rezisztens betegek terápia-rezisztencia áttörését is. Ezeknek az eredményeknek a jelentőségét jól mutatják a biopsziás mintákon végzett vizsgálataink is. Korábbi klinikai vizsgálatok már kimutatták, hogy a vastagbél-daganatok esetében gyakori az mTOR aktivitás fokozódás²³. Az is ismert, hogy előfordulhat Rictor overexpresszió a vastagbél-daganatos betegek tumorsejtjeiben¹⁹. Vizsgálataink során az mTOR aktivitás fokozódásának és a két komplex mennyiségére utaló Rictor-Raptor expresszió kérdését vetettük össze a betegek túlélési adataival, amit eddig más még nem végzett el. Eredményeink szerint, a vastagbél-daganatokra (~70%-ban) jellemző a magas mTOR aktivitás, ami rosszabb prognózissal jár együtt. A legrosszabb prognózis abban a betegcsoportban mutatható ki, ahol a magas mTOR aktivitás Rictor overexpresszióval, tehát domináns mTORC2 aktivitással jellemezhető. Ezt a korrelációt mások is említik^{19, 24} és korábban a munkacsoport, amelyben dolgozom, lymphomák esetében hasonló jellegű eredményeit közölte is^{25, 26}. Vizsgálataink azt is mutatják, hogy a Rictor overexpresszió előre vetítheti a hagyományos rapalóg (mTORC1-gátló) készítményekkel szembeni alacsony vagy hiányzó terápiás választ^{27, 28}. Mindezek alapján az mTOR-gátló kezelésre megfelelő betegcsoport kiválasztása nagy odafigyelést és alapos vizsgálatokat igényel a jövőben.

Adataink értékelése alapján azt mondhatjuk, hogy a megfelelő (az új generációs mTORC1-gátló kezelések tesztelése már zajlik^{21, 22}) mTOR-gátló kezelés kombinációban nagy eséllyel javíthatja a jelenlegi kezelések hatékonyságát. Ehhez azonban mindenképpen szükséges az aktív mTORC1- (Raptor+, p-mTOR+) és az aktív mTORC2- (Rictor+, p-mTOR+) komplexek mennyiségének *in situ* meghatározása is. A jövőben tervezzük egy olyan immunhisztokémiai módszer beállítását is, ami a két komplex aktivitásának meghatározását segíti paraffinos minták esetében is.

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Molnár Anna** a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül az

- az in vitro kezelésekhez a sejteket tenyésztettem és a kezeléseket elvégeztem, eredményeimet a 3. táblázat foglalja össze;
- az Alamar Blue-teszteket kiviteleztem, kiértékeltem és az eredményeket értelmeztem, ezek az 'Eredmények és értékelésük' fejezet 'Sejtvonalak kezeléseinek eredményei' alfejezetében olvashatók;
- a klinikai adatok gyűjtésében, feldolgozásában, a TMA lemezeken végzett IHC reakciók kivitelezésében, patológiai értékelésében részt vettem, de nem önállóan végeztem ezeket, patológus (Dr. Micsik Tamás) és PhD hallgató kolléga (Dr. Sticz Tamás) segített (eredmények: 6. ábra, 4. és 5. táblázat);
- a TDK dolgozat elkészítése (mind a szövegrész, mind az ábraanyag és mind az irodalom és a szerkesztés) saját munkám, melynek szerkesztését és javítását természetesen témavezetőmmel végeztük.

Segítséget kaptam a labor és az intézet munkatársaitól:

- Szakmai és laboratóriumi háttér
- Immuncitokémiai festés és kiértékelés
- Western blot
- A klinikai és TMA adatok statisztikai kiértékelését nem önállóan, hanem Dr. Kenessey István és Dr. Sticz Tamás segítségével végeztem.

Budapest, 2014. május 1.

.....
aláírás

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni **Dr. Sebestyén Annának**, lelkiismeretes és pótolhatatlan témavezetői munkáját, irányítását és segítségét minden téren.

Köszönöm Dr. Sticz Tamás, Phd hallgatónak, aki hatalmas szakmai háttérrel és segítséget nyújtott a laboratóriumi munka során.

Köszönöm Csorba Gézőnek, Nagy Noéminek, Dr. Márk Ágnesnek, Dr. Micsik Tamásnak, Dr. Kenessey Istvánnak, Dr. Krenács Tibornak, Parsch Editnek, Kiss Renátának és az I. sz. Patológiai Intézet minden dolgozójának, aki segítette munkámat és hozzájárult kutatásom végzéséhez! Köszönöm Prof. Kopper Lászlónak, hogy intézetében, laborjában folytathatom kutatásaimat. Nagyon hálás vagyok mindannyiuknak!

ÁBRÁK FORRÁSAI

1. kép:

http://www.google.hu/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fwww.nlm.nih.gov%2Fmedlineplus%2Fmagazine%2Fissues%2Fspring09%2Fimages%2FNCI_Digestive_torso_large.jpg&imgrefurl=http%3A%2F%2Fwww.nlm.nih.gov%2Fmedlineplus%2Fmagazine%2Fissues%2Fspring09%2Farticles%2Fspring09pg7-8.html&h=750&w=800&tbid=EtOpiibVonM-M%3A&zoom=1&docid=l2xDK72jiIjgbM&ei=oINiU66iNYaLyQPY6IH0Ag&tbm=isch&ved=0CFYQMygDMAM&iact=rc&uact=3&dur=3494&page=1&start=0&ndsp=27 és http://www.google.hu/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fmedinfo.net%2Fimi%2Fwp-content%2Fuploads%2F2008%2F04%2Fcolorectal_detail_lg.jpg&imgrefurl=http%3A%2F%2Fwww.medinfo.net%2Fimi%2Ftissue-areas%2Fcolorectal%2F&h=600&w=800&tbid=W6DQxkw5tzdxAM%3A&zoom=1&docid=VwKFubGHFAB2PM&ei=oINiU66iNYaLyQPY6IH0Ag&tbm=isch&ved=0CFMQMygAMAA&iact=rc&uact=3&dur=295&page=1&start=0&ndsp=27 linkeken elérhető képek felhasználásával, átszerkesztve

1. ábra: KEGG Pathway Database számos ábrája alapján saját szempontok szerint megszerkesztve

A többi ábránál az adott ábra alapját adó forráscikk meg van jelölve.

IRODALOM

- ¹ Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; **61(2)**: 69-90.
- ² Ferlay J SH, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin Dm. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: *IARC CancerBase* 2013 Augusztus 28 **No. 602 10** [Internet].
- ³ Kopper L, Tímár J, Becságh P, Nagy Zs. Célzott diagnosztika és célzott terápia az onkológiában 2. *Semmelweis Kiadó* 2011.
- ⁴ Kopper L, Tímár J. mTOR-komplexek – molekuláris pókok a molekuláris hálókban. *Magyar Onkológia* 2011; **55**: 287-294.
- ⁵ Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; **4(5)**: 335-348.
- ⁶ Galimberti S, Petrini M. Temsirolimus in the treatment of relapsed and/or refractory mantle cell lymphoma. *Cancer Manag Res* 2010; **2**: 181-189.
- ⁷ Rini BI. Temsirolimus, an inhibitor of mammalian target of rapamycin. *Clin Cancer Res* 2008; **14(5)**: 1286-1290.
- ⁸ 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.
- ⁹ de Mello RA, Marques AM, Araújo A. Epidermal growth factor receptor and metastatic colorectal cancer: Insights into target therapies. *World J Gastroenterol.* 2013; **14;19(38)**: 6315-8.
- ¹⁰ Laplante M, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* 2012; **149**: 274-293.
- ¹¹ Baselga J. Targeting the phosphoinositide-3 (PI3) kinase pathway in breast cancer. *Oncologist* 2011; **16(1)**: 12-19.
- ¹² Ogita S, Lorusso P. Targeting phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)-Akt beyond rapalogs. *Target Oncol* 2011; **6(2)**: 103-117.

- ¹³ Hall MN. The TOR signalling pathway and growth control on yeast. *Biochem Soc Trans* 1996; **24**: 234-239.
- ¹⁴ Troiani T, Martinelli E, Napolitano S, Vitagliano D, Ciuffreda LP, Costantino S, Morgillo F, Capasso A, Sforza V, Nappi A, De Palma R, D'aiuto E, Berrino L, Bianco R, Ciardiello F. Increased TGF α as a mechanism of acquired resistance to the anti-EGFR inhibitor cetuximab through EGFR-MET interaction and activation of MET signaling in colon cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2013; [Epub ahead of print] PMID: 24122793.
- ¹⁵ Marshall J. Clinical implications of the mechanism of epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer* 2006; **107(6)**: 1205–1421.
- ¹⁶ Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 2006; **22(2)**: 159-168.
- ¹⁷ Markman B, Dienstmann R, Tabernero J. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway- beyond rapalogs. *Oncotarget* 2010; **1(7)**: 530-543.
- ¹⁸ Sun YX, Ji X, Mao X, Xie L, Jia J, Galvan V, Greenberg DA, Jin K. Differential Activation of mTOR Complex 1 Signaling in Human Brain with Mild to Severe Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2013; [Epub ahead of print] PMID: 23979023.
- ¹⁹ Gulhati P, Q Cai, Li J et al. Targeted Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin Signaling Inhibits Tumorigenesis of Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 7207-7216.
- ²⁰ Spindler KL, Sorensen MM, Pallisgaard N, Andersen RF, Havelund BM, Ploen J, Lassen U, Jakobsen AK. Phase II trial of temsirolimus alone and in combination with irinotecan for KRAS mutant metastatic colorectal cancer: outcome and results of KRAS mutational analysis in plasma. *Acta Oncol*. 2013; **52(5)**: 963-70.
- ²¹ Ng K, Tabernero J, Hwang J, Bajetta E, Sharma S, Del Prete SA, Arrowsmith ER, Ryan DP, Sedova M, Jin J, Malek K, Fuchs CS. Phase II study of everolimus in patients with metastatic colorectal adenocarcinoma previously treated with bevacizumab-, fluoropyrimidine-, oxaliplatin-, and irinotecan-based regimens. *Clin Cancer Res*. 2013; **19(14)**: 3987-95.

- ²² Yang F, Qian XJ, Qin W, Deng R, Wu XQ, Qin J, Feng GK, Zhu XF. Dual phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 has a therapeutic potential and sensitizes cisplatin in nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One*. 2013; **8(3)**: e59879.
- ²³ Wang D, Chen J, Guo F, Chen H, Duan Z, Wei MY, Xu QM, Wang LH, Zhong MZ. Clinical significance of mTOR and p-mTOR protein expression in human colorectal carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011; **12(10)**: 2581-4.
- ²⁴ Guertin DA, Sabitini DM. The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci Signal* 2009; **2(67)**: pe24.
- ²⁵ 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.
- ²⁶ 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)**: 1623-8.
- ²⁷ Im-Aram A, Farrand L, Bae SM, Song G, Song YS, Han JY, Tsang BK. The mTORC2 Component Rictor Contributes to Cisplatin Resistance in Human Ovarian Cancer Cells. *PLoS One*. 2013; **23;8(9)**: e75455.
- ²⁸ Harada K, Miyake H, Kumano M, Fujisawa M. Acquired resistance to temsirolimus in human renal cell carcinoma cells is mediated by the constitutive activation of signal transduction pathways through mTORC2. *Br J Cancer*. 2013; [Epub ahead of print] PMID: 24091619.