

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

Doktori értekezés

Sztankovics Dániel

Semmelweis Egyetem
Patológia és Onkológia Doktori Tagozat



Témavezető: Dr. Sebestyén Anna, DSc, kutatóprofesszor

Hivatalos bírálók: Dr. Bugyik Edina, PhD, tudományos
munkatárs

Dr. Szebeni Gábor János, PhD,
tudományos főmunkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Losonczy György, DSc, egyetemi
tanár

Tag: Dr. Komlósi Zsolt István, PhD, egyetemi
docens

Rubovszkyné Dr. Gallai Mónika, PhD,
biológus

Budapest
2024

1. Bevezetés

A tumorsejtek korlátlan osztódását a jól ismert mutációs változások mellett, azokkal összefüggésben a jelátviteli és anyagcsere-útvonalak változásai is segítik. Ezek szabályozásában és működésében számos központi szabályozó molekulának és kulcsfontosságú metabolikus enzimnek van szerepe. A *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) kináz részt vesz a sejtek jelátviteli útvonalainak és anyagcseréjének (pl.: a fokozott glükóz- vagy aminosavfelvétel) szabályozásában, a sejtek növekedésének és túlélésének fenntartásában (pl.: proliferáció, motilitás, migráció, fehérjeszintézis, transzkripció), valamint a stresszhelyzetekre adott válaszok irányításában is.

Az mTOR-kináz a sejtekben két különböző komplexben – az mTOR-komplex 1-ben (mTORC1) és az mTOR-komplex 2-ben (mTORC2) – fordul elő. Ezek eltérő katalitikus alegységekből épülnek fel és funkcionálisan is különböznek egymástól. Az aktív mTORC1 számos felépítő folyamatban játszik szerepet, mint például a fehérje-, lipid- és nukleotidszintézis, valamint a riboszóma-biogenezis. Ezzel szemben az mTORC2-nek kiemelt jelentősége van a sejtek túlélésének, differenciációjának, növekedésének és migrációjának szabályozásában, valamint az aktin citoszkeletális rendszer fenntartásában.

Az mTOR-kináz diszfunkciója hozzájárulhat a jelátviteli/metabolikus útvonalakban bekövetkező szabályozási zavarok, illetve különböző betegségek (pl.: anyagcserezavarok, neurodegeneratív és kardiovaszkuláris betegségek, öregedés, daganatok) kialakulásához és progressziójához. Ennek hátterében az mTOR-kinázt érintő génmutációk, az mTOR-komplex aktivitását közvetlenül szabályozó fehérjék mutációi

vagy a jelátviteli hálózat egyéb változásai (pl.: onkogén vagy tumorszuppresszor gének mutációi) állhatnak.

Az mTOR-útvonalat érintő egyéb mutációkon kívül az mTOR-komplex alegységeiben is előfordulhatnak mutációk. A leggyakoribb ilyen genetikai eltérés a *RICTOR* (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) génamplifikáció, amely a Rictor fehérje fokozott expresszióját okozza, növelve az mTORC2 és az Akt-kináz aktivitását, valamint az mTORC1- és mTORC2-komplexek arányának eltolódását, elősegítve a tumorsejtek növekedését és túlélését. A *RICTOR*-t 2004-ben azonosították az mTORC2 vázfehérjéjeként. Elsődleges funkciója a komplex összeszerelésének irányítása és szerkezeti integritásának fenntartása. A jelenlétében az mTOR-kináz FRB-régiója a komplexen belül helyezkedik el, megakadályozva a legismertebb és legszélesebb körben alkalmazott első generációs allosztérikus mTOR-gátlók (pl.: rapamycin és rapalógok) hozzáférését a komplexhez.

A *RICTOR*-amplifikáció jelentős szerepet játszik a daganatok progressziójában és az áttétképződésben különböző jelátviteli útvonalak (pl.: MAPK/ERK, Wnt/ β -katenin) szabályozásán keresztül. Számos tanulmány kimutatta a *RICTOR*-amplifikációt és a fokozott Rictor-expressziót különböző daganattípusokban, többek között tüdő-, nyelőcső-, emlő-, hasnyálmirigy és májdaganatokban, illetve melanómában. Az előbbieket mellett a *RICTOR*-amplifikáció és/vagy a fokozott Rictor-expresszió rosszabb prognózissal és rövidebb teljes túléléssel társult több daganattípus esetében is.

A PI3K/Akt/mTOR-útvonal szabályozási zavarai a tüdődaganatok patogenezisében is fontos szerepet töltenek be. Az mTOR-hiperaktivitás jelátviteli útvonalak genetikai eltérései (pl.: *EGFR*- vagy a *KRAS*-mutáció),

onkogén (pl.: *PIK3CA*, *RICTOR*, *AKT1/3*, *TSC1/2*, *MTOR*), valamint egyéb tumorszuppresszor (pl.: *PTEN*, *STK11*) gének mutációja révén is kialakulhat. Az mTOR-út vonal eltéréseinek előfordulási gyakorisága az adenocarcinomákban 90%, a laphámcarcinomákban 40% és a kissejtes tüdőcarcinomákban (SCLC) 36%. A *RICTOR*-amplifikáció az egyik leggyakoribb genetikai eltérés az összes szövettani altípusban. Előfordulását az adenocarcinomák 10%-ában, a laphámcarcinomák 15%-ában, az SCLC-k 12%-ában figyelték meg.

Az SCLC-k a leggyakoribb neuroendokrin (NE) tüdődaganatok, megjelenésük erős összefüggést mutat a dohányzással. Az SCLC magas proliferációs rátával, korai metasztázisképződéssel és rossz prognózissal jellemezhető. Az SCLC-k esetében az agyi áttétek gyakoriak, és már a betegség korai szakaszában kialakulhatnak. A közelmúltban négy fő molekuláris szubtípust azonosítottak az ASCL1 (SCLC-A szubtípus), a NeuroD1 (SCLC-N szubtípus), a POU2F3 (SCLC-P szubtípus) és a YAP1 (SCLC-Y szubtípus) transzkripciós faktorok fokozott expressziója alapján, melyek lehetőséget teremthetnek az adenocarcinomákhoz hasonló, célzott terápiás készítmények ajánlására. Annak ellenére, hogy a PI3K/Akt/mTOR-út vonal eltérései gyakoriak az SCLC-kben, csak korlátozott adatok állnak rendelkezésre az mTOR-aktivitás és az újonnan leírt molekuláris szubtípusok közötti összefüggésekről.

Az mTOR-hiperaktivitás hátterében álló specifikus molekuláris változások (pl.: onkogén mutációk vagy fokozottan expresszáldott fehérjék) a személyre szabott kezelések során terápiás célpontok lehetnek. Az első generációs allosztérikus mTOR-gátlók hatékonyak lehetnek az mTORC1-hiperaktivitás esetén, azonban bizonyos ismert FRB-domén mutációk vagy magas

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

Az mTORC1-aktivitás *in situ* jellemzését az mTOR-kináz aktív, foszforilált formájának (p-mTOR) és foszforilált direkt és indirekt célmolekuláinak (pl.: p-4EBP1, p-S6K1, p-S6) immunhisztokémia (IHC)/immuncitokémia (ICC) vizsgálatával végezhetjük. Az irodalmi adatok és korábbi vizsgálataink alapján az mTORC2 aktivitásának nyomon követésére a legmegfelelőbb marker az Akt-kináz foszforilált 473-as szerin aminosavának (p-Akt (Ser473)) kvantitatív és *in situ* kimutatása. Továbbá a *RICTOR*-amplifikáció jelenléte magas mTORC2-aktivitással függhet össze, így a PI3K/mTOR/Akt-útvonal hatékony gátlásának egyik prediktív markere lehet. A *RICTOR*-amplifikáció „gold standard” validálási módszere a fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH). A gén kópiaszámában bekövetkező esetleges változásokra azonban a szekvenálás (pl.: újgenerációs szekvenálás – NGS) vagy Droplet Digital PCR (ddPCR) vizsgálatok eredményei is felhívhatják a figyelmet. Az amplifikációval összefüggésben a fokozott Rictor fehérjeexpressziót IHC és ICC módszerekkel is értékelhetjük. Az mTOR-komplexek mennyiségi összehasonlítása a specifikus vázfehérjék (Raptor az mTORC1 és Rictor az mTORC2 esetében) arányából is meghatározható.

Összefoglalva, az elmúlt évtizedekben számos PI3K/Akt/mTOR-gátló hatásosságát vizsgálták különböző daganatokban, azonban a klinikai vizsgálatok eredményei gyakran elmaradtak a várttól. A jövőbeni terápiák hatékonyságának javítása érdekében elengedhetetlen a terápiás döntéshozatalt segítő prediktív markerek azonosítása és a betegek markeralapú szelekciója a vizsgálatokba történő beválasztás során.

2. Célkitűzések

A mTOR-útvonal szabályozási zavarai, köztük a *RICTOR*-amplifikáció, számos humán daganattípusban megfigyelhetők, különösen a tüdődaganatok esetében. Az mTOR-gátlók klinikai felhasználásának elősegítéséhez fontos az mTOR-aktivitás jellemzése és további lehetséges prediktív markerek azonosítása. Ezeknek megfelelően vizsgálataink céljai a következők voltak:

1. A *RICTOR*-amplifikáció előfordulásának vizsgálata különböző daganatokban.
 - a. TSO500 NGS-sel kimutatott *RICTOR* kópiaszám-változások háttérben álló feltételezett amplifikáció validálása és fehérjeszintű vizsgálata.
 - b. *RICTOR*-kópiaszám és mTOR-aktivitás változásának vizsgálata párosított mintákban az SCLC progressziója során.
2. Az mTOR-aktivitás, a molekuláris szubtypus markerek összefüggéseinek vizsgálata primer és agyi metasztatikus SCLC-kben.
3. Humán SCLC-sejtvonalakban az mTOR-aktivitás, valamint a *RICTOR*-amplifikáció szerepének kísérletes vizsgálata.
 - a. PI3K/Akt/mTOR-gátlók *in vitro* proliferációgátló hatásainak vizsgálata a

RICTOR-amplifikáció és más az mTOR-jelátvitelt érintő genetikai eltérésekkel összefüggésben.

- b. *In vivo* humán SCLC xenograft tumorok mTOR-aktivitásának, illetve *RICTOR*-kópiaszám változásának vizsgálata kemoterápiás kezelés és tumorevolúció modellezése során.

3. Módszerek

Vizsgált betegcsoportok

Retrospektív vizsgálatainkban két betegcsoportot vizsgáltunk. Az első betegcsoport (NGS-kohorsz) 420 esetet tartalmazott, amelyek 2018 és 2022 között érkeztek intézetünkbe (Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest, Magyarország), 500 génes rutin diagnosztikai NGS-vizsgálatok elvégzése céljából. A második betegcsoport (SCLC-kohorsz) primer (N=50), agyi metasztatikus (N=50), valamint ugyanazon SCLC-s betegek párosított mintáit (N=14×2) tartalmazta.

Újgenerációs szekvenálás (NGS) és bioinformatikai elemzés

Az NGS-kohorsz esetein az Illumina TruSight Oncology 500 High Throughput assay-vel (TSO500) szekvenálást végeztünk a gyártó utasításai szerint. További vizsgálatainkhoz és a *RICTOR*-amplifikáció validálásához azokat az eseteket választottuk ki, amelyekben a normalizált *RICTOR* CNV-érték 3 vagy annál nagyobb volt.

RICTOR-amplifikáció vizsgálata fluoreszcens in situ hibridizációval (FISH)

Az NGS-kohorsz $3 \leq \text{RICTOR CNV}$ eseteinek (N=37), az SCLC-kohorsz párosított mintáinak, a humán

SCLC-sejtvonalakból készült sejtblokkok és xenograft szövetblokkok 2-3 μm vastag formalin-fixált és paraffinba ágyazott (FFPE) metszetein végeztük a „gold standard” validációs módszernek számító FISH-reakciókat. Az értékelés során a sejttagonkénti jelszámok átlagát és a *RICTOR/Chr5* vagy a *RICTOR/5q31.1* arányt határoztuk meg. Azokat az eseteket, ahol az arány 2 vagy annál nagyobb volt *RICTOR*-amplifikálnak tekintettük, míg azokat az eseteket, ahol az arány 2-nél kisebb, azonban a *RICTOR*-kópiaszám 4 vagy annál nagyobb volt bizonytalan esetként regisztráltuk.

RICTOR-kópiaszám-változás vizsgálata Droplet Digital PCR-rel (ddPCR)

Az NGS-kohorsz $3 \leq \text{RICTOR CNV}$ eseteiben a *RICTOR*-kópiaszám változásának vizsgálatát ddPCR-rel is elvégeztük. A humán SCLC-sejtvonalak *RICTOR*-kópiaszámának meghatározásához is ddPCR-t alkalmaztunk. A PCR-reakcióhoz a *RICTOR* FAM és az *AP3B1* HEX próbákat használtuk. A kapott eredményeket az FFPE-minták tumorarányával normalizáltuk. Azokat az eseteket, ahol a normalizált *RICTOR/AP3B1*-arány nagyobb mint 2 volt, *RICTOR*-amplifikált eseteknek definiáltuk.

Az mTOR- és molekuláris szubtypus markerek immunhisztokémiai vizsgálata

Az IHC-festéseket a FFPE-szövetminták 2-3 μm vastagságú metszetein készítettük. Az mTOR- (p-mTOR, p-S6, Rictor, p-Akt) és a molekuláris szubtypus markerek (ASCL1, NeuroD1, POU2F3, YAP1) IHC-festéseinek szemikvantitatív értékeléséhez a „*histochemical scoring*” (H-score) módszert használtuk. A cut-off értékeket a H-score értékek alapján állapítottuk meg vizsgálatonként külön-külön.

Az mTOR-markerek vizsgálata WesTM Simple módszerrel

A humán SCLC-sejtvonalak fehérjeexpressziós elemzéséhez kapilláris alapú WesTM Simple technikát alkalmaztunk. Az mTOR-aktivitás vizsgálatához a következő fehérjéket alkalmaztuk: mTOR, p-mTOR, S6, p-S6, Akt, p-Akt, Rictor.

Sejt- és szövettenyésztés

Az *in vitro* vizsgálatainkhoz 8 humán SCLC-sejtvonalat választottunk ki: DMS 53, DMS 153, H146, H196, H446, H841, H1048 és SHP-77. Az adherens és a szuszpenziós, illetve a kevert adhézios és szuszpenziós fázissal is rendelkező sejteket az adott sejtvonal proliferációs tulajdonságának függvényében 4-6 naponta passzáltuk.

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

Az *in vitro* kezelések során a következő kezelőszereket alkalmaztuk mono- és kombinációs terápiában: cisplatin (kemoterápiás szer), rapamycin (allosztérikus mTOR-gátló), PP242 (kettős mTORC1- és mTORC2-gátló), vistusertib (kettős mTORC1- és mTORC2-gátló), dactolisib (duál PI3K-, mTOR-kináz-gátló) és ipatasertib (Akt-gátló). A kombinációs kezelések hatásainak kvantitatív értékelésére a kombinációs index számítási módszert alkalmaztuk.

In vitro proliferációs tesztek

A kezelések rövidtávú (72 óra) proliferációgátló hatásainak vizsgálatához alamarBlueTM és sulforhodamine B tesztet használtunk. Mindkét proliferációs tesztet 3 független kísérlet 6 párhuzamos mintájának értékelésével végeztük, az eredményeket a kezeletlen kontroll sejtek %-ában adtuk meg.

Xenograft vizsgálatok és in vivo kezelések

Az *in vivo* xenograft kezelésekhez a H146 sejtet injektáltunk *subcutan* hím immunhiányos (SCID) egerek háti régiójába. Az egereket két csoportba osztottuk és az NCCN irányelveinek megfelelő kezelési protokollt alkalmaztuk: (1) kontroll sóoldat; (2) cisplatin és etoposide. Az egereket a 30. napon termináltuk. Ezzel párhuzamosan SCID egereken végeztünk el egy további xenograft kísérletet, amely során a tumorokat rendszeresen új állatokba ültettük át, közel 9 hónapon keresztül. A kísérletek végétével a terminált állatok tumorainak tömegét megmértük és az eltávolított tumorokat formalinban fixáltuk és paraffinba ágyaztuk további vizsgálatokhoz.

Statisztikai analízis

A parametrikus adatok esetében két csoport összehasonlítására kétmintás t-próbát, egyirányú ANOVA-t és Tukey-tesztet, míg a nem parametrikus adatok elemzésére a Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztuk. A kategorikus változók összehasonlítására a Khi-négyzet próbát és a Fisher-féle egzakt tesztet alkalmaztuk. A korreláció számításához a Spearman-féle rangkorrelációt, túlélési adatok elemzéshez a Kaplan-Meier-módszert használtunk, a túlélési görbét pedig a log-rank teszttel hasonlítottuk össze. A $P < 0,05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4. Eredmények

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

Az NGS-vizsgálatok eredményei alapján 420 esetből 37-ben (8,8%) feltételeztük a *RICTOR*-amplifikáció jelenlétét ($3 \leq \text{RICTOR CNV}$), és ezeket az eseteket választottuk ki további vizsgálatokhoz. A

feltételezett *RICTOR*-amplifikációt a „gold standard” validációs módszernek számító FISH-vizsgálattal validáltuk, és párhuzamosan a *RICTOR*-kópiaszám változását ddPCR-rel is vizsgáltuk. *RICTOR*-amplifikációt 16 esetben (16/37) validáltuk FISH-sel és 11 esetben (11/37) mutattuk ki ddPCR-rel. A Rictor- és a p-Akt-expresszió értékelésére IHC-festéseket végeztünk. Ehhez két különböző cégtől (Bethyl és Cell Signaling) származó Rictor antitestet is alkalmaztunk. Magas Rictor-expressziót 14 (14/37) esetben mutattunk ki a Bethyl és 12 esetben (12/37) a Cell Signaling antitesttel. Magas p-Akt-expressziót 7 esetben (7/37) mutattunk ki. Összehasonlítva a *RICTOR* amplifikációs és az ezzel összefüggő fehérjeexpressziós vizsgálatok eredményeit az NGS *RICTOR* CNV-adatokkal megállapítottuk, hogy:

- az NGS-eredmények alapján az $5 \leq \text{RICTOR CNV}$ -ének van a legjobb prediktív értéke a *RICTOR*-amplifikáció jelzésében (4/5);
- további 5 olyan esetben is validáltuk a *RICTOR*-amplifikációt FISH-sel, ahol NGS *RICTOR* CNV-érték 4 vagy annál nagyobb volt (9/12);
- meglepő módon, az alacsonyabb NGS CNV-csoportba (3,00-3,99; 25/37) tartozó esetek között is sikerült FISH-sel validálni (7/25);
- a ddPCR csak 11 *RICTOR*-amplifikált esetet erősített meg a 16 FISH-validált eset közül. A FISH-validált *RICTOR*-amplifikációs státusszal összehasonlítva mindhárom IHC-festés kombinált értékelése 81%-os (13/16) specificitást és 67%-os (14/21) szenzitivitást mutatott a vizsgált 37 esetben. A *RICTOR*-amplifikációt 6 fő daganattípusban, 14 diagnózisban tudtuk validálni. Több diagnózis esetében (N=10) is először mutattuk ki a FISH-validált *RICTOR*-amplifikációt. Ezek közül az mTOR/Rictor *in situ* expresszióját és genetikai eltéréseit (pl.: amplifikáció) korábban nem vizsgálták

hasnyálmirigy neuroendokrin tumorokban és endometrialis carcinosarcomákban.

A párosított SCLC-s beteganyagok *RICTOR*-amplifikációs státuszát és *RICTOR*-kópiaszámának változását FISH-sel vizsgáltuk. A 14 mintapárból 12-ben nőtt a *RICTOR*-kópiaszám a két mintavétel között eltelt idő során. A kezdeti minták közül 2 *RICTOR*-amplifikált, 1 pedig bizonytalan értékelésű volt. A második mintavételből származó minták esetében 2, már korábban is *RICTOR*-amplifikált minta megtartotta az amplifikációját, 3 pedig újonnan bizonyult *RICTOR*-amplifikáltnak és 1 minta újonnan bizonytalan eredményt mutatott. A *RICTOR*-amplifikált párosított minták 80%-ában (4/5) nőtt a Rictor-expresszió a két mintavételi időpont között.

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

A primer és agyi metasztatikus SCLC-kben az mTORC1 (p-mTOR, pS6), az mTORC2 (Rictor, p-Akt) és a molekuláris szubtípus markerek (ASCL1, NeuroD1, POU2F3, YAP1) *in situ* expresszióját IHC-vel vizsgáltuk.

A p-S6- és a Rictor-expresszió szignifikánsan magasabb volt az agyi metasztatikus tumorokban ($P < 0,05$ a p-S6 és $P < 0,01$ a Rictor esetében). A magas Rictor-expresszió rövidebb teljes túléléssel társult az agyi metasztázisokkal rendelkező betegek esetében ($P = 0,008$). Az mTORC2-aktivitás vizsgálatához az mTORC2-markerek H-score értéke alapján két csoportot alakítottunk ki: a.) nincs mTORC2-aktivitás (alacsony Rictor- és/vagy p-Akt-expresszió), b.) van mTORC2-aktivitás (magas Rictor- és/vagy p-Akt-expresszió). Az agyi metasztatikus esetek 40%-ában az mTORC2-aktivitás jelenléte volt igazolható, ami szignifikáns

összefüggést mutatott a rövidebb teljes túléléssel ($P=0,036$).

Az ASCL1-expresszió esetében nem találtunk szignifikáns különbséget, azonban a NeuroD1- és a YAP1-expresszió szignifikánsan magasabb volt ($P<0,05$ a NeuroD1 és $P<0,01$ a YAP1 esetében), míg a POU2F3-expresszió szignifikánsan alacsonyabb volt az agyi metasztatikusokban a primer tumorokhoz képest ($P<0,05$). A túlélési adatok tekintetében a szubtypus markerek expressziója nem korrelált a primer esetek klinikai kimenetelével. Ezzel szemben a magas ASCL1-expresszió rövidebb teljes túléléssel járt együtt agyi áttéteknél ($P=0,012$).

A molekuláris szubtypus és az mTOR-markerek összefüggéseinek vizsgálatakor a POU2F3-expresszió szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a p-mTOR- ($R=0,443$; $P=0,001$) és a Rictor-expresszióval ($R=0,418$; $P=0,003$) a primer tumorokban. A POU2F3-domináns esetek alacsonyabb száma ellenére, az agyi metasztatikusokban is hasonló eredményeket kaptunk; a POU2F3-expresszió szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a p-mTOR- ($R=0,547$; $P<0,001$), a p-S6- ($R=0,490$; $P<0,001$) és a p-Akt-expresszióval ($R=0,292$; $P=0,040$). Végezetül mind a primer, mind pedig az agyi metasztatikus POU2F3-domináns esetekben jellemző volt az mTOR-markerek magas expressziója.

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

A vizsgált 8 humán SCLC-sejtvonal eredete, morfológiája, növekedési jellemzői és mutációs profilja mind különböző volt. Mindegyik sejtvonal hordozott legalább egy, az mTOR-útvonalhoz kapcsolódó mutációt. A vizsgált sejtvonalakban a RICTOR-amplifikációt

ddPCR- és FISH-módszerekkel vizsgáltuk. *RICTOR*-amplifikációt mutattunk ki ddPCR-rel, a H196, a H446, valamint az SHP-77 sejtvonalakban. Továbbá FISH-sel validáltuk a már korábban leírt *RICTOR*-amplifikációt a H196 sejtvonalban, és elsőként igazoltunk validált *RICTOR*-amplifikációt a H446 sejtvonalban.

Az IHC és WesTM Simple vizsgálatainkban eltérő mTOR-aktivitást mutattunk ki a különböző sejtvonalakban. A legmagasabb mTOR-aktivitást a *RICTOR*-amplifikált H196 sejtvonalban detektáltunk, amelyben a legmagasabb p-Akt/Akt arányt és Rictor-expressziót is találtuk. A másik, *RICTOR*-amplifikált H446 sejtvonalban szintén magas mTORC2-aktivitást (magasabb p-Akt/Akt arány) és mérsékelt magas Rictor-expressziót mutattunk ki. Magas mTOR-aktivitást, p-Akt/Akt arányt és Rictor-expressziót figyeltünk meg a H1048 sejtvonalban, amely az adatbázisadatok alapján *PIK3CA*-mutáns és *AKT3*-amplifikált. A DMS 53, DMS 153, H146 és SHP-77 sejtvonalak magas mTORC1-aktivitást mutattak, amely magas S6K-aktivitással (magas p-S6/S6 arány) és csökkent mTORC2-aktivitással (alacsony p-Akt/Akt arány és Rictor-expresszió) társult. Érdekes módon, a H841 sejtvonalban kiegyensúlyozottabb mTORC1/mTORC2-aktivitás (magas p-S6/S6, p-Akt/Akt arány és Rictor-expresszió) volt megfigyelhető.

Összehasonlítottuk a vizsgált sejtvonalak cisplatin, rapamycin, PP242, vistusertib, dactolisib és ipatasertib elleni érzékenységét. Az mTOR-gátlók összesített hatásainak értékelése során a 8 sejtvonalból 3 nagy érzékenységet (H146, H446, H1048), 2 sejtvonal mérsékelt érzékenységet (H196, H841), 2 sejtvonal alacsony érzékenységet (DMS 53, DMS 153) mutatott, 1 sejtvonal pedig nem volt érzékeny (SHP-77) a vizsgált

mTOR-gátlókkal szemben. Az Akt-gátló ipatasertib bizonyult a legkevésbé hatékonynak, mivel szinte az egyik vizsgált sejtvonal esetében sem mutatott jelentős proliferációgátló hatást.

Egyetlen kivételtől (DMS 153) eltekintve mindegyik sejtvonal cisplatin rezisztensnek bizonyult. Azonban a vistusertib kezelés fokozta a cisplatin proliferációgátló hatását a legtöbb sejtvonal esetében (DMS 53, H196, H446, H1048, SHP-77), szinergista hatást eredményezve.

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

Az előbbiekkal párhuzamosan, hosszútávon *in vivo* fenntartott xenograft kísérletek során a kezeletlen tumorok Rictor-expressziója és *RICTOR*-kópiaszáma folyamatosan emelkedett (2,9-ről 3,6-ra), ami igazolja a Rictor/mTORC2-aktivitás jelentős szerepét az SCLC progressziójában.

5. Következtetések

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

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

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

- az mTOR-útvonal hiperaktivitása mind a primer, mind az agyi metasztatikus SCLC-kben jellemző;
- az agyi metasztázisok 40%-ban mTORC2-aktivitás igazolható;
- a magas Rictor-expresszió szignifikánsan összefüggött a rosszabb teljes túléléssel az agyi metasztázisokkal rendelkező betegekben;
- az ASCL1-, a NeuroD1-domináns esetek voltak a leggyakoribbak mind a primer, mind az agyi metasztatikus SCLC-kben;
- a POU2F3-domináns SCLC-eket mTOR-hiperaktivitás jellemzi.

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

- Rictor/mTORC2-aktivitásnak jelentős szerepe van az SCLC progressziójában;
- a vistusertib *in vitro* fokozza a ciszplatin proliferációgátló hatását kombinációs terápia alkalmazása során a vizsgált SCLC-sejtvonalak többségében;
- a kemoterápiás kezelés hatására *in vivo* szignifikánsan nő a p-Akt-expresszió és jelentős marad a Rictor-expresszió, ami a kemoterápiás kezelés mellett kialakuló mTORC2-irányú aktivitás eltolódást jelez;
- a tumorevolúció modellezése közben, kezeletlen xenograft kísérletekben is a *RICTOR*-kópiaszám és a Rictor-expresszió folyamatos emelkedése igazolható.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció alapját képező saját közlemények:

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

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

3) Szalai F*, **Sztankovics D***, Krencz I, Moldvai D, Pápay J, Sebestyén A, Khoor A. Rictor-A Mediator of

Progression and Metastasis in Lung Cancer. *Cancers* (Basel). 2024;16(3):543. (* megosztott első szerzős közlemény) **IF: 4,5**

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

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

A disszertációtól független saját közlemények:

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

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

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

4) Dankó T, Petővári G, **Sztankovics D**, Moldvai D, Raffay R, Lőrincz P, Visnovitz T, Zsiros V, Barna G, Márk Á, Krencz I, Sebestyén A. Rapamycin Plus Doxycycline Combination Affects Growth Arrest and

- Selective Autophagy-Dependent Cell Death in Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2021;22(15):8019. **IF: 6,208**
- 5) Sebestyén A, Dankó T, **Sztankovics D**, Moldvai D, Raffay R, Cervi C, Krencz I, Zsiros V, Jeney A, Petővári G. The role of metabolic ecosystem in cancer progression - metabolic plasticity and mTOR hyperactivity in tumor tissues. *Cancer Metastasis Rev.* 2021;40(4):989-1033. **IF: 9,237**
- 6) Moldvai D, Raffay R, Petővári G, Dankó T, **Sztankovics D**, Krencz I, Vetlényi E, Sebestyén A. 3D bionyomtatott szöveti és tumormodellek a daganatkutatásban. *Gyógyszerészet.* 2022;66(6):295-302.
- 7) Sebestyén A, Dankó T, **Sztankovics D**, Moldvai D, Krencz I, Raffay R, Petővári G. Extracellular Matrix as a Metabolic Niche in Cancer. In: Kovalszky, I., Franchi, M., Alaniz, L.D. (eds) *The Extracellular Matrix and the Tumor Microenvironment. Biology of Extracellular Matrix.* 2022; vol 11. Springer, Cham.
- 8) Dankó T, Petővári G, Raffay R, **Sztankovics D**, Moldvai D, Vetlényi E, Krencz I, Rókusz A, Sipos K, Visnovitz T, Pápay J, Sebestyén A. Characterisation of 3D Bioprinted Human Breast Cancer Model for In Vitro Drug and Metabolic Targeting. *Int J Mol Sci.* 2022;23(13):7444. **IF: 5,6**
- 9) Krencz I, Vetlényi E, Dankó T, Petővári G, Moldvai D, **Sztankovics D**, Raffay R, Mészáros K, Sebestyén E, Végső G, Pápay J, Sebestyén A. Metabolic Adaptation as Potential Target in Papillary Renal Cell Carcinomas Based on Their In Situ Metabolic Characteristics. *Int J Mol Sci.* 2022;23(18):10587. **IF: 5,6**
- 10) **Sztankovics D***, Moldvai D*, Petővári G, Gelencsér R, Krencz I, Raffay R, Dankó T, Sebestyén A. 3D bioprinting and the revolution in experimental cancer model systems-A review of developing new models and

experiences with in vitro 3D bioprinted breast cancer tissue-mimetic structures. *Pathol Oncol Res.* 2023;29:1610996. (* megosztott első szerzős közlemény)

IF: 2,3

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

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

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

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

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