

A Notch és az mTOR szignál szerepe a Hodgkin lymphoma és az akut lymphoid leukémia sejtek túlélését szabályozó jelátviteli hálózatban

A Hodgkin lymphoma (HL) sejtekre a B-sejt fenotípusos jelleg jelentős mértékű eltűnése, párhuzamosan azonban a normális aktivált B sejtekre is jellemző bizonyos szignálok magas aktivása mellett, más egyébként inaktív szignálok működése is (pl. Notch) jellemző. Számos faktor szerepe vált ismertté ebben a folyamatban, de hogy ezek valóban hozzájárulnak-e a HL sejtek (preapoptotikus csíracentrum B-sejtek) túléléséhez még válaszra vár. Két, a HL sejtek szabályozási folyamatait érintő jelátviteli útnak (Notch, mTOR) és ezek egymásra hatásának vizsgálata volt célunk. Vizsgáltuk, hogy a T-sejtes akut lymphoid leukémiákban (T-ALL) ismert, a daganatsejtek túlélését segítő Notch szignál hozzájárul-e a Hodgkin sejtek túléléséhez is, valamint, hogy a Notch-függő vagy Notch független mTOR kináz aktivitások szerepet játszanak-e a HL és ALL-sejtek túlélésében.

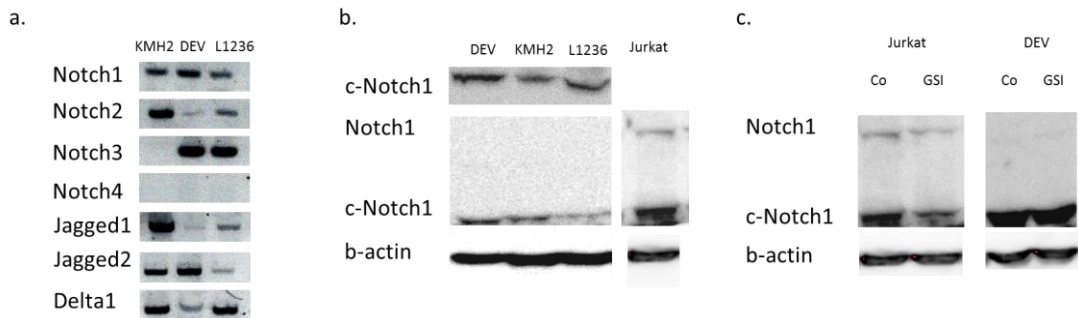
1. **In vitro** vizsgálatainkban a legkülönbözőbb lymphoma és leukémia sejtvonalak, így HL és ALL sejtvonalak mTOR aktivitását és Notch expresszióját vizsgáltuk a megfelelő *in vitro és lehetséges in vivo modell rendszerek* kiválasztásához. Az mTOR aktivitás meghatározás és karakterizálása kapcsán megfigyeltük, hogy leukémia és lymphoma sejtek, sejtvonalak esetében az osztódáskor (M fázisban) jelentősen fokozódik az mTOR aktivitás. In vitro és egyéb morfológiai, expressziós, ko-expressziós vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a *normál lymphoid és a lymphoma, leukémia sejtekben a mitózis során szignifikánsan emelkedik az mTOR kináz aktivitása, a foszforilált mTOR, p70S6K és riboszomális S6 fehérje (p-mTOR, p-p70S6K, p-S6) mennyisége*. Érdekes volt azonban, hogy ez más daganatsejtek esetében nem volt általánosan jellemző. Sejtbiológiai és hemato-onkológiai szempontból is figyelemreméltó eredményünket a Histochem. Cell. Biol. folyóiratban közöltük.

A HL sejtvonalak tenyésztése és ezekből xenograft modell kialakítása nem kis feladatot jelentett a munkacsoportunk számára. HL sejtek tenyésztése rendkívül nehéz, többször is be kellett szereznünk újra sejtbankból a sejtvonalat, prof. Klein Éva és prof. Klein György segítségével, stockholmi laboratóriumukból sikerült valóban proliferáló HL sejtvonalatokat kapnunk. Ezekkel, a nehézségek után végre stabilan dolgozunk, így sikerült az in vitro és in vivo HL sejtvonala alapú munkáinkat a projekt végére befejeznünk. A projekt ezen részének eredményeit részletesebben mutatom be.

3 HL (KMH2, L1236 és DEV), több ALL és egy Diffúz nagy B-sejtes sejtvonallal végeztük a különböző vizsgálatokat. A HL és DLBCL sejtvonallakkal kidolgoztunk egy subcutan oltási technikát mátrigéllal, amelynek segítségével ritka xenograftokat is tudunk indítani, ezek tovább oltásával in vivo vizsgálatok elvégzése lehetséges, hasonló modell máshol HL-ek esetében alig elérhető. *A HL sejtvonalak és xenograftok segítségével az in vitro és in vivo Notch és mTOR vizsgálatainkat* gyakorlatilag teljesen befejeztük, amelyből közlésre a Notch inhibitorokkal és mTORC1 gátlókkal végzett vizsgálataink eredményeiből a kézirat hamarosan benyújtásra kerül és még egy további közlemény is várható az összes, különböző vizsgált mTOR inhibitor hatásaival kapcsolatos eddigi in

vitro és vivo vizsgálatainkról lymphomákban (utóbbihoz, két zajló xenograft vizsgálat lezárása, majd kiértékelése még szükséges).

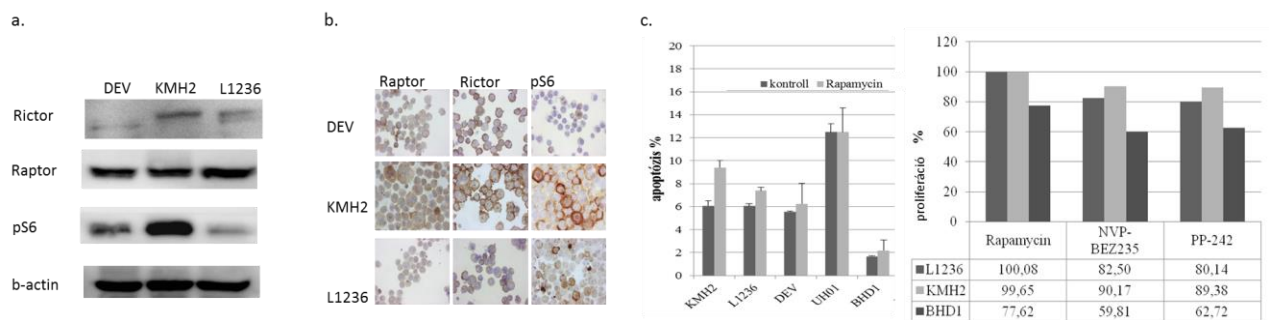
A **Notch útvonal elemeinek** expresszió vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a Notch1, Notch2 receptor, a Jagged1, Jagged2 és Delta1 ligand gének expressziója jellemzi a három HL sejtvonalat, míg a Notch3 expresszió csak a DEV és az L1236 sejtekben jelenik meg, de a KMH2 sejtekre nem jellemző; a Notch4 receptor pedig mind a három sejtvonalból hiányzik (1a. ábra). Fehérje szinten az intakt receptort és hasított-Notch1 fehérje fragmentet (aktív szignál) felismerő specifikus antitesteket (anti-cleaved Notch-1: c-Notch-1; Notch-1 antitest), Western blot technikát és immunhisztokémiai és immuncitokémiai vizsgálatokat is végeztünk. A megfelelő ellenanyagok kiválasztása és beállítása beszerzése során több nem megbízható antitesttel is találkoztunk, de sikerült megbízható, megfelelően specifikus ellenanyagokat beszerezni. Eredményeink szerint **a vizsgált HL sejtekre jellemző egy állandó, ligand és gamma-szekretáz aktivitás független Notch-1 aktiváció.** A HL sejtekben csak a hasított Notch-1 fragmentet tudtuk kimutatni, aminek mennyisége sem Notch-ligand, sem Notch-1 szignált gátló gamma-szekretáz inhibitor kezelésekkel nem befolyásolható, párhuzamosan a **T-ALL** sejtekben (Jurkat vagy Molt-4; a vizsgálat szempontjából pozitív kontrollnak tekinthető) nemcsak a hasított forma, hanem a teljes Notch-1 fehérje expressziójának kimutathatóságát, és a hasított Notch-1 fragment mennyiségének csökkenését is igazoltuk 72 órás gamma-szekretáz inhibitor kezeléskor (1. ábra). A Notch1 szignál aktivitását, c-Notch-1 IHC vizsgálattal, olyan Hodgkin lymphomás betegek biopsziás mintáiban is vizsgáltuk, amelyekben párhuzamosan igazoltuk az **mTORC1 fokozott aktivitását.** A **hasított-Notch1 fehérje nukleáris illetve perinukleáris megjelenését mutattuk ki a Hodgkin és Sternberg Reed sejtekben,** a nem kóros szövet részletek lymphoid elemeiben illetve tonsilla metszetek esetében hasonló festődést azonban nem figyeltünk meg.



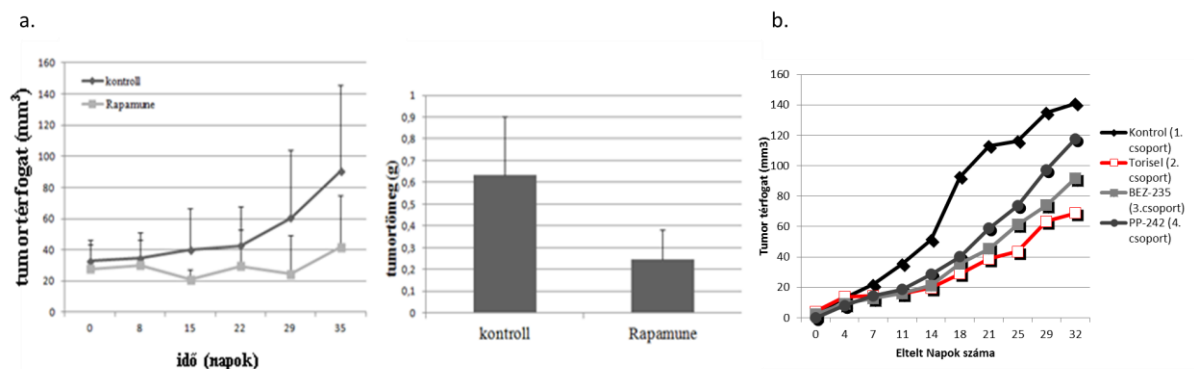
1.ábra a. Notch-receptorok és ligandok expressziója (RT-PCR); b-c. Konstitutív cleaved-Notch-1 expresszió a HL sejtekben – A HL sejtekben csak hasított Notch-1-et tudtunk kimutatni és ennek mennyiségét a gamma-szekretáz inhibitor nem befolyásolja; intakt Notch-1 fehérjét és a gamma-szekretáz inhibitor hatását csak a pozitív kontrol Jurkat sejtekben tapasztaltuk (WB)

A HL sejtvonalakban jellemző **mTOR aktivitás** esetében az mTORC1 aktivitásával arányos foszforilált riboszomális S6 (pS6) fehérje mennyiségében **egyedi eltéréseket** tapasztaltunk (a legmagasabb expresszió a KMH2 sejtvonalra jellemző), és az **mTORC1 és C2 komplexre jellemző Rictor és Raptor mennyiségében is különbségeket találtunk.** Ezek alapján feltételezhető, hogy a KMH2 sejtekben fokozottabb mTORC1 komplex aktivitás jellemző, de párhuzamosan mindhárom sejtvonalban kimutatható az mTORC2 komplex jelenléte is, ami a különböző mTOR inhibitorokkal szembeni érzékenység különbségeket jelenthet. Ennek hatását az in vitro proliferációs és apoptotikus hatás vizsgálatainkban

igazolni is tudtuk. Az mTOR aktivitás és párhuzamosan a Rictor expresszió, ezen keresztül az *mTORC2* aktivitás potenciális lehetőség *in vitro* a rapalógokkal szembeni csökkent érzékenységre, míg a duál-inhibitorok (NVP-BEZ, PP242) nagyobb hatékonyságát jelenti (2. ábra). Érdekes azonban, hogy ez a különbség *in vivo*, a folyamatos kezelés eredményeként hosszútávon már nem mutatkozik. A *HL xenograftok* esetében *in vivo* szignifikáns érzékenység különbséget nem figyeltünk meg, a rapamune vagy Torisel kezelés (*mTORC1* inhibitorok) mindhárom *HL xenograft* esetében jelentős tumornövekedés gátló hatást mutatott, nem rosszabbat, mint amelyet az NVP-BEZ vagy PP242 duál inhibitorok esetében tapasztaltunk (3. ábra). Ennek magyarázatára vannak adatok, amely szerint a hosszútávú *mTORC1* gátlás a C2 komplex összeszerelődését megakadályozva lehet mégis hatásos. Az is elképzelhető azonban, hogy, ha van is *mTORC2* komplex expresszió alapján a kettes komplex aktivitására lehetőség, ez a *HL* sejtekben nem jellemző és ez *mTORC1* gátló kezelések esetében sem aktiválódik. Ezt a *HL* sejteken végzett kvantitatív *in situ* *mTORC1/C2* mennyiségi és aktivitás vizsgálataink eredményei és a *HL* biopsziás mintákban végzett expresszió vizsgálataink (ld. később) eredményei is megerősítik. A *HL* sejtek *mTORC1* inhibitor érzékenységgel kapcsolatos *in vitro* adataink egy részét már közöltük abban a közleményben, amelyben a humán beteganyagok *mTORC1* aktivitásának jelentőségét mutattuk be, de egy további közleményt az *in vivo* *mTOR* inhibitor vizsgálataink eredményeivel összefüggésben még tervezünk.

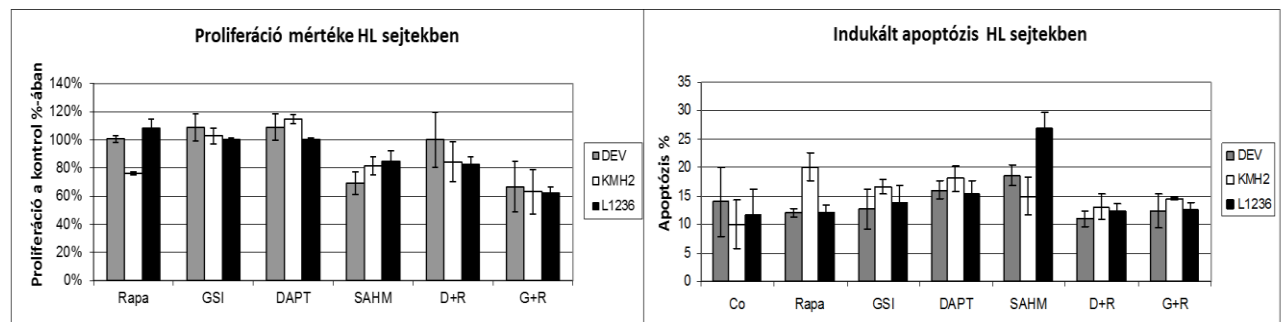


2. ábra KMH2, DEV, L1236 *HL* sejtek *mTOR* aktivitásának és *mTOR* inhibitor érzékenységének jellemzése. a. Western blott és IHC eredmények; *mTOR* gátló kezelések *in vitro* apoptózis indukciós hatása illetve proliferáció gátló hatása a különböző *HL* sejtekben



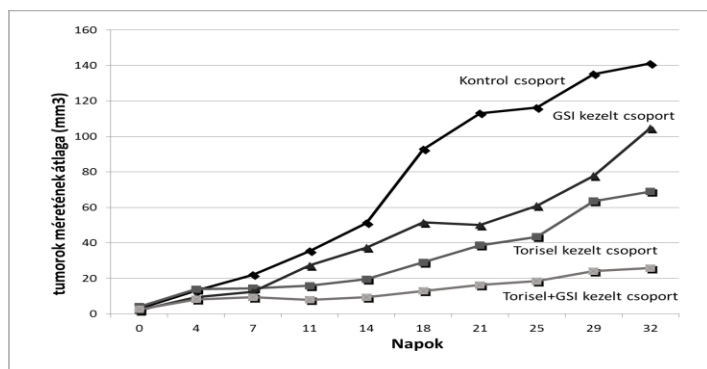
3. ábra Hodgkin lymphoma xenograftok *mTOR* inhibitor (rapamune, torisel, BEZ-235, PP242) kezelésének eredményei (példák). a. KMH2 xenograftban a rapamune kezelés szignifikánsan gátolta a tumornövekedést – más vizsgálatainkban igazoltuk, hogy ennek háttérben *in vivo* nemcsak proliferáció gátló hatás, hanem a kezelés következtében szignifikáns mértékben indukált apoptózis is kimutatható; b. L1236 *HL* xenograftban leghatékonyabbnak a Torisel (*mTORC1*-gátló) kezelés bizonyult, az alkalmazott duál inhibitor kezelések nem voltak hatásosabbak.

A két, a Notch-1 és mTOR, útvonal aktivitásának hatásait a sejtek proliferációjára, túlélésére illetve a két útvonal lehetséges egymásra hatását gamma-szekretáz inhibitor (DAPT, GSI XII) és az aktív Notch1 szignál transzkripció hatásait (SAHM1) gátló szer, Notch-1 ligand (Jagged-1) és mTORC1-et gátló (Rapamycin) kezelésekkel vizsgáltuk 72 órás in vitro kísérleteinkben. A **rapamycin önmagában proliferáció gátló és apoptózis indukáló hatását** figyeltük meg a *KMH2* sejtvonal esetében, a *DEV* és *L1236* sejteknél azonban **nem** figyeltünk meg **szignifikáns változást**. A **gamma-szekretáz inhibitorokkal szemben mind a három sejtvonal rezisztensnek** bizonyult, de az aktivált *Notch1* transzkripció hatásait gátló **SAHM1** kezelés **szignifikánsan gátolta a proliferációt mindhárom sejtvonalban**, az *L1236* sejtvonal esetében pedig apoptózist is indukált. A rapamycint gamma-szekretáz inhibitorokkal kombinációban alkalmazva a Rapamycin+DAPT kezelés fokozta a proliferáció gátlás mértékét az *L1236* sejtvonalban. **GSI XII gamma-szekretáz inhibitor+rapamycin kezelés pedig mindhárom sejtvonalban szignifikánsan fokozta a proliferáció gátló hatást**. Az előbbi kombinációk apoptózist indukáló hatása azonban nem volt jelentős. (4. ábra)



4. ábra Különböző mTOR gátló és Notch szignál gátló kezelések és kombinációik proliferációs és apoptotikus hatásai a 3 HL sejtvonalban (gamma-szekretáz inhibitorok – GSI/G: GSI XII , DAPT:D illetve SAHM1- Notch-1 transzkripció hatásait gátló szer, Rapamycin – Rapa/R) in vitro.

Vizsgáltuk *HL xenograftok mTOR inhibitor, rapamycin érzékenységét* in vivo. Megfigyeltük, hogy a rapamune kezelés **szignifikánsan gátolja a HL tumorok in vivo növekedését**. Az *L1236* sejtvonal xenograft modellje segítségével vizsgálni tudtuk nemcsak az mTOR inhibitor, Torisel, hanem a gamma-szekretáz inhibitor kezelések illetve a Torisel+ gamma-szekretáz inhibitor kezelés tumornövekedést gátló hatását is. Az in vitro eredményekhez hasonlóan **in vivo mind a Torisel, mind a Torisel+GSI kezelés szignifikánsan csökkentette a tumorok növekedését 4 hét alatt**. A gammaszekretáz inhibitor kezelés in vivo, önmagában, kismértékű tumornövekedés gátlást eredményezett és **leghatékonyabbnak a kombinációs kezelés (Torisel+GSI) bizonyult** az átlagos tumor méreteket és tömegeket tekintve, utóbbi eltérése szignifikánsnak nem tekinthető a Torisel hatásához képest (5. ábra).



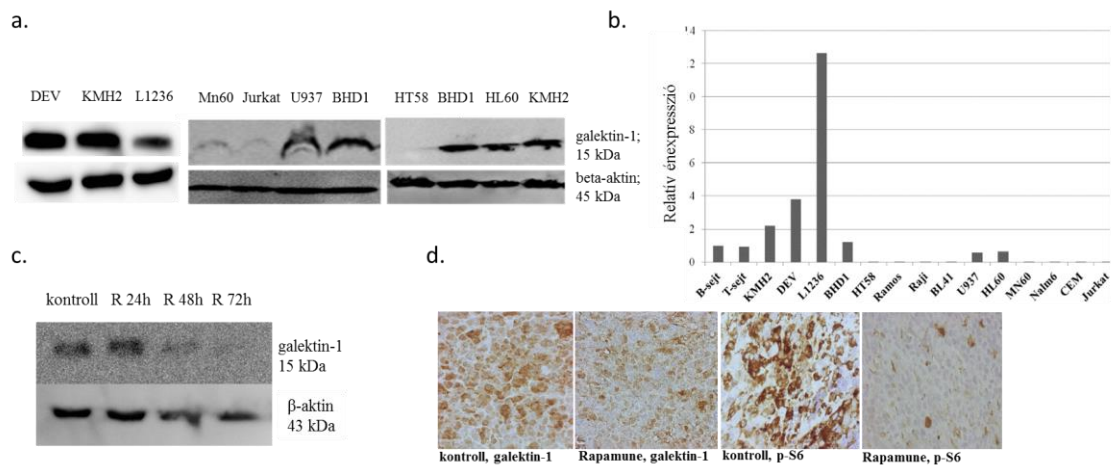
5.ábra mTORC1 gátló Torisel és gamma-szekretáz inhibitor kezelés, illetve ezek kombinációjának hatása L1236 HL xenograftban

A különböző gamma-szekretáz gátló kezelések hatástalanságának, alacsony hatékonyságának hátterét vizsgálva a Notch1 aktivitást jellemző Notch-1 receptor fehérje és aktivált formáinak vizsgálatát többféle rendszerben vizsgáltuk a hasított (c-Notch1) és az intakt receptor (Notch1) formát is felismerő ellenanyagokat alkalmazva. A **kóros konstitutív Notch-1 aktiváció jelentőségét** alátámasztották azok az eredményeink is, amelyek szerint a különböző gátlószerek (DAPT, Rapamycin) és Notch ligand (Jagged1) kezelések kombinációjában sem befolyásolták a hasított Notch-1 (c-Notch) mennyiségét, konstitutív aktivitását (csak a pozitív kontroll Molt-4 T-ALL sejtekben). Az mTOR és Notch-1 útvonal aktivitását jelző fehérjék, c-Notch1 és pS6 mennyiségét Notch inhibitor és rapamycin kombinációs kezelések után különböző időpontokban vizsgálva kimutattuk, hogy **csak a rapamycin csökkenti a HL sejtekre jellemző alap mTOR aktivitást**, már 2 órás kezelés után is, mind a három HL sejtvonalban. A **GSI-k (GSI XII és DAPT) és a rapamycin kezelés azonban nem befolyásolták a Notch fehérjék, a hasított Notch-1 mennyiségét HL sejtekben**. Notch-1 inhibitor (DAPT, GSI XII, SAHM) és rapamycin kezelések korai transzkripció hatásának (2 óra) vizsgálata érdekében a mindkét szignál target génjének elfogadott c-myc és a Notch-1 szignál egyik legfontosabb célgénjének ismert hes-1 mRNS expressziójának kvantitatív real-time PCR expresszió vizsgálatát is elvégeztük. Eredményeink szerint jelentősen csak az SAHM1 (a Notch-1 transzkripció hatását gátló) kezelés csökkentette az említett target gének expresszióját. Megvizsgáltuk illetve megvizsgáltattuk, hogy a bizonyos daganatokban leírt, az előbbi konstitutív Notch-1 és magas mTOR aktivitásokkal összefüggésbe hozható mutációk közül a **Notch-1 receptor, az FBXW7 ubiquitinligáz és a PI3KCa génjeinek ismert mutáció** előfordulnak-e a sejtvonalakban NGS (Peták István és Braunschwetter Diana segítségével végeztük - Ion AmpliSeq Cancer Panellel, amely tartalmazza Notch-1, FBXW7, PI3KCa génjeinek az eddig leírt legfontosabb mutációkat tartalmazó régiót) és Sanger-szekvenálás segítségével (Intézetünkben Hollósy Péter a PI3KCa génjének esetében a 9. és 20. exon szekvenálást elvégezte -, illetve Bödör Csaba és Király Péter segítségével beállítottuk és a projektben dolgozó PhD hallgató végezte az FBXW7 az 5. 6. 9.10. és 11. exon szekvenálását). Egyik gén esetében sem tudtuk kimutatni a daganatbiológia szempontból jelentős eddig leírt mutációkat, a Notch-1 esetében, **nem találtunk mutációt** azokban a régiókban sem, amelyek a trunkált, konstitutívan aktív forma expresszióját magyaráznák.

Az **mTOR gátlók** in vivo fokozottabb hatékonyságának hátterében zajló mikrokörnyezeti vagy bizonyos **negatív regulációs tényezők reszenzitizálásában** megnyilvánuló hatását is vizsgáltuk lymphoma sejtek esetében. Korábbi in vitro és in vivo lymphoma modell vizsgálataink folytatásaként egy a lymphomák negatív szabályzójaként jól ismert növekedési faktor a TGF béta 1 hatása esetében igazoltuk az mTOR gátlás jelentőségét.

Feltérképeztük az események hátterében álló jelátviteli mechanizmusokat. Igazoltuk, hogy az emelkedett mTOR aktivitás szerepet játszik a lymphoma sejtek TGF béta rezisztenciájában, apoptózis rezisztenciájában, de ez in vitro és in vivo is áttörhető mTOR gátló kezeléssel. Eredményeinket a Cytokine folyóiratban közlésre elfogadták.

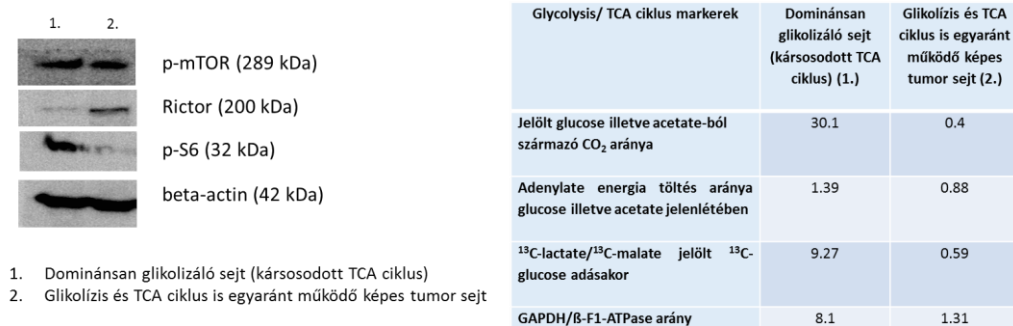
A HL esetében jól ismert, hogy a **Hodgkin és SR-sejtek mellett az egyéb szöveti elemek** is aktívan részt vesznek a nyirokcsomó strukturális átalakításában és ennek nemcsak az osztályozás, hanem a biológiai viselkedés, terápiás válasz szempontjából is jelentősége van. Munkánk során ki tudtuk mutatni, hogy a megfigyelt **mTOR aktivitásnak szerepe van a HL sejtek galektin-1 termelésében**, amely fehérjének fontos szerepe lehet ezen mikrokörnyezet kialakításában. Igazoltuk, hogy a HL sejtek mTOR aktivitása segíti a galektin-1 fehérje termelését, de nem befolyásolja a galektin-1 mRNS transzkripcióját. **In vitro és in vivo is igazoltuk az mTOR aktivitás gátlás, galektin-1 fehérje expresszió csökkentő hatását** (6. ábra). Mindennek in vivo jelentőségét az mTOR aktivitás vizsgálatokkal kapcsolatos, galektin-1 és T-reg sejt megoszlás vizsgálatainkban tanulmányoztuk, ennek később a humán biopsziás vizsgálatainkat bemutató résznél mutatom be részletesebben az eredményeiket.



6.ábra Az mTOR-gátló kezelések hatásának vizsgálata a galektin-1 expresszióra. a.-b. Különböző lymphoma és leukémia sejtek galektin-1 expressziója fehérje és mRNS szinten (Western blott és RT-PCR) c. Az mTOR gátlás csökkentette a galektin-1 termelést fehérjeszinten. Az mTOR aktivitás csökkenésével párhuzamosan csökkent a galektin-1 expresszió *in vitro* Hodgkin lymphoma sejtekben (WB, KMH2, R: rapamycin 50 ng/ml) és d. *in vivo* HL-xenograftban (c, Rapamune: 3 mg/tkg, IHC 200x)

Az mTOR aktivitás a sejtek anyagcseréjének szabályozásában is fontos, különleges szabályozó szereppel bíró tényező. Az aktivált lymphoid és lymphoma sejtek magas glikolitikus aktivitásában is lényeges szabályozó szerepe van. Terveink között szerepel olyan vizsgálatok végzése az mTOR-ral kapcsolatos vizsgálataink jövőbeli folytatásaként, amelynek során a tumorsejtek (így a lymphoma sejtek esetében) extrém mikrokörnyezeti alkalmazkodásában vagy annak hiányában a tumorsejtek vándorlásában vizsgáljuk az mTOR aktivitás és más az anyagcsere szabályozásban, a daganatos sejtek gyors metabolikus program váltásában szerepet játszó tényezők szerepét. Eddigi eredményeinkkel és mTOR aktivitás meghatározásban szerzett tapasztalatainkkal csatlakoztunk egy a sejtek metabolikus aktivitásának jellemzését segítő vizsgálati technika és assay összeállításához (LC-MS/MS: folyadék kromatográfia-tömegspektrometria segítségével a sejteken belüli bizonyos metabolitok koncentrációjának meghatározása különböző jelölt energia szubsztrátok mellett), amelyben az mTOR aktivitással összefüggő méréseket végeztük el különböző sejtvonalakban. Megfigyeltük, hogy az a

tumorsejtvonal, amely elsősorban nagyon **hatékony glikolízissel** (károsodott, alacsony hatékonyságú TCA ciklus működés mellett) biztosítja a túléléséhez, és proliferációjához a megfelelő energiát **dominánsan mTORC1 aktivitással** rendelkeznek. Míg a más típusú sejt esetében hatékony, az elérhető **tápanyagforrásokhoz jobban alkalmazkodó metabolikus átprogramozó képességet** és párhuzamosan **nemcsak mTORC1, hanem jelentős mTORC2 komplex** expressziót tudunk kimutatni (7. ábra). A munkával kapcsolatos közleményt közlésre elküldtük a BBRC folyóiratba.



7.ábra Eltérő mTORC1/C2 komplex aktivitást mutató daganatsejtek metabolikus eltérései

A munka in vitro kísérleti eredményeivel kapcsolatos elfogadott, benyújtott és várható közlemények:

Egervári G, Márk A, Hajdu M, Barna G, Sági Z, Krenács T, Kopper L, Sebestyén A.: Mitotic lymphoma cells are characterized by high expression of phosphorylated ribosomal S6 protein. Histochem Cell Biol. 2011 135:409-17. IF: 2,588, OTKA feltüntetve

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 as a potential 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 May 22;13:250. doi:10.1186/1471-2407-13-250. IF: 3,319, OTKA feltüntetve

Sebestyén A, Márk Á, Hajdu M, Nagy N, Molnár A, Végső Gy, Barna G, Kopper L: Rapamycin can restore the negative regulatory function of transforming growth factor beta 1 in high grade lymphomas Cytokine, közlésre elfogadva IF:2,874, OTKA feltüntetve

Jeney A., Szoboszlai N., Hujber Z., Fullár A., Oláh J., Pap É., Márk Á., Kralovánszky J., Kovalszky I., Vékey K., Sebestyén A: Multiple assays to characterize the dominant bioenergetic mechanism and its regulators in tumour cells, közlésre elküldve BBRC, elbírálás alatt OTKA feltüntetve

Márk Á, Nagy N, Hajdu M, Dankó T, Csomor J, Csóka M, Kopper L, Sebestyén A: mTOR activity related galectin-1 expression in Hodgkin lymphoma cells and their tissue microenvironment . Histopathology közlésre elküldve, OTKA feltüntetve

Nagy N, Márk Á, Hajdu M, Dankó T, Molnár A, Tóth M, Király P, Csóka M, Sebestyén A: The effect of gamma-szekretáz and mTOR inhibitors in HL cells with constitutive Notch-1 activity. közlésre hamarosan benyújtva, OTKA feltüntetve

In vivo xenograft vizsgálatok elvégzésére az Intézet állatházának megfelelő engedélyei alapján van lehetőségünk, ezzel az állatház rendelkezik és minden állatkísérletet a hatályos jogszabályok és etikai normák betartásával végzünk.

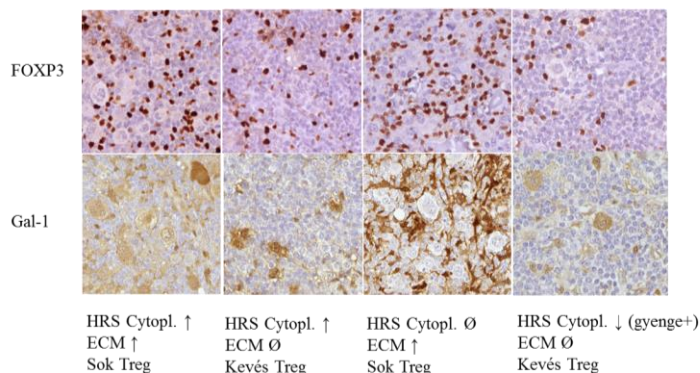
2. Projekt indulásakor még a ***különböző lymphoma típusok mTOR aktivitás***áról is kevés adat állt rendelkezésre, nem ismertük például, hogy a sejtekben kimutatható mTOR aktivitások melyik mTOR komplexhez köthetőek, ezeknek mi lehet a szerepe vagy akár terápiás jelentősége. Abban az esetben pedig, ha ezt terápiás célpontként felhasználnánk a két komplex aktivitás megoszlása, az eddig ismert inhibitor érzékenységi különbségi adatok alapján egyáltalán nem lényegtelen. A Notch szignál elemeinek aktivitásáról HL esetében pedig még kevesebb, de annál ellentmondásosabb adatok álltak rendelkezésre az ALL-ekben jól ismert adatok mellett.

A projekt végrehajtása közben a gyermekkori ALL leukémiák és a HL lymphomák mellett számos lymphoma típus mTOR aktivitásának karakterizálását és ezek klinikai összefüggéseinek vizsgálatát végeztük el, ezekről több nemzetközi közleményben számoltunk be. Párhuzamosan az mTOR aktivitás egyéb bizonyos mikrokörnyezeti hatásait is sikerült vizsgálnunk humán HL-ekben a Notch-1 szignál aktivitás vizsgálatával egy időben.

- a. A legkülönbözőbb ***humán lymphoma biopsziás*** mintákon végzett vizsgálatainkat folytatva p-S6 és p-mTOR festésekkel az mTOR aktivitás mértékét és annak a klinikai adatokkal, a betegek prognosztikai adataival való összefüggését vizsgáltuk. Eredményeinkben kimutattuk, *hogy a Burkitt, a köpenysejtes, az anapláziás nagy sejtes, a Hodgkin (HL) és diffúz nagy B sejtes lymphomákat (DLBCL) magas mTOR aktivitás jellemzi, míg a marginális zóna, a perifériás T sejtes, valamint a kis lymphocytás lymphomákra (CLL) ez nem jellemző.* A több, mint 100-100 a különböző lymphomatípusokat reprezentáló vizsgálat alapján jellemeztük a ***diffúz nagy B-sejtes (DLBCL) és Hodgkin lymphomák*** mTOR aktivitását. Párhuzamosan a két különböző mTOR komplex mennyiségének vizsgálata érdekében a két komplexre jellemző Rictor és Raptor fehérjék expresszió vizsgálatát is elvégeztük. *Eredményeink alapján az mTOR aktivitás meghatározása mellett az mTORC1 és C2 expresszió aránya is lényeges* tényező, aminek nemcsak prognosztikai, de hosszútávon a rossz prognózisú betegek esetében terápiás jelentősége is várható. A vizsgált ***DLBCL-ek*** esetén a betegek közel 40%-ában (ezek szinte kizárólag a korábban és még a jelenlegi R-CHOP terápia mellett is a rosszabb prognózisú non-GC DLBCL-es esetek) a ***magas mTOR aktivitás mellett mTORC2 overexpressziót*** figyeltünk meg, ami a jelenlegi terápia rezisztenciára és a rapalógokkal szembeni csökkent érzékenységre, valamint az új generációs mTORC1/C2 gátlók, dual-inhibitorok későbbi alkalmazásának szerepére egyaránt felhívja a figyelmet. Az összességében lényegesen jobb prognózisú HL-ek esetében ezzel szemben a vizsgált közel 100 esetből csak 1 esetben figyeltük meg a Rictor overexpresszióját (mTORC2 komplex), ez illetve a ***HL-ek közel több mint 90%-ában kimutatott magas mTOR aktivitás,*** a HL-ek mTORC1 gátló, rapalóg érzékenységre utal. Az IHC vizsgálatainkban kapott eredményeinket a betegek klinikai-terápiás és túlélési eredményeivel statisztikailag összevetettük (mindkét csoportban közel 100 beteg adataink elemzését végeztük el), eszerint *az alacsony mTOR aktivitás a lymphomasejtekben általában, de mind a DLBCL, mind a HL lymphomák esetében egyértelműen utal a várható jó prognózisra, míg a magas mTOR aktivitás abban az esetben, ha jelentős mértékű mTORC2 expresszióval jár együtt a várható rossz prognózisra utal.* A DLBCL-es eredményeinket a Modern Pathology, HL-es adatainkat pedig a BMC Cancer c. folyóiratokban közzöltük.

Ugyanazokban a **HL biopsziás mintákban**, amelyek mTOR aktivitás jellemzését is elvégeztük, vizsgáltuk a lymphoma sejtek környezetében található **regulátor T-sejtek** és a toborzásukban bizonyos adatok szerint fontos szerepet játszó in vitro vizsgálatainkban igazoltan **mTOR aktivitás függő módon termelődő galektin-1** jelenlétét. Eredményeink szerint sem a galektin-1, sem a T-reg sejtek Hodgkin, Sternberg-Reed sejtek körüli mikrokörnyezeti aránya nem mutatott összefüggést a HL különböző altípusaival. Összevetettük továbbá a Treg-sejtek vizsgálata során kapott százalékos értékeket a betegek klinikai és mTOR aktivitási adataival. Valamennyi előrehaladott stádiumban diagnosztizált betegnél 20% alatti volt a T-reg sejtek mennyisége. Szintén a 20% alatti infiltrációt mutató esetek közé tartozik az összes beteg, akit a betegség előrehaladását következtében veszítettünk el. A galektin-1 expressziót meghatároztuk a Sternberg-Reed sejtekben és az extracelluláris mátrixban egyaránt. **Erős galektin-1 expressziót** mutattunk ki a tumorsejtekben az esetek 83%-ában. Az esetek 77%-ában volt galektin-1 expresszió a tumorsejtek környezetében. **Az esetek döntő többsége párhuzamosan jelentős mTOR aktivitást** mutatott. Az alacsony mTOR aktivitás a Treg-sejtek mennyiségével nem, viszont a galektin-1 expresszió csökkenésével összefüggést mutatott. **Az összes olyan esetben, ahol a tumorsejtek vagy a mikrokörnyezet csak gyenge galektin-1 expressziót mutatott, a betegek jelenleg is remisszióban vannak** a hosszú távú (>5év) követésben. Mintáink reprezentálják, hogy a HL-ák között alacsony az előrehaladott esetek száma, ezért statisztikai analízist nem végeztünk a galektin-1 expresszió és a prognózis kapcsolatának vizsgálatára. Megfigyeltük azonban, hogy a **HRS-sejtek mikrokörnyezetében a jelentős extracelluláris galektin-1 expresszió magas Treg-sejt mennyiséggel párosult**. Abban az esetben, amikor az ECM-ben alacsony volt a galektin-1 expresszió a Treg-sejtek mennyisége is alacsonyabb volt. (8. ábra)

Az mTOR gátlók alkalmazása az eddigi adatok alapján a magas mTOR aktivitású előrehaladott stádiumú HL-ák esetében elvileg egy potenciális lehetőség. Ezek a betegek a különböző kemo- és sugárterápiát általában már rosszul tolerálják, és az utóbbi években kezelésükben jelentős áttörés, új törzskönyvezett szer nem jelent meg. A rapalógok mellékhatásai előbbiekhöz képest könnyebben tolerálhatóak és kombinációban a hagyományos kezelések csökkentett dózisu alkalmazását (nagyobb hatékonyság mellett) tehetik lehetővé, így a betegség progressziója jelentősen lassítható lehet. Eredményeink a HL mikrokörnyezetben a tumorsejtek galektin-1 expressziójának szerepére hívják fel a figyelmet, ahol az mTOR gátlás mikrokörnyezetre gyakorolt hatásának vizsgálata is fontos szerepet kell kapjon a jövőben. Mivel **az mTOR gátló szerek alkalmazása Hodgkin lymphomákban a mikrokörnyezet megváltozását eredményezheti a galektin-1 expresszió gátlásán keresztül**. A galektin-1 expresszió csökkenése felveti annak a Treg sejtek számára gyakorolt hatását is. Ez azért fontos, mert más a miénktől eltérő eddigi vizsgálatok szerint a rosszabb prognózisú esetekben alacsonyabb volt a T-reg sejtek száma. Az mTOR-gátlás közvetett hatásaként pedig a galektin-1, ezen keresztül a T-reg sejtek szöveti aránya is megváltozhat, így elképzelhető, hogy egy másik mechanizmuson keresztül befolyásolhatja az mTOR gátló kezelés a terápia eredményességét, de természetesen ennek megállapításához további vizsgálatok szükségesek. Eredményeinkből írt kéziratot közlésre benyújtottuk a Histopathology folyóirathoz.



8.ábra HL biopsziás mintákban a különböző galektin-1 és FOXP3 (T-reg sejtekre jellemző expressziós marker) festődési mintázatok.

Eddigiekén túl részt vettünk egy további ritka lymphoma entitás a **primer csont DLBCL jellemzésével** kapcsolatos munkacsoport vizsgálatában, az adott lymphoma sejtek mTOR aktivitásának karakterizálásában is, ahol a korábbi eredményeinkhez hasonlóan igazoltuk ezeknek a DLBCL sejtek magas mTOR aktivitását.

A lymphomák mTOR aktivitásának karakterizálásakor Hajdu Melinda és TDK-sa, valamint az SE Bőrclinika segítségével az mTOR jelút vonal aktivitásának vizsgálatát kezdtük meg **bőr és szisztémás érett T-sejtes lymphomákban valamint mycosis fungoides**-ben is. Intenzív pS6 pozitivitást tapasztaltunk mycosis fungoides előrehaladott, transzformált formáiban. Részleges pozitívítás volt **Sezary-szindrómában**; negatív/nak/gyengén pozitívnak bizonyultak a **perifériás T-sejtes, blastos NK-sejtes lymphomák**. A CD30+ kórképekben az anaplasticus sejtek jelentős része erős pS6 pozitivitást mutatott. Az mTORC2 mennyiségére utaló Rictor kifejezett expressziója leginkább mycosis fungoidesben és a CD30+ lymphoproliferatív kórképek egy részében volt megfigyelhető, míg ez az NK-sejtes lymphomákra nem jellemző. Eredményeink klinikai jelentősége, hogy **az mTOR fokozott aktivitásának kimutatása felveti gátlóinak alkalmazási lehetőségét a terápiarefrakter bőr és szisztémás érett T-sejtes lymphomákban**. Az mTORC2 túlsúlyának ismerete segítheti a megfelelő gátlószer kiválasztását. Az esetek feldolgozása még zajlik, de azt követően legalább egy hazai közlemény várható majd az anyagból az OTKA pályázat feltüntetésével.

A munka humán biopsziákhoz tartozó klinikai adatain és IHC vizsgálatain alapuló eredményekkel kapcsolatos elfogadott, benyújtott és várható közlemények:

Sebestyén A, TB. Sticz, Á. Márk, M. Hajdu, B. Tímár, K. Nemes, N. Nagy, Zs. Váradi, L. Kopper: Activity and complexes of mTOR in diffuse large B-cell lymphomas – a tissue microarray study. Modern Pathology 2012 Dec;25(12):1623-8. IF: 5,253 , OTKA feltüntetve

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 as a potential 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 May 22;13:250. doi:10.1186/1471-2407-13-250. IF:3,319, OTKA feltüntetve

Márk Á, Noémi Nagy, Melinda Hajdu, Titanilla Dankó, Judit Csomor, Mónika Csóka László Kopper, Sebestyén A: mTOR activity related galectin-1 expression in Hodgkin lymphoma cells and their tissue microenvironment. Histopathology közlésre elküldve, OTKA feltüntetve

Rajnai H., Heyning F.H., Koens L., *Sebestyén A.*, Andrikovics H., Hogendoorn P.C.W., Matolcsy A., Szepesi Á.: The density of CD8+ T-cell infiltration and expression of Bcl-2 predicts outcome of primary diffuse large B-cell lymphoma of bone. *Virchows Arch.* 2014, 464:229-239. IF:2,56

Harazstombi J.: Az mTOR jelút vonal aktivitásának vizsgálata bőr és szisztémás érett T-sejtes lymphomákban. Semmelweis Egyetem TDK Konferencia 2014 – III.dj OTKA feltüntetve, anyagból egy közleményt tervezünk az OTKA feltüntetésével

- b. Több éven keresztül fagyasztva gyűjtöttük és jelenleg is gyűjtjük **gyermekkori ALL-s betegek izolált leukémia sejtjeit**, a diagnózis és a kezelési protokoll minden időpontjában. A sejtek mTOR aktivitásával arányos különböző foszforilált fehérjék mennyiségi vizsgálatát többféle technikával és ELISA-val is vizsgáltuk. A betegek esetében jelenleg ennek vizsgálatára a legalkalmasabb általunk beállított technikának a p-4EBP1 (direkt mTOR target) ELISA bizonyult. Direkt jelzett ellenanyagok segítségével egy azonnal elvégezhető, gyors áramlási citometriai vizsgálat beállítását is elvégeztük és ennek lehetséges felhasználhatóságát jelenleg teszteljük, összehasonlító vizsgálatokat végzünk beérkező új esetek segítségével, hogy szükség esetén gyakorlatban is alkalmazható legyen. Eredményeink szerint a ***gyermekkori ALL sejtek magas mTOR aktivitással rendelkeznek*** (B illetve T sejt eredettől függetlenül). ***Rossz prognózisú leukémiás gyerekek esetében a diagnóziskori mintákban az mTOR aktivitás azonban szignifikánsan magasabb***, mint a jó prognózisú esetekben és ez az aktivitási érték a recidívában tovább emelkedik. Mindezek és a primer leukémia sejtek in vitro short term mTOR gátló kezelés után kapott egyedi érzékenységre utaló eredményeink különösen fontosak. Az mTOR aktivitás nemcsak a diagnóziskori prognosztikai értékelésben, a terápiás döntések meghozatalában, hanem később a relapszusos vagy várhatóan rossz prognózisú esetek kezelésében a protokollok tervezésében is nagy jelentőségűek lehetnek. A részletes vizsgálati eredményeinket a PLoSOne folyóiratban közzeltük.

Ugyanezekben az esetekben megvizsgáltuk különböző, más leukémiákkal és lymphomákkal illetve potenciálisan az mTOR aktivitás szabályozási zavarával összefüggésbe hozható bizonyos mikro RNS-ek (miR-ek) expresszióját. A legérdekesebb eredményünk az ALL-es sejtekben kimutatott igen nagymértékű ***miR 128b overexpresszió és a miR 223 alacsony expressziója***. Mindkét miR expressziója a kezelés során, a normál csontvelő repopulációjakor a normál mononukleáris sejtekben levő szintre rendeződik, de relapszuskor a diagnóziskor mért expresszió szinteket szignifikánsan meghaladja. Azt is kimutattuk, hogy fordított irányú összefüggés figyelhető meg a betegek jó prognózisa és a miR 128b overexpressziójának mértéke között. Minél magasabb az expresszió fokozódás, annál jobb a várható prognózis. Korábbi irodalmi adatok már beszámolnak a miR 128b expressziójának emelkedéséről, de az ALL-ek prognózisával mutatott összefüggését eddig még nem vizsgálták és nem mutatták ki. Bizonyos adatok szerint bizonyos ALL-ek esetében a miR 128b expresszió fokozásával növelhető a sejtek glukokortikoid érzékenysége. Ez a megfigyelés jól korrelál saját adatainkkal, amely szerint az ALL sejtekben megfigyelt, ***jellemzően szignifikánsan magasabb miR 128b összefügg a jó szteroid válasszal***, korrelál a jó prognózissal, ami egyértelműen megerősíti a miR 128b és a leukémia sejtek szteroid érzékenységének kapcsolatát.

A vizsgálatainkba bevont miRNS-ek közül három esetében (miR 21, miR 223, miR 128b) irodalmi adatok alapján felmerülhet, hogy szerepet játszhatnak az mTOR út vonal, és a jelátviteli út vonal aktivitását szabályozó fehérjék expressziójának szabályozásában.

Vizsgálataink szerint mind *az mTOR aktivitás mértéke, mind a miR 223 és miR 128b expresszió szintek összefüggést mutattak a gyermekkori ALL-es betegek prognózisával.* Más sejttípusokban kapott eredmények alapján feltételezhető, hogy a fokozott miR 128b expresszió a PTEN gátlása révén, míg az alacsony miR 223 expresszió az IGFR szignál aktivitásának szabályozásán keresztül járulhat hozzá a magas mTOR aktivitáshoz. Alábbi összefüggéseket támasztja alá a vizsgált leukémia sejtek esetében a jó és rossz prognózisú betegek mTOR aktivitása és miR 128b expressziója közötti fordított irányú korreláció. Statisztikailag Spearman-féle korreláció vizsgálattal szignifikáns fordított irányú összefüggést tudunk kimutatni a magasabb mTOR aktivitást jelző p-4EBP1 OD (1.1<) értékek és az alacsonyabb (80x>) miRNS 128b expresszió szintek között. Természetesen ennek a lehetséges összefüggésnek az igazolásához további vizsgálatok is szükségesek, de eredményeink nagy részét a projekt végére már sikerült közölnünk.

Nemes K and *Sebestyén A*, Márk A, Hajdu M, Kenessey I, Sticz T, Nagy E, Barna G, Váradi Z, Kovács G, Kopper L, Csóka M. Mammalian target of rapamycin (mTOR) activity dependent phospho-protein expression in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). PLoS One. 2013;8(4):e59335. doi: 10.1371/journal.pone.0059335. IF=3,53, OTKA feltüntetve

Nemes K, Csóka M, Nagy N, Márk A, Váradi Z, Dankó T, Kovács G, Kopper L, *Sebestyén A*: Expression of Certain Leukemia/Lymphoma Related microRNAs and its Correlation with Prognosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Pathol Oncol Res. 2014 Nov 12. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25388103. IF:1,806, OTKA feltüntetve

A megszerzett elméleti és metodikai tapasztalatainkkal *több más tumor mTOR aktivitását érintő vizsgálathoz nyújtottunk és nyújtunk kollaborációban segítséget*, ezek nyomán is több az eredeti projekttől független közlemény született, illetve várható a jövőben (tüdő adenokarcinómák, más karcinómák és primer agyi lymphomák), ezek természetesen alapvetően más projektekhez kapcsolódó közlemények.

Pócza T, *Sebestyén A*, Turányi E, Krenács T, Márk A, Sticz TB, Jakab Z, Hauser P: mTOR pathway as a potential target in a subset of human medulloblastoma. Pathol Oncol Res. 2014 Oct;20(4):893-900. IF:1,806.

Vizsgálatainkban diagnosztikai célból eltávolított szövetmintákat illetve a vérminták esetén, a diagnózis után már szükségtelen, megmaradt sejteket használtunk fel. Ilyen vizsgálatokhoz intézetünk, illetve munkacsoportunk rendelkezik a megfelelő etikai engedélyekkel.

Összefoglalva:

A projekt lehetővé tette, hogy feltérképezzük a legkülönbözőbb lymphoma- és leukémia-típusok mTOR aktivitását, mTORC1/C2 komplex expresszióját és ezek jelentőségét a kóros sejtek proliferációjában és túlélésében. Vizsgálataink alapján az akut lymphoid leukémia sejtekre, a köpenysejtes, a Burkitt-, a diffúz nagy B-sejtes, a Hodgkin és kután T sejtes lymphomák nagy részére jellemző az emelkedett mTOR aktivitás. Elsőként karakterizáltuk részletesen a Hodgkin lymphomák, DLBCL-ek és az ALL leukémia sejtek mTOR illetve mTORC1/C2 komplex aktivitását. Eredményeink szerint, adott hematológiai malignitások között a magasabb mTOR aktivitás, különösen, ha az mTORC2 komplexhez köthető, akkor mindenképpen a rossz prognózis jele. Az mTORC1 aktivitás szignifikánsan magasabb volt a rossz prognózisú ALL-ekben. A DLBCL-es adataink alapján pedig az mTORC2 komplexhez

köthető magas mTOR aktivitás korrelál a rosszabb prognózissal és rövidebb betegség mentes illetve teljes túléléssel. A jó prognózisú HL esetében is kimutattuk a normál lymphoid sejtekhez képest emelkedett mTOR aktivitást, de ezekre az esetekre nem jellemző az mTORC2 komplex jelenléte. A HL-ákban és HL sejtvonalakban konstitutív, ligand független magas Notch-1 szignál aktivitást igazoltunk. A lymphoma sejtvonalak párhuzamosan magas mTOR aktivitással jellemezhetőek, de a két komplex (mTORC1/2) aktivitásának aránya egyedi eltéréseket mutat, ami az inhibitor érzékenységgel mutat összefüggést.

Kísérleteinkben igazoltuk, hogy: a. az mTOR aktivitás gátlásával a HL sejtekben jellemző konstitutív Notch-1 aktiváció proliferációs hatásai gátolhatóak, a két szignál együttes gátlása jelentős mértékű növekedésgátló hatású in vitro és in vivo is; b. az mTOR aktivitása a galektin-1 expresszió szabályozásán keresztül a lymphoma sejtek mikrokozonyzetének átalakításában és a T-reg sejtek megoszlásának megváltoztatásában is szerepet játszhat; c. mindkét mTOR komplex aktivitása fontos tényező lehet a daganatsejtek mikrokozonyzeti alkalmazkodásában, a tápanyag- és energiaforrásokhoz adaptálódó metabolikus átprogramozási képességben; d. a különböző mTOR inhibitorok potenciális terápiás eszközök lehetnek a DLBCL-ek magas mTOR aktivitású, nem centrum germinatívum eredetű csoportjában és a refrakter terápia rezisztens Hodgkin lymphoma és ALL esetekben is. Elsősorban in vitro eredményeink alapján az utóbbiak esetében azonban az mTORC1/C2 aktivitás vizsgálata segítheti a megfelelő terápia tervezését.

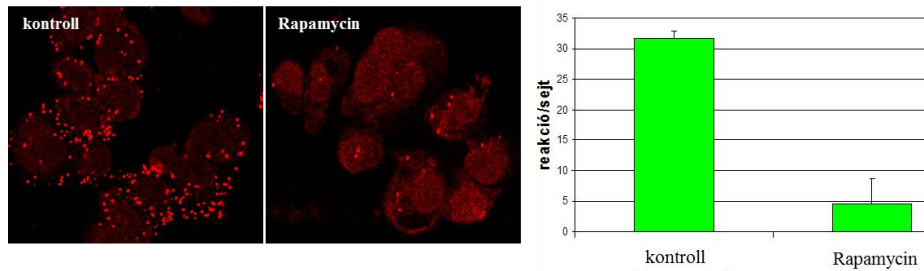
Munkánk során több olyan patológiai mintákon alkalmazható festési eljárás beállítását is elvégeztük, megkezdjük illetve teszteltük/teszteljük, amelynek segítségével a biopsziás mintákban a tumorsejtek mTOR aktivitásának és a C1 vagy C2 komplexhez köthető aktivitásnak kvantitatív meghatározása is lehetővé válik, amelynek az mTOR gátlók célzott terápiás alkalmazása előtt a tumorsejtek mTOR aktivitás meghatározásakor kiemelkedő fontossága lehet.

Az mTOR aktivitással kapcsolatos vizsgálataink gyakorlati hasznosulása:

Az mTOR aktivitás vizsgálatok *patológiai diagnosztikai, biopsziás mintákon végzett meghatározását*, amelyet laboratóriumunkban a projekt keretei mellett beállítottunk már bizonyos esetekben onkológusok, klinikusok is kérik. Olyan betegeknel, ahol a jelenlegi kezelési protokoll-ok már vagy hatástalanok, vagy tolerálhatatlanok és van mód egyéni elbírálás és a zajló nemzetközi fázis *vizsgálatok eredményei alapján mTOR gátló kezelés megkezdésére* (ilyenek pl. terápia rezisztens végstádiumú HL relapszus, kevert haemangioma-lymphangioma, bizonyos sarcoma-k, medulloblastoma és más idegrendszeri tumorok...), intézetünkben lehetőség szerint elvégezzük a vizsgálatokat konzílium keretében.

Párhuzamosan több új az *mTOR aktivitás rutin meghatározását* segítő módszert állítottunk be: 1. Direkt jelzett *anti-p4EBP1 és anti-pS6 áramlási citometria* vizsgálatát. Ennek segítségével a különböző leukémiás, Sezary-szindrómás mintákban vagy lymphomás nyirokcsomókban a malignus sejtek mTORC1 aktivitás meghatározása lehetséges. 2. Beállítottunk egy új módszert, a *Duolink immun-előhívási technikát*, amelynek segítségével foszfo-proteinek és protein-protein komplexek in situ kvantitív expresszió vizsgálata lehetséges (ezt a módszert bemutattuk a Magyar Patológusok Kongresszusán, Magyar Onkológusok Társaságának és a hazai Membrántranszport kongresszusokon, utóbbi kettőn a legjobb poszterprezentáció/poszterelőadás díját nyerték el hallgatóim) (9. ábra). Ezzel a technikával a sejtek aktív mTORC1 és mTORC2 aktivitásának arányát is meg lehet hamarosan határozni nem fixált (fagyasztott) szövetek vagy sejtek esetében. 3. Előbbi

továbbfejlesztésével pedig *biopsziás minták mTORC1 és mTORC2 aktivitás* arányának kvantitatív immunhisztokémiai értékelésére is lehetőség nyílt.



9.ábra mTORC1 aktivitás gátlás hatásának kvantitatív meghatározása Duolink módszerrel. p-S6 mennyiségi változásainak kvantitatív meghatározása *in vitro* rapamycin (50 ng/ml, 24 h) kezelt sejtek cytospin preparátumain (Blobfinder software-rel értékelve; piros: pontszerű pozitív reakció; 1000x)

Részletesebben vizsgáltuk és követtük annak a lymphomás gyermeknek mintáit, aki több mint 10 éven keresztül kezelték a Semmelweis Egyetem II. Gyermekklinikáján. Minden elérhető archív mintájában vizsgáltuk az mTOR aktivitást, az összes minta malignus sejteiben igazoltuk a magas aktivitást annak ellenére, hogy a lymphoma morfológiailag a diffúz nagy-B sejtjes és HL-kra jellemző fenotípusos jegyeket váltotta a kezelése során (ez egy nemrég külön entitásként meghatározott ritka lymphomatípus). A betegség végső szakaszában a terápiás lehetőségek korlátozottsága miatt, ezekre az **eredményekre is alapozva mTOR gátló kezelést alkalmaztak**, amely a betegség progresszióját lelassította, jelentősen befolyásolta. Az esettel kapcsolatos klinikai és patológiai adatokat, illetve mTOR aktivitással kapcsolatos eredményeinket eddig egy nemzetközi konferencia absztrakt formájában is közzétettük.

Csóka M, Nemes K, Márk Á, Váradi Zs, Nagy N, Molnár A, Matolcsy A, Szepesi Á, Csomor J., Kovács G, Sebestyén A: Clinical appearance and mTOR activity in a patient with large B-cell lymphoma and with Hodgkin's features. 2012. 44th Congress of the International Society of Pediatric Oncology – London, UK, OTKA feltüntetve

Márk Á., Nagy N., Paku S., Kopper L., Sebestyén A.: Fehérjék kölcsönhatásának és aktivitásának új kvantitatív vizsgálati lehetősége *in situ*. Magyar Onkológusok Társaságának Kongresszusa 2011. 11.10-12., Budapest. poszter prezentáció 1.dj - Magyar Onkológia 2011, 55:1 S47., OTKA feltüntetve

Nagy N. Márk Á., Paku S. Németh Zs., Buthi N, Kopper L, Sebestyén A: mTOR komplexek aktivitás vizsgálata *in situ*. Membrántranszport Konferencia 2013 Sümeg, díjazott poszterelőadás, OTKA feltüntetve

Vizsgálataink eredményeivel kapcsolatosan több hazai (2db) és nemzetközi folyóirat közleményt (8 db) sikerült elfogadtatnunk és közzéznünk, várható még további, jelenleg benyújtott vagy hamarosan benyújtásra kerülő további nemzetközi közlemények (3 db) mielőbbi közlése is. Mindezek mellett, a beszámoló végén bemutatott egyéb közléseink, pl. a projekthez kapcsolódó PhD és graduális hallgatók disszertációinak mennyisége, a különböző megnyert díjak és elismerések is mutatják, hogy a projekt számos hazai biológus- és orvostanhallgató kiváló minőségű kutatómunkájához is segítséget nyújtott. A bemutatottak mellett elismerés volt, hogy előadásban mutathattam be az mTOR aktivitással kapcsolatos vizsgálatainkat, technikákat az ECCO és az EACR Nemzetközi stockholmi Multidiszciplináris Európai Onkológia Konferenciáján (Európai Ráktársaságok egyik

legnagyobb konferenciája) 2011-ben. Felkértek több hazai magyarnyelvű, az mTOR terápiás jelentőségével kapcsolatos összefoglaló közlemény elkészítésére, amelyekből az egyik az Orvostovábbképző Szemlében már megjelent. A munkacsoport tagjai és hallgatóim eredményeinket számos további hazai és nemzetközi konferencián mutatták be előadások és poszter prezentációk formájában, ezeknél a támogatást feltüntettük.

A jelentésben korábban nem felsorolt, a munkával kapcsolatos további közlemények és kongresszusi absztraktok:

Magyar nyelvű összefoglaló közlemény

Sebestyén A., Kopper L.: A mammalian target of rapamycin (mTOR) és gátlóinak szerepe, mellékhatásaik. Orvostovábbképző Szemle 2014 augusztus 5-13, OTKA feltüntetve

Nemzetközi konferencia előadások és absztraktok

Sebestyén A., Nemes K., Márk Á., Váradi Zs., Hajdu M., Sticz T., Kopper L., Csóka M.: Mammalian target of rapamycin (mTOR) activity dependent protein expression and rapamycin sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemias. előadás: 2011 szeptember 24-27 ECCO European Multidisciplinary Cancer Congress – Stockholom, OTKA feltüntetve

Sebestyén A., Márk Á., Nagy N., Molnár A., Sticz T., Hajdu M., Tímár B., Csóka M., Kopper L.: Potential prognostic and therapeutic importance of mTOR complexes related activities in human lymphomas. Recent advances in Molecular and Cellular Pathology 2013. december London – a legjobb poszter prezentáció díj

Sebestyén A., Nagy N., Márk Á., Molnár A., Dankó T., Hajdu M., Tóth M., Tímár B., Csóka M., Kopper L.: mTOR C1/2 activities - related protein expression and its potential prognostic/therapeutic importance in certain lymphoid malignancies. elfogadott absztrakt. American Association of Cancer Research Special Conference on Targeting the PI3K-mTOR Network in Cancer, September 14–17, 2014, Philadelphia-USA, OTKA feltüntetve

Nagy N., Márk Á., Paku S., Németh Zs., Buthi N., Kopper L., Sebestyén A.: Expression and activity analysis of mammalian target of rapamycin complexes in different human lymphoma cells. European Cancer Congress, 2013. szeptember, Amsterdam, poszter, OTKA feltüntetve

Márk Á., Hajdu M., Nemes K., Sticz T., Egervári G., Kopper L., Sebestyén A.: Cell type dependent ribosomal S6 protein activation in mitosis. poszter - Molecular Mechanisms in Signal Transduction and Cancer August 16-24, 2011 Spetses (Grecia), OTKA feltüntetve

Váradi Zs., Sebestyén A., Nemes K., Márk Á., Hajdu M., Sticz T., Kovács G., Kopper L., Csóka M.: Rapamycin sensitivity and mTOR activity in lymphoma/leukemia cells. 1. díjas előadás - 20th Meeting of European Society of Pediatric Clinical Research 2011. Brno, OTKA feltüntetve

Sticz T.B., Márk Á., Hajdu M., Tímár B., Nemes K., Kopper L., Sebestyén A.: Tissue-micro array based IHC analysis of mTOR activity in DLBCL. poszter - 102nd Annual meeting of AACR 2011. április AACR Congress Proceedings 52: 756-757, OTKA feltüntetve

Márk Á., Hajdu M., Nagy N., Váradi Zs., Sticz T., Tímár B., Csóka M., Kopper L., Sebestyén A.: Mammalian target of rapamycin (mTOR) activity as a potential target in human diffuse large B-cell lymphomas and Hodgkin lymphomas. 2012. 07.07-10. Barcelona 22nd Biennial Congress of the EACR. poszter - Eur. J. Cancer 2012 48 (S5):S190, OTKA feltüntetve

Fontosabb hazai előadások, konferencia absztraktok:

Sebestyén A., Márk Á., Nemes K., Váradi Zs., Nagy N., Sticz T., Csóka M., Kopper L.: mTOR inhibitor érzékenység vizsgálatok lymphomákban és gyermekkori leukémiában. Magyar Onkológusok

Társaságának Kongresszusa Budapest 2011.11.10-12. előadás, Magyar Onkológia 211, Magyar Onkológia 2011, 55:1 S65., OTKA feltüntetve

Sebestyén A, Márk Á., Sticz T., Hajdu M., Váradi Zs., Nagy N., Molnár A., Barna G., Csóka M., Tímár B., Kopper L.: mTOR (mammalian target of rapamycin) aktivitás és érzékenység vizsgálatok human lymphomákban. 2012.05.24-26. Szeged Malignus Lymphoma Konferencia. előadás – Hematológia-Transzfuziológia 2012, 45 1S:41-42, OTKA feltüntetve

Sebestyén A., Márk Á., Nagy N., Hajdu M., Csóka M., Sticz T., Barna G., Váradi Zs., Kopper L.: Különböző típusú lymphomák, leukémiák mTORC1 és C2 komplexhez köthető mTOR aktivitása, mint terápiás target Magyar Onkológus Társaság Konferencia 2013- előadás, Magyar Onkológia 57 (1): Suppl. 80, OTKA feltüntetve

Sebestyén A, Nagy N, Márk Á, Molnár A, Hajdu M, Tóth M, Dankó T, Csóka M, Kopper L: Activated mTORC1/C2 complexes and their biological importance in lymphoid malignancies. Magyar Immunológus Társaság 43, vándorgyűlése, 2014 október 15-17. Velence – előadás, Immunológia Szemle 6 (3-4): 42, OTKA feltüntetve

Márk Á., Nagy N., Paku S., Kopper L., Sebestyén A.: Fehérjék kölcsönhatásának és aktivitásának új kvantitatív vizsgálati lehetősége in situ. Magyar Onkológusok Társaságának Kongresszusa 2011. 11.10-12., Budapest. poszter prezentáció 1.dj - Magyar Onkológia 2011, 55:1 S47., OTKA feltüntetve

Nagy N , Márk Á, Paku S, Kopper L, Sebestyén A: In situ analisis of mammalian target of rapamycin (mTOR) complexes. Semmelweis Egyetem, PhD Tudományos Napok 2013 Budapest, díjazott előadás; Nagy N. Márk Á., Paku S. Németh Zs., Buthi N, Kopper L, Sebestyén A: mTOR komplexek aktivitás vizsgálata in situ. Membrántranszport Konferencia 2013 Sümeg, díjazott poszterelőadás, OTKA feltüntetve

Márk Á., Nagy N., Paku S., Kopper L., Sebestyén A.: Aktivált fehérjék és fehérjekomplexek új vizsgálati módszere in situ. poszter Magyar Patológus Konferencia 2011. 09.29.-10.01. Siófok poszter, OTKA feltüntetve

Nagy N, Márk Á, Hajdu M, Tóth M, Dankó T, Király P, Bödör Cs, Hollósi P, Kopper L, Sebestyén A: Characterization of the Notch and mTOR pathway in context of their crosstalk in Hodgkin lymphomas. Magyar Immunológus Társaság 43, vándorgyűlése, 2014 október 15-17. Velence – poszter, Immunológia Szemle 6 (3-4): 38, OTKA feltüntetve

Doktori fokozatszerzések, Szakdolgozatok, TDK konferencia helyezések ill. hallgatók által elnyert kiválósági díjak:

Márk Ágnes : Az mTOR (mammalian target of rapamycin) aktivitás jelentősége humán lymphomákban. **PhD tézis – Doktori fokozat szerzés** (2013 – SE, Doktori Iskola, Patológia Tudományok Doktori Program), A tézis eredményeit összefoglaló közlemény megjelent ugyanezzel a címmel a Magyar Onkológia 2014. 58:143-148, OTKA feltüntetve

Nemes Karolina: mTOR kináz aktivitás meghatározás, a rapamycin kezelési lehetőségének vizsgálatát gyermekkori akut lymphoid leukémiában **PhD tézis** 2014-ban benyújtásra került a fokozatszerzés folyamatban van

Szakdolgozatok, amelyek a projekttel kapcsolatos kutató munka és témavezetésem segítségével jöttek létre - Nagy Noémi (ELTE TTK Biológus MSc.) 2012; Németh Zsófia (BME Biomérnök BSc.) 2013; Molnár Anna (ELTE TTK Biológus BSc.) 2014; Buthi Nóra (SE, ÁOK) 2015.

Nagy Noémi: mTOR (mammalian target of rapamycin) aktivitás, mint hemato-onkológiai terápiás célpont című TDK munkájával 2011-ben az ELTE TTK biológus TDK konferenciáján majd mTOR (mammalian target of rapamycin) aktivitás , mint lehetséges célpont Hodgkin és diffúz nagy B-sejtes lymphomákban TDK munkájával az SE Orvos-, Fogorvos- és Gyógyszerésztudományi TDK-ján 2012-

ben II. helyezést ért el, ezt követően a **XXXI. Országos TDK Konferencián a Biológia Szekcióban 2013-ban III. helyezett lett.** OTKA feltüntetve

Molnár Anna – témavezetésemmel az mTOR aktivitással kapcsolatban végzett kutatásaival elnyerte a **Kuffler alapítvány (Stephen W. Kuffler Kutatási Alapítvány) díját**, eredményeit a Magyar Tudományos Akadémián adta elő 2014. decemberben, emellett Molnár Anna elnyerte még 2014-ben a **Nemzeti Tehetségsegítő Tanács Felfedezettjeink 2014 fődíját**, valamint az **ELTE TTK Kar Kiváló Hallgatója** díját is. Molnár A: A daganatok gyógyításának nyomában – Bolyai Kollégium – ismeretterjesztő előadás 2014. március, OTKA feltüntetve

A munkában résztvevő kutatók, egyéb résztvevők és hallgatók:

Az *eredetileg tervezett senior kutatók, kutatók vettek részt a munkában* elsősorban, de természetesen egyes közlemények elkészítésében más kollégák is részt vállaltak. Minden résztvevő legalább egy, de inkább több közlemény szerzői között szerepel és végig nyomon követte a projekt alakulását, végrehajtotta a feladatait. Eredetileg 2 PhD hallgató részvételét terveztük biztosan a projektben, egyikük PhD hallgatóként (Márk Ágnes) végig részt vett a projektben, közben megszerezte PhD fokozatát is, ami a projekt anyagához csatlakozik. Egervári Gábor, korábbi TDK hallgatóm, a munka elején vett részt vizsgálatainkban, majd egy másik amerikai PhD programba nyert felvételt így helyette más csatlakozott a projekthez, egy PhD hallgató, aki már tanulmányait azóta befejezte és a fokozatszerzési eljárást megkezdte (Sticz Tamás – DLBCL-s vizsgálatok) és saját témavezetésem alatt egykori TDK hallgatóm, Nagy Noémi. Nagy Noémi 2012-től PhD hallgatóként csatlakozott és jelenleg kezdi meg a fokozatszerzési eljárást, doktori tézise a projekt témájában várható, a Notch útvonallal kapcsolatos vizsgálataink eredményei képezik tézisei alapját. Az utolsó évben a metabolit vizsgálatokba csatlakozott be Hujber Zoltán, aki jelenleg már PhD hallgatóként tartozik a munkacsoporthoz. A Klinikai Onkológia programból is csatlakozott munkánkhoz egy PhD hallgató (Nemes Karolina), aki dr. Csóka Mónika segítségével elsősorban az ALL-ekkel kapcsolatos vizsgálatainkban vett részt, jelenleg az ő fokozatszerzése is folyamatban van, így *a tervezettnél megfelelően az egész projekt során mindig legalább két PhD hallgató és mellette számos egyetemi TDK hallgató* is segítette a projekt kísérleteinek végrehajtását. Természetesen a projekt technika menedzselésében az intézet gazdasági osztályának dolgozói és az intézet asszisztensei (szövetetani, szövettenyésztési és állatházi kollégák) is segítettek alkalomszerűen a munkánkat. A *projekt végrehajtásában közreműködők személyében lényegi eltérés nem volt.*

