

**SEMMELWEIS EGYETEM**  
**DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**2403.**

**KRENCZ ILDIKÓ**

**Onkológia**  
című program

Programvezető: Dr. Kopper László, professor emeritus  
Témavezető: Dr. Pápay Judit, egyetemi docens  
Konzulens: Dr. Sebestyén Anna, tudományos főmunkatárs

# Az mTOR-jelátvitelt és tumormetabolizmust érintő eltérések mint célzott terápiás lehetőségek tüdődaganatokban

Doktori értekezés

**Dr. Krencz Ildikó**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Pápay Judit, Ph.D., egyetemi docens

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

Hivatalos bírálók: Dr. Gálffy Gabriella, Ph.D., osztályvezető főorvos

Dr. Patonai Attila, Ph.D., klinikai szakorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Buzás Edit Irén, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Bohács Anikó, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest  
2020

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>6</b>
<b>1. BEVEZETÉS .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1. A tüdődaganatok epidemiológiája.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2. A tüdődaganatok szövettani osztályozása.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3. Tüdő adenocarcinomák.....</b>	<b>14</b>
1.3.1. A tüdő adenocarcinomák patológiája.....	14
1.3.2. A tüdő adenocarcinomák hagyományos terápiája.....	15
1.3.3. Molekuláris eltérések és célzott terápiás lehetőségek tüdő adenocarcinomákban.....	17
1.3.4. A tüdő adenocarcinomák immunterápiája.....	20
<b>1.4. Kissejtes tüdődaganatok.....</b>	<b>21</b>
1.4.1. A kissejtes tüdődaganatok patológiája .....	21
1.4.2. A kissejtes tüdődaganatok hagyományos terápiája.....	22
1.4.3. Célzott terápia és immunterápia kissejtes tüdődaganatokban .....	23
<b>1.5. Lymphangioleiomyomatosis .....</b>	<b>26</b>
1.5.1. A lymphangioleiomyomatosis patológiája.....	26
1.5.2. A lymphangioleiomyomatosis molekuláris háttere.....	28
1.5.3. A lymphangioleiomyomatosis terápiája.....	29
<b>1.6. Az mTOR jelátviteli útvonal.....</b>	<b>30</b>
1.6.1. Az mTOR-kináz .....	31
1.6.2. mTORC1 .....	31
1.6.3. mTORC2 .....	32
1.6.4. Az mTOR-jelátvitel szabályozása .....	33
1.6.5. Az mTOR-jelút által szabályozott metabolikus folyamatok .....	37
<b>1.7. A PI3K/Akt/mTOR jelátvitel zavarai tüdődaganatokban .....</b>	<b>40</b>
1.7.1. Az mTOR-jelút szabályozási zavarai nem-kissejtes tüdődaganatokban .....	40
1.7.2. Az mTOR-jelút szabályozási zavarai a tüdő neuroendokrin tumoraiban .....	41
1.7.3. Az mTOR-jelút szabályozási zavarai lymphangioleiomyomatosisban.....	42
<b>1.8. Fejlesztés alatt álló mTOR-gátlók a tüdődaganatok kezelésében .....</b>	<b>43</b>
1.8.1. mTORC1-gátlók.....	43
1.8.2. mTORC1/2-gátlók.....	44

1.8.3. Az mTOR jelátviteli útvonal egyéb inhibitorai.....	46
1.8.4. A biomarker-alapú betegszelekció jelentősége a tüdődaganatok mTOR-gátló terápiájában .....	47
<b>2. CÉLKITŰZÉSEK .....</b>	<b>49</b>
<b>3. MÓDSZEREK .....</b>	<b>50</b>
<b>3.1. Vizsgált betegek.....</b>	<b>50</b>
3.1.1. Adenocarcinoma (ADC) kohorsz.....	50
3.1.2. Kissejtes tüdőrák (SCLC) kohorsz.....	50
3.1.3. Lymphangiopleiomomatosis (LAM) kohorsz.....	51
<b>3.2. Szöveti multiblokkok készítése az adenocarcinoma mintákból.....</b>	<b>52</b>
<b>3.3. Az mTOR- és metabolikus markerek immunhisztokémiai vizsgálata.....</b>	<b>52</b>
3.3.1. Az ADC minták immunhisztokémiai értékelése .....	53
3.3.2. Az SCLC minták immunhisztokémiai értékelése .....	54
3.3.3. A LAM minták immunhisztokémiai értékelése .....	55
<b>3.4. RICTOR-amplifikáció vizsgálata fluoreszcens in situ hibridizációval .....</b>	<b>55</b>
<b>3.5. In vitro vizsgálatok .....</b>	<b>56</b>
3.5.1. Sejtvonalak, sejt- és szövettenyésztés .....	56
3.5.2. Sejtblokkok készítése az SCLC sejtvonalakból .....	58
3.5.3. Az mTOR-jelátvitel inhibitorok SCLC sejtvonalak proliferációját érintő hatásainak vizsgálata Alamar Blue teszttel .....	58
<b>3.6. Statisztikai analízis .....</b>	<b>59</b>
<b>4. EREDMÉNYEK .....</b>	<b>60</b>
<b>4.1. Az mTORC1/2 komplexek mennyiségével és aktivitásával összefüggő fehérjék expressziója primer és áttéti tüdő adenocarcinomákban.....</b>	<b>60</b>
4.1.1. A p-mTOR, a p-S6 és a Rictor expressziója a peritumorális tüdőszövetben, a primer tüdő adenocarcinomákban és az agyi áttétekben .....	61
4.1.2. A p-mTOR, a p-S6 és a Rictor expressziójának összefüggése a klinikopatológiai adatokkal.....	63
4.1.3. A p-mTOR, a p-S6 és a Rictor expressziója a primer tumor-agyi áttét mintapárokban.....	63
<b>4.2. A RICTOR-amplifikáció és az mTORC2-aktivitás jelentőségének vizsgálata kissejtes tüdődaganatokban .....</b>	<b>66</b>

4.2.1. A <i>RICTOR</i> -amplifikáció gyakorisága kissejtes tüdődaganatokban .....	66
4.2.2. A Rictor és a p(Ser473)-Akt expressziója kissejtes tüdődaganatokban.....	67
4.2.3. Korreláció a <i>RICTOR</i> FISH, valamint a Rictor és p(Ser473)-Akt IHC eredmények között .....	67
4.2.4. Összefüggések a klinikopatológiai adatok és a <i>RICTOR</i> -amplifikáció, valamint a Rictor- és p(Ser473)-Akt-expresszió között.....	69
4.2.5. A <i>RICTOR</i> -amplifikáció, valamint a Rictor- és p(Ser473)-Akt-expresszió összefüggései a túléléssel .....	69
<b>4.3. <i>In vitro</i> vizsgálatok az PI3K/Akt/mTOR jelátviteli út inhibitoraival SCLC sejtvonalakban .....</b>	<b>71</b>
4.3.1. A <i>RICTOR</i> -amplifikáció vizsgálata az SCLC sejtvonalakban.....	71
4.3.2. Az mTOR jelátviteli út inhibitorainak hatása az SCLC sejtvonalak proliferációjára .....	71
<b>4.4. Az mTOR-jelátvitelhez és metabolikus folyamatokhoz kapcsolható fehérjék expressziója lymphangioleiomyomatosisban.....</b>	<b>73</b>
4.4.1. LAM-markerek és hormonreceptorok expressziója a LAM mintákban .....	75
4.4.2. Az mTORC1/2 komplexek mennyiségével és aktivitásával összefüggő fehérjék expressziója LAM-ban .....	75
4.4.3. A metabolikus folyamatokhoz kapcsolható transzporterek és enzimek expressziója LAM-ban .....	76
4.4.4. Korreláció az mTOR-jelátvitelhez kapcsolható fehérjék és a metabolikus markerek között.....	79
4.4.5. Az mTOR- és metabolikus markerek expressziójának összefüggései a klinikopatológiai adatokkal.....	79
<b>5. MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>80</b>
<b>5.1. Az mTORC1/2-aktivitás jelentősége primer adenocarcinomákban és agyi metasztázisaikban .....</b>	<b>80</b>
<b>5.2. A <i>RICTOR</i>-amplifikáció és az mTORC2-aktivitás mint terápiás target kissejtes tüdődaganatokban .....</b>	<b>82</b>
<b>5.3. Az mTOR-komplexek és az anyagcsere-folyamatok összefüggései lymphangioleiomyomatosisban.....</b>	<b>86</b>
<b>6. KÖVETKEZTETÉSEK.....</b>	<b>90</b>

<b>7. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>92</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>93</b>
<b>9. IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>94</b>
<b>10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....</b>	<b>134</b>
<b>11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>136</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

- 4E-BP1 – eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E-kötő fehérje 1
- ACSS2 – acyl-coenzyme A synthetase short-chain family member 2
- ADC – adenocarcinoma
- Akt – protein-kináz B
- ALK – anaplasztikus lymphoma-kináz
- AMPK – adenzin-monofoszfát-aktivált protein-kináz
- ATCC – American Type Culture Collection
- ATP – adenzin-trifoszfát
- ATPB –  $\beta$ -F1-ATP-áz
- ATS – American Thoracic Society
- BAD – Bcl-2-asszociált sejthalál agonista
- Bcl-2 – B-sejtes lymphoma protein 2
- BRAF – v-raf rágszáló sarcoma vírus onkogén homológ B1
- BSM – bronchiális simaizomsejt
- CAIX – szénsav-anhidráz 9
- CPT1A – karnitin-palmitoil-transzferáz 1A
- CT – komputertomográfia
- CTLA4 – citotoxikus T-lymphocita asszociált fehérje 4
- DEPTOR – DEP-domain containing mTOR-interacting protein
- DLL3 – delta-like ligand 3
- DNS – dezoxiribonukleinsav
- ECOG – Eastern Cooperative Oncology Group
- EDTA – etiléndiamin-tertraecetsav
- EGFR – epidermális növekedési faktor receptor
- EMA – Európai Gyógyszerügynökség
- ER $\alpha$  – ösztrogén-receptor  $\alpha$
- ERK – extracelluláris szignál-regulált kináz
- ERS – European Respiratory Society
- FASN – zsírsav-szintáz
- FDA – Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal (Amerikai Egyesült Államok)
- FDG – <sup>18</sup>F-fluorodezoxiglükóz

FISH – fluoreszcens in situ hibridizáció  
FKBP12 – FK506-kötő fehérje 12  
FoxO – forkhead box O  
GAPDH – glicerin-aldehid-3-foszfát dehidrogenáz  
GLS – glutamináz  
GSK3 – glikogén-szintáz-kináz 3  
GluT1 – glükóz-transzporter 1  
GTP-áz – guanidin-trifoszfátáz  
H&E – hematoxilin-eozin  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – hidrogén-peroxid  
HIF1 $\alpha$  – hypoxia-indukált faktor  $\alpha$   
HMB-45 – homatropin-metilbromid-45  
IASLC – International Association for the Study of Lung Cancer  
IHC – immunhisztokémia  
KoA – koenzim A  
KRAS – Kirsten patkány sarcoma vírus onkogén homológ  
LAM – lymphangioleiomyomatosis  
LDH – laktát-dehidrogenáz  
Lkb1 – liver kinase B1  
MCT1 – monokarboxilát-transzporter 1  
MEK – mitogén-aktivált protein kináz kináz  
MET – hepatocytá növekedési faktor receptor  
MILES – Multicenter International LAM Efficacy of Sirolimus  
mLST8 – mammalian lethal with SEC13 protein 8  
mTOR – mammalian target of rapamycin  
mTORC1 – mTOR komplex 1  
mTORC2 – mTOR komplex 2  
NAD<sup>+</sup> – oxidált nikotinamid-adenin-dinukleotid  
NF1 – neurofibromin 1  
NSCLC – nem-kissejtes tüdőcarcinoma  
p-Akt – foszforilált protein-kináz B  
PARP – poli(ADP-ribóz) polimeráz



PD-1 – programozott sejthalál fehérje 1  
PD-L1 – programozott sejthalál ligandum 1  
PEComa – perivascularis epithelioid sejt tumor  
p-eIF-4E – foszforilált eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E  
PET – pozitronemissziós tomográfia  
PDK1 – foszfoinozitol-dependens kináz 1  
PI3K – foszfatidilinozitol 3-kináz  
PIK3CA – foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát-3-kináz katalitikus alegység  $\alpha$   
PIP<sub>2</sub> – foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát  
PIP<sub>3</sub> – foszfatidilinozitol-3,4,5-trifoszfát  
PKC – protein-kináz C  
p-mTOR – foszforilált mTOR-kináz  
PR – progeszteron-receptor  
PRAS40 – proline-rich Akt substrate of 40 kDa  
p-S6 – foszforilált riboszomális S6 fehérje  
p-S6K – foszforilált riboszomális protein S6 kináz  
PTEN – foszfatáz és tenzin homológ  
Raptor – regulatory-associated protein of mTOR  
RAS – patkány sarcoma vírus onkogén homológ  
RB1 – retinoblastoma 1  
Rheb – Ras homolog enriched in brain  
RICTOR – rapamycin-insensitive companion of mTOR  
ROS1 – ROS protoonkogén 1, receptor tirozin-kináz  
S6K1 – riboszomális protein S6 kináz 1  
SABR – sztereotaxiás ablatív sugárkezelés  
SCLC – kissejtes tüdőrák  
SGK1 – szérum- és glükokortikoid-regulált kináz 1  
S-LAM – sporadikus lymphangioliomyomatosis  
SLFN-11 – Schlafen family member 11  
SMA –  $\alpha$  simaizom aktin  
SREBP – szterolreguláló elemeket kötő fehérje  
STK11 – szerin/treonin kináz 11

TCGA – The Cancer Genome Atlas

TKI – tirozin-kináz inhibitor

TMA – szöveti multiblokk

TMB – tumor mutációs terhelés

TNM – tumor, nyirokcsomó, metasztázis

TSC1 – tuberous sclerosis protein 1/hamartin

TSC2 – tuberous sclerosis protein 2/tuberin

TSC-LAM – sclerosis tuberosához társuló lymphangioleiomyomatosis

VEGF A – vaszkuláris növekedési faktor A

VEGF D – vaszkuláris növekedési faktor D

WHO – World Health Organization

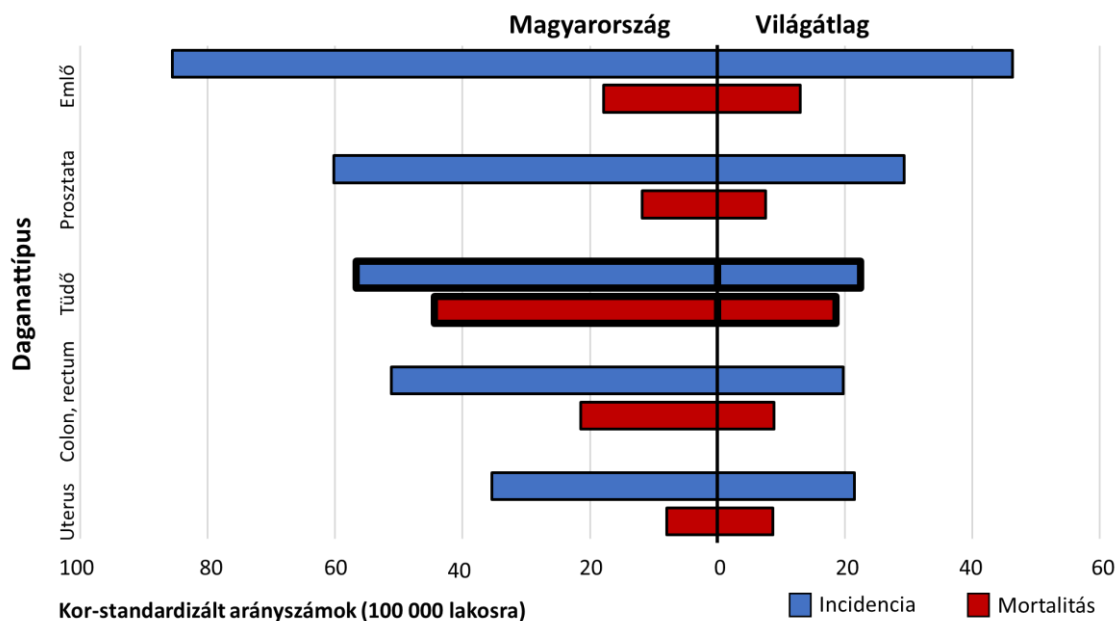
## 1. BEVEZETÉS

### 1.1. A tüdődaganatok epidemiológiája

A tüdőrák napjainkban vezető daganatos halálok, holott a XX. század elején még ritka megbetegedésnek számított [1]. Mintegy 140 évvel ezelőtt a drezdai Patológiai Intézet 1878. évi adatai alapján a tüdődaganatok a daganatos megbetegedések mindössze 1%-át tették ki, ez az arány azonban az élettartam növekedésével és az új daganatkeltő tényezők – elsősorban a dohányzás – terjedésével gyors növekedésnek indult és a tüdőrák az 1940-es évekre már a második leggyakoribb daganatos halálorkká vált. Az előfordulás és a mortalitási ráta egészen az 1990-es évekig növekedett, majd lassú csökkenésnek indult [2].

A nemzetközi adatokat tekintve a *GLOBOCAN 2018* felmérés adatai alapján világszerte évente 18,1 millió új daganatos beteget regisztrálnak és a daganatos halálozások száma 9,6 millióra tehető. A tüdődaganatok leggyakrabban diagnosztizált daganatként az összes tumor 11,6%-át jelentik, a daganatos halálozás 18,4%-áért felelősek. A különböző országok között azonban lényeges különbségek figyelhetők meg az incidencia és a mortalitás tekintetében, amelyek jelentős részben a szocioökonómiai státusz és az életmódbeli különbségek következményei lehetnek [3].

A tüdődaganatok incidenciájának és mortalitásának földrajzi és országonkénti diverzitását illetően általánosságban elmondható, hogy a tüdőrák gyakorisága a magasabb Humán Fejlettségi Indexű (HDI, Human Development Index) országokban nagyobb [3, 4]. A tüdőrák fokozott előfordulása a magasabb jövedelmű országokban elsősorban a rizikófaktorok (dohányzás, légszennyezés) fokozottabb jelenlétével függhet össze. Kiemelkedő azonban a Közép- és Kelet-Európában (azon belül Magyarországon) megfigyelhető kifejezetten magas incidencia és mortalitás (*1. ábra*), különösképpen a férfiak körében. Ez – figyelembe véve a dohányfüst expozíció és a daganat kialakulása közötti hozzávetőlegesen 30 éves látenciát – a XX. század végén megfigyelt magas dohányzási prevalencia érték (1980-ban 42,7%) következménye lehet [5].



**1. ábra. Kor szerint standardizált incidenciák és halálozási arányszámok.** Magyarországon a leggyakoribb daganattípusok incidenciája és mortalitása magasabb a világátlagnál. Ez a különbség tüdődaganatok esetén különösen kifejezett, hazánk a világszerte között van a tüdőrák incidenciáját és mortalitását illetően. Az ábrán a tüdődaganatokra vonatkozó adatok kiemelésére vastag fekete körvonallal történt. Az ábra a *GLOBOCAN 2018* felmérés adatai alapján készült [3].

A hazai adatok tekintetében az Országos Korányi Pulmonológiai Intézet 2019. évi évkönyvét tekinthetjük irányadónak, amely a 2018. évi epidemiológiai adatokat tartalmazza. Magyarországon 2018-ban az új esetek száma 10 000-re tehető, míg a prevalencia értéke meghaladta a 22 000-et. A mortalitási adatok tekintetében 2017-es adatok érhetők el, ebben az évben 8840 beteg halálát okozta tüdőrák. A hatékony szűrővizsgálatok – amelyre legjobb lehetőségként jelenleg az alacsony dózisos CT vizsgálatot ajánlják – bevezetésének fontosságát kiemeli, hogy a betegek csaknem felében (44,3%) a daganat előrehaladott, IV. stádiumban került felismerésre. A daganatos megbetegedések többsége az idősebb populációban alakult ki, az új tüdőrákos esetek több mint 95%-át az 50 év felettek körében diagnosztizálták. A terápiás modalitások alkalmazásának aránya az utóbbi években nem változott jelentős mértékben, a számos, előrehaladott stádiumban felismert daganat miatt az inoperabilitás aránya közel 75%, a betegek harmadában pedig aktív onkoterápia alkalmazására sem volt lehetőség, csak

tüneti kezelés jöhetett szóba. A szövettani megoszlást tekintve továbbra is megfigyelhető a tendencia, miszerint a nem-kissejtes tüdődaganatok adják a tüdőrákos megbetegedések döntő hányadát, azon belül is kiemelkedő az adenocarcinomák gyakorisága, amelyek a tüdőrákos megbetegedések mintegy felét (49%) jelentik [6].

## 1.2. A tüdődaganatok szövettani osztályozása

A tüdődaganatok szövettani besorolása a 2015-ös WHO klasszifikáció szerint történik. A tüdőben leggyakrabban hám eredetű daganatok jelennek meg, ezek egyszerűsített klasszifikációját az 1. táblázat mutatja be.

### 1. táblázat. A tüdő hám eredetű daganatainak egyszerűsített osztályozása a 2015. évi WHO klasszifikáció alapján [7]

A táblázat csak a malignus és preinvazív léziókat tartalmazza.

A TÜDŐ EPITHELIÁLIS DAGANATAI		
	Invazív daganat	Preinvazív lézió
<b>Adenocarcinoma</b>	Lepidikus adenocarcinoma Acináris adenocarcinoma Papilláris adenocarcinoma Mikropapilláris adenocarcinoma Szolid adenocarcinoma Egyéb adenocarcinoma variánsok (invazív mucinosus, colloid, foetális, entericus) Minimálisan invazív adenocarcinoma	Atípusos adenomatosus hyperplasia Adenocarcinoma in situ
<b>Laphámsejtes carcinoma</b>	Keratinizáló laphámrák Nem keratinizáló laphámrák Bazaloid laphámrák	Laphámsejtes carcinoma in situ
<b>Neuroendokrin daganatok</b>	Kissejtes carcinoma Nagysejtes neuroendokrin carcinoma Carcinoid (típusos, atípusos)	Diffúz idiopathiás pulmonális neuroendokrin sejt hyperplasia
<b>Egyéb típusok</b>	Nagysejtes carcinoma Adenosquamosus carcinoma Sarcomatoid carcinoma	

A malignus epitheliális daganatok leggyakrabban megjelenő altípusai az adenocarcinomák, a laphámrákok, a neuroendokrin daganatok és a nagysejtes carcinomák. A korábbi WHO klasszifikáció (2004) és IASLC/ATS/ERS beosztás (2011) még élesebben elkülönítette a nem-kissejtes tüdődaganatok (adenocarcinoma, laphámrák, nagysejtes carcinoma) és kissejtes tüdődaganatok csoportját, amelynek létjogosultságát és gyakorlati jelentőségét a két csoport kezelésében megjelenő különbségek támasztják alá. Míg a kissejtes tüdődaganatok a diagnózis időpontjában már többnyire áttétet képeznek, így leginkább a kemoterápia alkalmazása jön szóba, addig a nem-kissejtes daganatok esetén gyakrabban van lehetőség sebészi beavatkozásra is. Az új felosztásban a kissejtes carcinoma mellett a nagysejtes neuroendokrin carcinoma és a carcinoidek kerültek a neuroendokrin daganatok csoportjába [7-9].

Az epitheliális eredetű daganatokon kívül, ezeknél jóval ritkábban mesenchymális (hamartoma, chondroma, PEComa stb.), lymphohistiocytás (különböző lymphomák, Langerhans-sejtes histiocytosis, Erdheim-Chester betegség) és ectopiás eredetű tumorok (pl. csírasejtes daganatok, intrapulmonális thymoma), valamint viszonylag magas számban egyéb szervek daganatainak áttétei is megjelenhetnek a tüdőben [7].

A patológiailag igazolt tüdőrák WHO klasszifikációjának meghatározásán túl a stádiumbeosztás – amely jelenleg a TNM-8 rendszer szerint történik – is a diagnosztika szerves részét képezi és meghatározza, hogy milyen terápia alkalmazására van lehetőség [10-12]. A korábbi években a tüdődaganatok diagnosztikája elsősorban a hematoxilin-eozin (H&E) festett metszetek vizsgálatán alapult, az elmúlt évtizedekben azonban az immunhisztokémiai vizsgálatok egyre nagyobb jelentőségre tettek szert az elkülönítő kórismében. A különböző szubtypusok pontosabb meghatározása a célzott terápia szempontjából kiemelten fontos, hasonlóan a különböző genetikai vizsgálatok elvégzéséhez, amelyek jelentősége a személyre szabott terápiás lehetőségek elérhetővé válásával egyre inkább előtérbe kerül [9].

Az egyes szövettani altípusok részletes ismertetése meghaladja a dolgozat terjedelmi korlátait, ezért a továbbiakban csak a vizsgálatok szempontjából kiemelt altípusok – adenocarcinomák, kissejtes tüdődaganatok és lymphangioleiomyomatosis – részletesebb bemutatására kerül sor.

### **1.3. Tüdő adenocarcinómák**

Az adenocarcinoma a tüdőrákok leggyakoribb altípusa, a nem-kissejtes tüődaganatok közé sorolják. A tüődaganatok 50%-a, a nem-kissejtes tüdőrákok 60%-a adenocarcinoma. Klinikai viselkedését, radiológiai és szövettani megjelenését, valamint molekuláris hátterét tekintve meglehetősen heterogén képet mutató betegségről van szó [13].

#### **1.3.1. A tüdő adenocarcinómák patológiája**

A tüdő adenocarcinoma leggyakrabban a tüdőparenchyma perifériás területein alakul ki szabálytalan, szürkésfehér szövetszaporulatként. Gyakran képez áttéteket, távoli metasztázisként leggyakrabban agyi és csontáttétek jelennek meg [14]. A prognózis meglehetősen kedvezőtlen, az 5 éves túlélés csupán 15-20%, amelyhez az is hozzájárulhat, hogy a betegség gyakran előrehaladott stádiumban kerül felismerésre [5, 15]. A daganatsejtek eredete nem teljesen tisztázott, legnagyobb valószínűséggel a perifériás daganatok a Clara-sejtekből vagy a 2-es típusú pneumocytákból, míg a centrálisabban elhelyezkedő tumorok a hörgők mirigyhámjából alakulnak ki [16-18]. Prekurzor lézióként atípusos adenomatosus hyperplasia, majd adenocarcinoma in situ előzheti meg az invazív daganat megjelenését [7].

A szövettani altípusok pontos klasszifikációjának jelentősége az utóbbi években még inkább felértékelődött, ugyanis egyrészt prognosztikus információt hordoz, másrészt segítséget nyújthat a betegek kiválasztásában a különböző molekuláris vizsgálatokra, amelyek sok esetben a célzott terápia alkalmazhatóságának feltételét jelentik. A tüdő adenocarcinómáinak szövettani osztályozása a WHO 2015-ös beosztása szerint történik. A leggyakoribb szövettani altípusok a lepidikus, az acináris, a papilláris, a mikropapilláris és a szolid adenocarcinómák (*1. táblázat*). A legtöbb adenocarcinoma azonban komplex, heterogén megjelenést mutat, a besorolás a legnagyobb arányban előforduló, predomináns mintázat szerint történik. A nem-kissejtes tüdőrákok differenciáldiagnosztikájában, az adenocarcinómák és laphámrákok elkülönítésben leggyakrabban használatos immunhisztokémiai reakciók a thyroidea transzkripciós faktor 1 (TTF-1)/NapsinA, a p40/p63 és a citokeratin 5/6 [7].

A szövettani altípus meghatározásán túl a differenciáltsági fok megállapítása is fontos eleme a prognosztikának, ami a szerkezeti és citológiai sajátosságok alapján történik [19-

21]. Sica és munkatársai egy szerkezeti sajátosságokon alapuló grádusmeghatározást („architectural grade”) alkalmazva sorolták három kategóriába a különböző növekedési mintázatot mutató adenocarcinomákat (1 – jól differenciált, lepidikus predomináns; 2 – közepesen differenciált, acináris vagy papilláris predomináns; 3 – rosszul differenciált, szolid vagy mikropapilláris predomináns). A grade meghatározása a két leginkább domináns növekedési mintázat pontszámainak összege alapján történik a daganatok alacsony (2 pont), közepes (3-4 pont) vagy magas (5-6 pont) rizikójú csoportokba sorolásával. A fenti, mintázat alapú grading rendszer elsősorban a műtéti reszekátumok besorolására alkalmazható jól és információt szolgáltat a betegség várható lefolyásáról, valamint a daganat áttétképzési hajlamáról [20]. Kadota és munkatársai a korábbi grading rendszert a mitózisok számának meghatározásával egészítették ki, ami a betegek további stratifikációjában eredményesnek mutatkozott [19].

### **1.3.2. A tüdő adenocarcinómák hagyományos terápiája**

A nem-kissejtes tüődaganatok, így az adenocarcinómák hagyományos kezelése alapvetően három pilléren nyugszik, úgymint a daganat sebészi eltávolítása, a sugárkezelés és a kemoterápia [18].

A sebészi eltávolítás elsősorban korai, I-II. stádiumú betegség esetén jön szóba, ha a beteg általános állapota ezt lehetővé teszi [22]. Manapság egyre inkább törekednek a minimálisan invazív technikák fejlesztésére is, amelyekkel idős betegekben, rossz tüdőfunkció és különböző kardiopulmonális komorbiditások esetén is lehetőség nyílt a daganat sebészi eltávolítására [23]. Az érintett tüdőszövet eltávolításán túl a mediastinális és bizonyos esetekben a hiláris és intrapulmonális nyirokcsomók sebészi kimetszése is elengedhetetlen a megfelelő stádium-besoroláshoz, valamint javítja a betegek túlélését [24, 25]. A sebészi terápia indukciós kezelést követően a lokálisan előrehaladott, de potenciálisan még reszekábilis daganatok, illetve izolált áttétek esetén is része lehet a komplex onkoterápiának [22, 23].

A sugárkezelés helyi terápiás eljárás, amelynek kivitelezéséhez elengedhetetlen a daganat stádiumának, kiterjedésének, továbbá a beteg általános állapotának, kísérőbetegségeinek és ehhez kapcsolódóan tüdőfunkciójának az ismerete [18]. A radioterápiának mind a kuratív, mind a palliatív kezelésben fontos szerepe van. Korai stádiumú tüődaganatok esetén az utóbbi években a sztereotaxiás ablatív sugárkezelés



(SABR) alkalmazása nyert teret, amely elsősorban az inoperábilis betegek terápiájában nyújt megoldást a sebészi kezelés alternatívjaként. Nemcsak primer tüdőtumrok esetén, hanem szoliter tüdőáttétek vagy oligometasztatikus daganatok esetén is jól alkalmazható [26]. Centrálisan elhelyezkedő tumrok esetén azonban a SABR alkalmazása a toxicitás magas kockázatával jár, ezért ezekben az esetekben inkább a proton sugárterápiát (PBT, proton beam therapy) részesítik előnyben [27]. Lokálisan előrehaladott esetekben (III. stádium) a kemoterápia mellett a sugárterápiának is fontos szerepe van a kezelésben, a kemoradioterápia alkalmazása ebben a betegcsoportban mérsékelt túlélési előnyt eredményezett [28, 29]. Inkurábilis betegség esetén az alacsony dózisú radioterápia palliatív kezelésként alkalmazható [30].

A molekulárisan célzott terápiás lehetőségek nagyléptékű fejlődése ellenére még ma is a platinabázisú kemoterápia jelenti a tüdődaganatok kezelésének első vonalbeli standardját. A műtét előtt és/vagy után alkalmazott kemoterápia jelentősen javítja a sebészi beavatkozás eredményeit a kuratív célú reszekciót követően.

A műtét előtt alkalmazott neoadjuváns kemoterápia leggyakrabban III/A stádium esetén kerül alkalmazásra. Elsődleges célja az ún. downstaging, a tumor méretének csökkentése és a nyirokcsomó-státusz javítása a tervezett műtét előtt [31, 32]. A kezeléshez egy platinaszármazék (elsősorban ciszplatin) és egy harmadik generációs kemoterápiás szer (pl. gemcitabin, vinorelbin, docetaxel, paclitaxel, pemetrexed) kombinációját javasolják [32].

A műtét után alkalmazott adjuváns kemoterápia célja az esetlegesen jelen levő mikrometasztázisok eliminálása és ennek segítségével a túlélés növelése. A szisztémás terápia alapját ebben az esetben is a platinabázisú kettős kombinációk jelenik [33]. Az adjuváns terápia alkalmazása elsősorban II-es és III-as stádiumban javasolt, I. stádium esetén rutinszerűen nem javallt [32].

A célzott terápia térnyerése ellenére a kemoterápiás (citotoxikus) kezelésnek ma is fontos szerepe van az előrehaladott, metasztatikus adenocarcinomák kezelésében IV. stádiumú adenocarcinoma esetén, epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) és v-raf rágcsáló sarcoma virális onkogén homológ B1 (BRAF) aktiváló mutáció vagy anaplasztikus lymphoma-kináz (ALK) és ROS proto-onkogén 1 (ROS1) génátrendeződés hiányában, Kirsten patkány sarcoma vírus onkogén homológ (KRAS) mutáció jelenlétekor vagy 50% alatti programozott sejthalál ligand-1 (PD-L1) pozitivitás esetén a

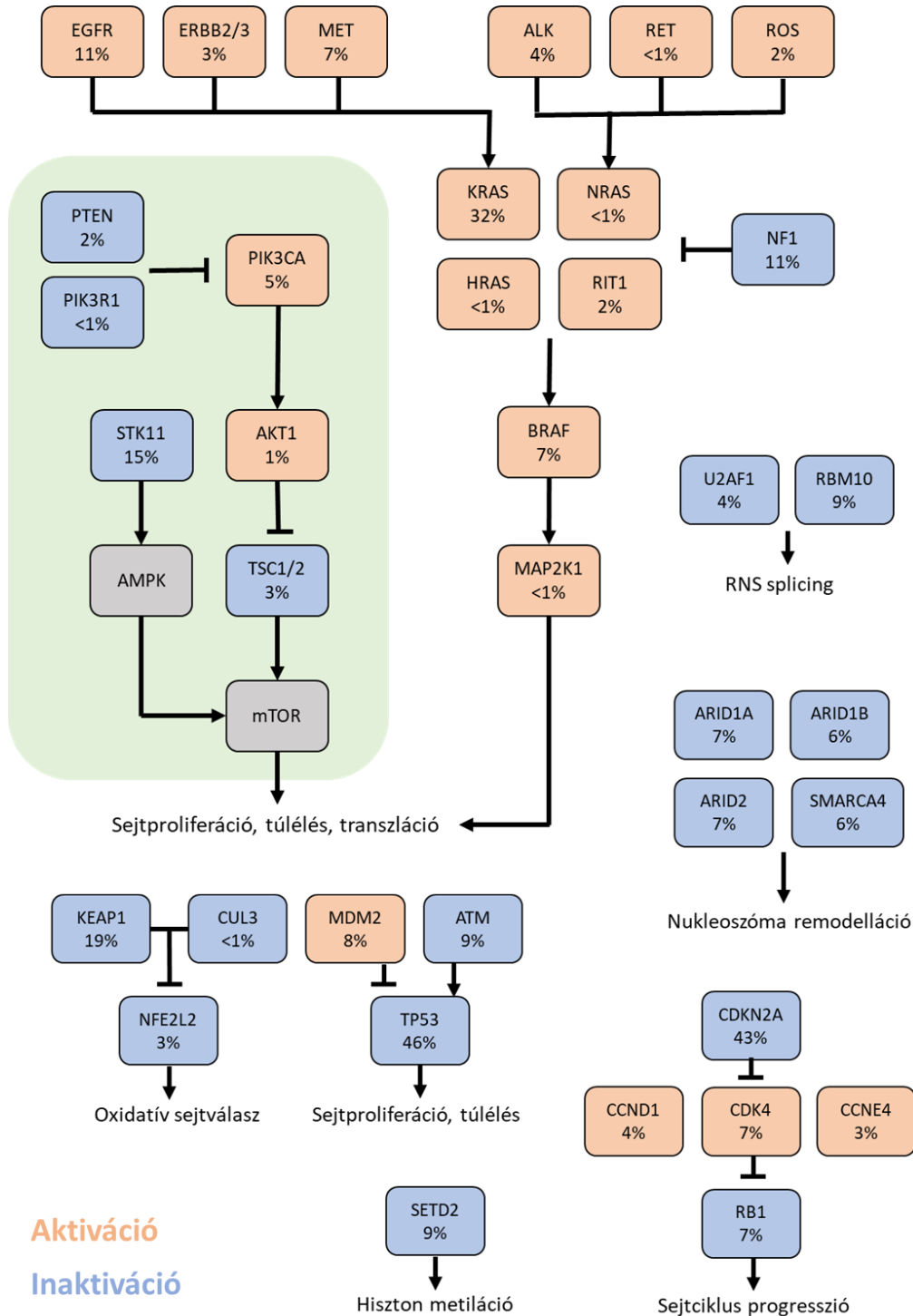
platina-bázisú kombinációk jelentik a kezelés standardját 0-1-es Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) státuszú, tehát viszonylag jó általános állapotú betegekben. Kedvezőtlenebb performansz státusz (ECOG 2) esetén gemcitabine, vinorelbin vagy taxán monoterápia adható, rossz általános állapot (ECOG 3-4) esetén azonban kemoterápiás kezelésre már nincs lehetőség [34, 35].

### 1.3.3. Molekuláris eltérések és célzott terápiás lehetőségek tüdő adenocarcinomákban

A tüdődaganatok kezelésében évtizedek óta paradigmaváltásnak voltunk, vagyunk tanúi: egyre többet tudunk a daganatok keletkezésében, növekedésében és áttétképzési folyamataiban kulcsfontosságú szerepet játszó génhibákról, molekuláris eltérésekről, mindinkább kirajzolódnak a daganatok patobiológiájában feltételezhetően fontos jelátviteli útvonalak, szabályozási csomópontok. A molekulárisan támadható célpontok megismerése forradalmasította a tüdődaganatok kezelését, a napjainkban már rutinszerűen végzett genetikai vizsgálatok lehetővé teszik az ún. „driver” mutációk azonosítását, amelyek a célzott terápia alapját jelentik. Az adott daganat individuális sajátosságainak meghatározása, a molekulárisan támadható célpontok azonosítása pedig utat nyit a személyre szabott terápia alkalmazása felé.

A tüdő adenocarcinomák kialakulásában fontos szerepe van bizonyos proto-onkogének aktivációjának és tumorszuppresszorok inaktivációjának, amelyek „driver” mutációk következményeként jönnek létre. A leggyakrabban előforduló genetikai eltéréseket a 2. ábra foglalja össze. A *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) projekt eredményei szerint sok más daganattípushoz hasonlóan tüdődaganatokban is a leggyakrabban előforduló genetikai eltérés a *TP53* gén inaktíváló mutációja (46%), amely a DNS hibajavításban és apoptózisban fontos szerepet játszó p53 tumorszuppresszor fehérje inaktivációját eredményezi [36, 37]. A *KRAS* mutáció 32%-os gyakorisággal fordul elő és kölcsönösen kizárja az *EGFR* aktiváló mutációinak jelenlétét, amely a vizsgált populáció 11%-ára jellemző. További gyakoribb eltérések a *BRAF* (7%) és *MET* (7%) gének aktiváló, illetve a *CDKN2A* (43%), *KEAP1* (19%), *STK11* (15%), *NFI* (11%) és *RBI* (7%) tumorszuppresszor gének inaktíváló mutációi. A kromatin módosításban szerepet játszó *SETD2* (9%), *ARID1A* (7%) és *SMARCA4* (6%), valamint az RNS splicing

folyamatában résztvevő *RBM10* (9%) gének eltérései szintén gyakoriak tüdő adenocarcinomákban [36].



2. ábra. A leggyakrabban előforduló aktiváló és inaktíváló génhibák tüdő adenocarcinomákban [36, 38]. A dolgozat témája szempontjából kiemelten fontos, PI3K/Akt/mTOR jelátvitelt érintő eltérések zöld háttérrel kerültek kiemelésre.

A fent felsorolt eltérések közül jelenleg csak az *EGFR* aktiváló mutációja, az *ALK* és a *ROS1* génátrendeződés, valamint a *BRAF* mutációja esetén rendelkezünk az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) és az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal (FDA) által jóváhagyott molekulárisan célzott kezeléssel [35].

Az *EGFR* aktiváló mutációja a tirozin-kináz domént érinti és konstitutív aktivációt eredményez, amely a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K)/protein-kináz B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR), valamint a patkány sarcoma vírus onkogén homológ (RAS)/rágcsáló sarcoma vírus onkogén homológ (RAF)/mitogén-aktivált protein kináz kináz (MEK)/extracelluláris szignál-regulált kináz (ERK) jelátviteli útvonalak működését egyaránt fokozza. A leggyakrabban előforduló aktiváló mutáció a 19-es exon in-frame deléciója és a 858-as kodon arginin-leucin cserét (L858R) eredményező misszensz mutációja, amelyek egyrészt fokozott kináz aktivitást hoznak létre, másrészt segítik a gátlószerek receptorokhoz való kötődését. Az *EGFR* génnek vannak azonban olyan mutációi is, amelyek az EGFR-inhibitorokkal szembeni primer (20-as exon inszerció) vagy szerzett (pl. T790M) rezisztenciáért felelősek. A T790M mutáción kívül más mechanizmusok (pl. *MET*-amplifikáció, *PIK3CA*-mutáció) is hozzájárulhatnak a szerzett rezisztencia kialakulásához. Jelenleg az EGFR tirozin-kináz gátlók közül az erlotinib, a gefitinib, az afatinib és T790M mutáció esetén az osmertinib alkalmazható a terápiában [35, 39-43].

Az *ALK* génátrendeződés a nem-kissejtes tüdődaganatok kevesebb, mint 5%-ára jellemző. Az *ALK-EML4* fúziós gén a 2. kromozómán bekövetkező inverzió eredményeképpen jön létre, a keletkező konstitutívan aktív fúziós protein elősegíti a daganatsejtek növekedését és proliferációját. A crizotinibet 2011-ben törzskönyvezték az ALK pozitív nem-kissejtes tüdődaganatok kezelésére, a kialakuló rezisztencia mechanizmusok (pl. az ALK tirozin-kináz régiójának szerzett mutációi) leküzdésére azonban az utóbbi években újabb ALK tirozin-kináz gátló molekulák is (ceritinib, alectinib, brigatinib) kifejlesztésre kerültek, amelyek a betegek többségében eredményesen alkalmazhatók [35, 43-47].

A *ROS1* génátrendeződés a tüdő adenocarcinomák 1-2%-ában jelenik meg, leggyakrabban a *CD74* a fúziós partner. A *ROS1* és az *ALK* kináz-doménjének aminosav sorrendje között közel 80%-os szekvencia homológia áll fenn, amelynek köszönhetően az ALK-inhibitor crizotinib mindkét kinázt gátolja. Jelenleg a crizotinib az egyetlen

törzskönyvezett szer a *ROSI* génátrendeződést mutató nem-kissejtes tüdődaganatok kezelésében [22, 35, 48, 49].

A *BRAF* mutáció a tüdő adenocarcinomák 1-2%-át jellemzi, leggyakrabban a klasszikus V600E mutáció jelenik meg. Tüdődaganatokban a dabrafenib monoterápia kevésbé bizonyult hatásosnak, a MEK-gátló trametinibbel kombinációban került törzskönyvezésre, amely a dabrafenibhez adva növelte az átlagos túlélést metasztatikus nem-kissejtes tüdőcarcinomákban [35, 50].

#### **1.3.4. A tüdő adenocarcinomák immunterápiája**

Az immunterápia megjelenése 2015-ben nagy áttörést jelentett a nem-kissejtes tüdődaganatok kezelésében. Az immunellenőrzőpont-gátlók – programozott sejthalál fehérje 1 (PD-1) és programozott sejthalál ligandum 1 (PD-L1) inhibitorok, citotoxikus T-lymphocytá asszociált fehérje 4 (CTLA-4) elleni antitestek – a korábban nehezen kezelhető, elsősorban dohányzással összefüggő, ún. nem onkogén addiktív karcinogenezis útján keletkező daganatok terápiájában jelentenek új, ígéretes megoldást [51, 52]. Az utóbbi időben az immunterápia már nemcsak monoterápiaként, hanem egyre inkább különböző immun-immun kombinációk vagy az immunterápia és a citotoxikus kemoterápia együttes alkalmazása formájában jelöli ki az új terápiás irányt [53-55].

A daganatellenes immunitásban az adaptív, sejtközvetített immunválasznak tulajdonítanak elsődleges szerepet, amelynek kulcselemei a T-lymphocyták. A tumorellenes immunválasz kialakulása egy többlépcsős folyamat, amelynek lépéseit pozitívan és negatívan szabályozó mechanizmusok egyaránt befolyásolják és a bonyolult folyamatban számos ponton regulációs zavar keletkezhet. Az immunválasz kialakításában az immunellenőrzőpont-receptorok gátló szabályozóként vesznek részt és fiziológias körülmények között az autoreaktív folyamatok gátlásában van szerepük [56].

A T-sejtek aktivitásán alapuló immunterápiás megközelítések közül tüdődaganatok esetén a tumorellenes immunreakciók kialakulását blokkoló folyamatok semlegesítésére irányuló megközelítéseknek van leginkább jelentősége a terápiában, amelyek közül az immunellenőrzőpont-gátló antitestek a legismertebb és legszélesebb körben alkalmazott szerek. Az immunellenőrzőpont-gátló készítmények általános hatásmechanizmusa, hogy a szervezet saját immunrendszerét közvetett módon serkentik a daganatellenes immunválaszra, elősegítik és lehetővé teszik a tumorellenes aktivitás kialakulását és

érvényesülését, így az immunrendszer sikeres mozgósításával a szervezet maga pusztítja el a daganatos sejteket [57].

Az immunellenőrzőpont-gátlók közül elsőként a PD-1 inhibitor nivolumabot törzskönyvezték – 2015-ben a laphámrákok (*CheckMate 017*), majd 2016-ban az adenocarcinomák (*CheckMate 057*) kezelésére másod- és többedvonalban [58, 59]. Elsővonalbeli kezelésként elsőként a PD-1-gátló pembrolizumabot engedélyezték 2016 novemberében a *KEYNOTE-024* vizsgálat eredményei alapján a magas PD-L1 expressziójú ( $\geq 50\%$ ), EGFR és ALK mutáció negatív, előrehaladott nem-kissejtes tüdőrák kezelésében [60]. A további immunterápiás készítmények közül leggyakrabban a PD-L1-gátló atezolizumab, durvalumab és avelumab, illetve a CTLA-4-gátló ipilimumab kerül alkalmazásra különböző vizsgálatok során, törzskönyvezésre azonban ezek közül egyelőre csak az atezolizumab és a durvalumab került [61-63]. Tüdődaganatok esetén PD-1 és PD-L1 gátlók alkalmazhatóságának fontos feltétele a PD-L1 pozitivitás, mint prediktív biomarker jelenlétének immunhisztokémiai módszerrel történő azonosítása a tumorsejteken [64, 65].

#### **1.4. Kissejtes tüdődaganatok**

A tüdő neuroendokrin daganatait négy fő csoportba sorolják: típusos carcinoid, atípusos carcinoid, kissejtes tüdőcarcinoma és nagysejtes neuroendokrin carcinoma. Ezek az altípusok sok hasonlóságot mutatnak a szövettani struktúrában, immunhisztokémiai sajátosságaikban és a molekuláris biológiai eltérésekben [66-68]. Míg a típusos és atípusos carcinoidokat alacsony és közepes grádusú daganatnak tartják, addig a kissejtes tüdőcarcinomák és a nagysejtes neuroendokrin carcinomák a magas grádusú, kedvezőtlen prognózisú tumorok közé tartoznak [69].

##### **1.4.1. A kissejtes tüdődaganatok patológiája**

A neuroendokrin tüdődaganatok leggyakoribb altípusa a kissejtes tüdőcarcinoma (SCLC), ami az újonnan diagnosztizált tüdődaganatos esetek 15-20%-át jelenti [70]. Leggyakrabban dohányzáshoz kapcsolatosan alakul ki [71], nem dohányzóknál elvétve jelenik meg [72]. Az SCLC-ket jellegzetes klinikai tünetek, gyors növekedés, korai áttétképzés, a sugár- és kemoterápiás kezeléssel szembeni rezisztencia és sajátos

genetikai eltérések jellemzik [73, 74]. Az SCLC sejtjei neuroendokrin karakterűek, jellegzetes fészkeket, rozettákat képeznek. A mitózisszám igen magas (akár elérheti az 50–60 mitózis/2 mm<sup>2</sup> értéket), emellett a nekrozisok jelenléte változó. A neuroendokrin eredet immunhisztokémiai vizsgálattal igazolható (chromogranin A, synaptophysin, CD56) [75].

A stádiumbeosztás klasszikusan két csoportra – limitált és kiterjedt betegség – osztotta az SCLC-ket, az utóbbi időben azonban már a nem-kissejtes tüdődaganatokhoz hasonlóan egyre inkább a TNM rendszer szerinti besorolásra törekednek SCLC esetén is [74].

Az SCLC bizonyos esetekben kevert formában is megjelenhet, ilyenkor a tumor kisebb részét egy nem-kissejtes komponens alkotja. A kezelést ezekben az esetekben elsősorban az SCLC komponens határozza meg. A kissejtes transzformáció a nem-kissejtes tüdőcarcinomák kezelése kapcsán is létrejöhet, leggyakrabban EGFR-mutáns daganatokban figyelték meg, ahol egyfajta rezisztencia mechanizmusként tartják számon [75-77].

Az SCLC a legagresszívabb tüdődaganat, amely a diagnózis időpontjában a betegek többségében már áttétet képzett. Általában centrálisan helyezkedik el, az esetleges tünetek – köhögés, vérköpés, obstrukció okozta pneumonia – a lokalizációval is összefüggésben lehetnek. A daganat gyorsan progrediál, a betegeknél a fogyáson kívül gyakran alakulnak ki obstrukciós tünetek, mint a rekedtség, a féloldali rekeszbénulás, a dysphagia vagy a vena cava superior szindróma. Az SCLC-re a paraneopláziás tünetek megjelenése is jellemző, SIADH (syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion) vagy Cushing-szindróma egyaránt kialakulhat. A prognózis rendkívül kedvezőtlen, az 5 éves túlélés 5% alatti [78].

#### **1.4.2. A kissejtes tüdődaganatok hagyományos terápiája**

SCLC esetén sebészi kezelés csak nagyon ritkán, korai stádiumban (T1-2, N0), mediastinális és supraclavicularis nyirokcsomóérintettség hiányában végezhető [79]. A diagnózis idején azonban a betegek többségénél a korai disszemináció miatt már IV. stádiumú, előrehaladott betegségről van szó. A szövettanilag nem verifikált szoliter pulmonális góc miatt végzett műtétek esetén a daganat az esetek 4-12%-ában bizonyul SCLC-nek. Az SCLC műtéti reszekciója után az adjuváns kemoterápia alkalmazása elengedhetetlenül fontos [78, 80, 81].

Az SCLC klinikai sajátosságai miatt az elsővonalbeli kezelést elsősorban a kemoradioterápia jelenti. Leggyakrabban hat ciklus platina-etopozid kezelést alkalmaznak, sugárkezeléssel kombinálva. A betegek nagy része eleinte jól reagál a kemoterápiás kezelésre, ennek ellenére gyakran néhány hónapon belül a rezisztencia kialakulásával párhuzamosan relapszus következik be, ilyenkor másod- illetve harmadvonalbeli kemoterápiás kezelésre van szükség [82]. A sugárterápia szintén kiemelkedő fontosságú a primer daganat kezelésében [83], ugyanakkor a központi idegrendszeri metasztázisok kialakulásának elkerülése érdekében komplett válasz esetén a profilaktikus koponyabesugárzás elvégzése is megfontolandó [84]. Kiterjedt betegség esetén a kemoterápia jelenti a kezelés standardját, amellyel átlagosan 10 hónapos túlélés érhető el [85].

Az újabb, második generációs kemoterápiás szerek (paclitaxel, docetaxel, vinorelbine, gemcitabine, pemetrexed) hatékonyságát számos klinikai vizsgálatban elemezték, azonban ezek egyike sem bizonyult eredményesebbnek az SCLC kezelésében a hagyományosan alkalmazott szereknél [86]. Néhány újabb citotoxikus szer (etirinotecan pegol, lurbinectedin) ígéretesnek mutatkozott kemoterápia-rezisztencia esetén, azonban ezek még további, megerősítő vizsgálatokat igényelnek [87, 88]. Összességében elmondható, hogy az SCLC kezelésében az elmúlt 30 évben nem történt számottevő előrelépés. A terápia hatékonyságának javítása elsősorban az SCLC molekuláris biológiai hátterének feltárásától, illetve prediktív markerek azonosításától remélhető [86].

### **1.4.3. Célzott terápia és immunterápia kissejtes tüdődaganatokban**

A nem-kissejtes tüdődaganatokban megfigyelt genetikai eltérések – mint az *EGFR*-mutáció, vagy *ALK*- és *ROS1*-transzlokáció – SCLC-kben elvétve figyelhetők meg. A molekuláris biológiai eltérések leggyakrabban a sejtciklus-szabályozásért felelős géneket (pl. *TP53*, *RBI*, *CDKN2A*), a PI3K/Akt/mTOR jelátvitelt (pl. *PIK3CA*, *PTEN*), az antiapoptotikus fehérjéket kódoló (pl. *BCL2*), valamint a DNS-repairben szerepet játszó géneket (pl. *MYC*, *PARP*, *MGMT*) érintik [89-92]. Az utóbbi években az epigenetikai tényezők fontosságára is fény derült az SCLC patobiológiájában. Egy tanulmányban több mint 70 gén hipermetilációját írták le, amelyek szerepet játszhatnak a neuroendokrin differenciáció zavarának létrehozásában [93], továbbá a CpG-sziget metilátor fenotípus a prognózissal is összefüggést mutatott [94].



Az utóbbi években számos célzott terápiás készítménnyel (bevacizumab, thalidomide, sunitinib, sorafenib, pazopanib, imatinib, gefitinib, bortezomib, vandetanib) végzett klinikai vizsgálat zárult le negatív eredménnyel. A hatástalanság hátterében az egyik legfontosabb tényező az lehetett, hogy a terápiát empirikus alapon alkalmazták, azaz a vizsgálatok többségében az adott kezelés tekintetében nem állt rendelkezésre prediktív marker, így nem történt meg a betegek biomarker alapú szelekciója a vizsgálatokba történő beválasztás során [86].

A célzott terápiák közül jelenleg a legtöbb ígéretes adat a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) gátló vegyületekről, a B-sejtes lymphoma protein 2 (Bcl-2) inhibitorokról, az auróra-kináz gátlókról és a delta-like ligand 3 (DLL3) inhibitorokról áll rendelkezésre (2. táblázat) [95].

**2. táblázat. Új potenciális célzott és immunterápiás lehetőségek és azok lehetséges prediktív biomarkerei az SCLC terápiájában [85, 96, 97]**

Célpont	Potenciális biomarker	A biomarker lehetséges kimutatási módja	Terápiás szer
PARP	SLFN11 expresszió	Immunhisztokémia	Veliparib
Bcl-2	BIM	Immunhisztokémia	Navitoclax
Auróra-kináz A	c-Myc	Immunhisztokémia	Alisertib
DLL3	DLL3 expresszió	Immunhisztokémia	Rova-T
PD-1	PD-L1 expresszió	Immunhisztokémia	Atezolizumab
PD-L1	TMB meghatározás	Új generációs szekvenálás	Pembrolizumab Nivolumab

**Rövidítések:** Bcl-2 - B-sejtes lymphoma protein 2, BIM - Bcl-2-szerű protein 11, DLL3 - delta-like ligand 3, PARP - poli(ADP-ribóz) polimeráz, PD-1 - programozott sejthalál fehérje 1, PD-L1 - programozott sejthalál ligandum 1, SLFN11 - Schlafen 11, TMB - tumor mutációs terhelés.

A PARP enzimes család a DNS-hibajavításban játszik fontos szerepet. Az SCLC-kre jellemző PARP overexpressziót a gyógyszerrezisztenciával és a genotoxikus hatásokkal szembeni ellenállóképességgel hozták összefüggésbe [98, 99]. A PARP-inhibitorok hatékonyságát kemoterápiával kombinációban két klinikai vizsgálatban elemezték, amelyekben a kemoterápia plusz PARP-inhibitor veliparibbal kezelt csoportban magasabb válaszarány és hosszabb túlélés mutatkozott [100, 101]. A kezelés eredményessége a biomarker-alapú betegszelekcióval fokozható – a Schlafen-11 (SLFN-11) fehérje a DNS-repairben játszik szerepet és expressziója prediktív lehet a PARP-inhibitorokra és a kemoterápiára adott válasz tekintetében [101, 102].

A Bcl-2 fehérjecsald tagjai az apoptózis szabályozásában vesznek részt. Fehérjeszintű analízisek során kimutatták az antiapoptotikus Bcl-2 overexpresszióját SCLC-kben, a fehérje magas szintje kedvezőtlen prognózissal is társult [103]. A Bcl-2 inhibitorok hatékonyságát mind monoterápiában, mind kemoterápiával kombinációban elemezték különböző klinikai vizsgálatokban. Az obatoclax és az AT-101 nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket, igaz itt sem történt meg a betegek biomarker alapú szelekcója [104, 105]. A közelmúltban egy preklinikai vizsgálatban igazolták, hogy a Bcl-2 család egy pro-apoptotikus tagjának, a BIM-nek az expressziója prediktív a navitoclax BH3 mimetikus kezelés tekintetében, ami a további klinikai vizsgálatok tervezéséhez segítséget nyújthat. A navitoclax az AZD8055 mTORC1/2-gátlóval kombinációban még hatékonyabbnak bizonyult *in vitro* [97].

Az auróra-kináz A-nak a mitotikus orsó képzésében van szerepe. A MYC – amely az auróra-kináz A és B transzkripcós szabályozója – az SCLC-ák 9-20%-ában amplifikált. Az auróra-kináz gátló alisertibbel végzett klinikai vizsgálatok ígéretesnek bizonyultak az SCLC és más szolid tumorok kezelésében [106]. Kimutatták továbbá, hogy a c-Myc expressziója prediktív értékű az alisertib terápia tekintetében [96].

A Notch egyik ligandjának, a DLL3-nak az alacsony szintű kifejeződése minden szövetben megfigyelhető, neuroendokrin daganatokban – így az SCLC-kben – viszont jelentős fokú overexpressziója jellemző [85, 107]. Ezt a tulajdonságot használja ki a Rovalpituzumab Tesirine (Rova-T) antitest-gyógyszer konjugátum, ami a DLL3-at ismeri fel, így a hozzá kötött citotoxikus molekula szelektíven hat a tumorsejtekre, míg a normál szövetekre kifejtett hatása minimalizálható. A Rova-T-vel végzett klinikai vizsgálatok ígéretesnek bizonyultak, különösképpen a magas DLL3-expressziót mutató betegek esetén [108, 109].

Az epigenetikai folyamatok szabályozási zavarainak – mint a promoter-hipermetiláció vagy a hiszton-deacetiláció – megjelenése szintén jellemző és terápias lehetőséget jelenthet az SCLC-k kezelésében. A hiszton-deacetiláz gátlókkal végzett klinikai vizsgálatok nem hoztak sikert a terápiában, jelenleg enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)- és DNS-metiltranszferáz (DNMT)-inhibitorokkal folynak vizsgálatok [110].

SCLC-kben a dohányzás indukálta karcinogenezis kapcsán magas a szomatikus mutációs arány (TMB), ami az immunterápia hatékonyságát vetíti előre, azonban a PD-L1-expresszió aránya a nem-kissejtes tüdődaganatokban megfigyelt értéknek csupán

megközelítően a fele [111, 112]. Az immunellenőrzőpont-gátlókkal számos klinikai vizsgálatot végeznek, amelyekben az ipilimumab és a pembrolizumab monoterápia nem bizonyult eredményesnek az SCLC kezelésében [113, 114]. A *CheckMate 032* vizsgálatban a nivolumab plusz ipilimumab kombináció a monoterápiánál hatékonyabbnak mutatkozott [115]. Az eddigi vizsgálatok azt igazolják, hogy az immunellenőrzőpont-gátlók az SCLC-ben szenvedő betegeknek csak egy alcsoportjánál lesznek hatékonyak. A terápiára jól reagáló betegek kiválasztásában a TMB meghatározása nyújthat segítséget [116].

### **1.5. Lymphangioleiomyomatosis**

A lymphangioleiomyomatosis (LAM) egy ritka, a tüdő cisztás átalakulásával járó betegség, amelynek háttérében a sclerosis tuberosa 1 (*TSC1*) vagy sclerosis tuberosa 2 (*TSC2*) gének funkcióvesztő mutációjával rendelkező LAM-sejtek proliferációja áll. A betegség sporadikus formában (S-LAM) és a sclerosis tuberosa autoszomális dominánsan öröklődő betegség részjelenségeként (TSC-LAM) is megjelenhet [117]. A *TSC1/2* mutáció az mTOR-jelátvitel hiperaktivációját hozza létre, ami célzott terápiás lehetőséget jelent a LAM terápiájában [118].

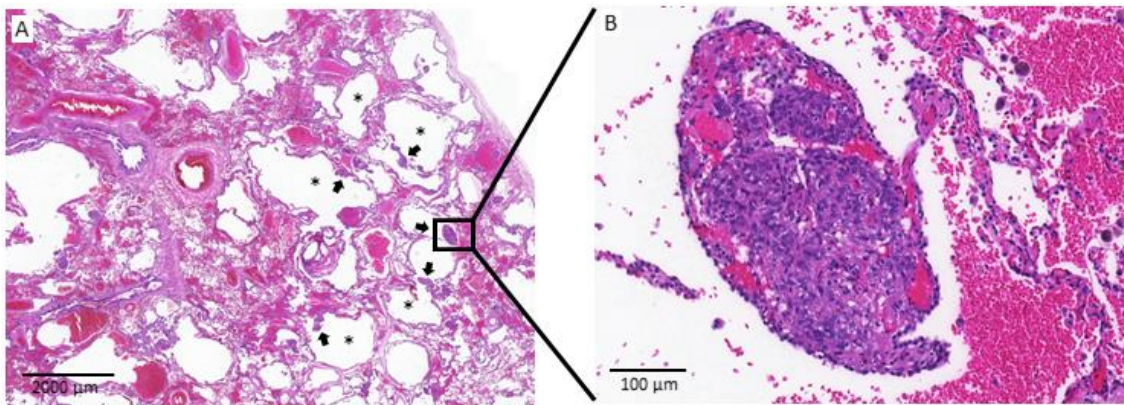
#### **1.5.1. A lymphangioleiomyomatosis patológiája**

A LAM egy fiatal nőket érintő multiszisztémás betegség, amelynek egyik leggyakoribb manifesztációja a tüdő légzési elégtelenséghez vezető progresszív cisztás átalakulása [119]. A kórképet ma már a jól differenciált, metasztatizáló neoplasztikus elváltozások közé, a perivaszkuláris epithelioid sejtes tumorok (PEComák) csoportjába sorolják [7]. Az elváltozások a tüdőn kívül gyakran érintik a veséket (itt jellemző az angiomyolipoma kialakulása) és a nyirokutakat is [120].

Rendkívül ritka kórképről van szó, az incidencia 3,4-7,8 / 1 millió nő [121], a TSC-LAM pedig a sclerosis tuberosában szenvedő nőbetegek 30-40%-át érinti [122]. A klinikai tünetek közül leggyakrabban a dyspnoe és a pneumothorax jelenik meg, ezekhez nem ritkán köhögés, hemoptysis és mellkasi folyadékgyülem is társul [123]. A diagnózis a klinikai tünetek mellett a nagyfelbontású komputertomográfia (HRCT) vizsgálaton, a szérum vaszkuláris endotheliális növekedési faktor D (VEGF-D) szintjének

meghatározásán (>800 pg/ml) és a tüdőbiopsziás minta patológiai vizsgálatán alapul [119].

Az elváltozásokat mindkét kórforma esetén a neoplasztikus LAM-sejtek proliferációja hozza létre, amelyek a simaizomsejtek és a melanocyták bizonyos jellegzetességeit egyaránt magukon hordozzák, ezáltal immunhisztokémiailag mind simaizom markerekkel (pl. SMA, desmin), mind melanocytá markerekkel (pl. HMB-45, Melan-A) kimutathatók [124, 125]. A LAM-sejtekben gyakran ösztrogén- és progeszteron-receptor pozitivitás is megfigyelhető [126]. A tüdőben számos, változó méretű ciszta jelenik meg, ezek átmérője 0,1 cm-től akár néhány cm-es nagyságig is terjedhet. A LAM-sejtek proliferációja az interstitium megvastagodását eredményezi, továbbá a kitágult venulák megrepedése és a kapillárisok elzáródása kapcsán kialakult pangás és okkult vérzés következtében hemosiderosis is létrejöhet [127]. A ciszták kialakulásához a LAM-sejtek által termelt mátrix metalloproteázok is hozzájárulhatnak, amelyeknek fontos szerepe van az extracelluláris mátrix degradációjában [128]. A LAM-sejtek proliferációjuk során gyakran nodulusokba rendeződnek, amelyek belső részében a magasabb proliferációs kapacitással rendelkező, simaizomszerű LAM-sejtek helyezkednek el, szélső területein pedig az epitheliod LAM sejtek foglalnak helyet, amelyek alacsonyabb proliferációs kapacitással és magasabb HMB-45-expresszióval jellemezhetők (3. ábra) [125].



**3. ábra. A LAM jellegzetes szövettani megjelenése H&E festett metszeten. A:** Kis nagyítással jól látszódnak a tüdőszövetben megjelenő ciszták (\*), illetve az ezek falában több helyen megtalálható LAM nodulusok (→). **B:** LAM nodulus nagy nagyítással készült képe. Láthatók a simaizomszerű és epitheliod LAM-sejtek, valamint a nodulust körülvevő hiperplasztikus II. típusú pneumocyták.

### 1.5.2. A lymphangiomeiomatosis molekuláris háttere

A LAM sejtek proliferációja a *TSC1/2* biallélikus funkcióvesztő mutációja kapcsán létrejött mTOR-hiperaktiváció eredménye. A *TSC1* és *TSC2* gének a hamartin és tuberin fehérjéket kódolják, a *TSC2* mutációja gyakoribb LAM-ban [129, 130]. A tuberinnek fontos szerepe van a sejtciklus, a sejtnövekedés és a proliferáció szabályozásában, míg a hamartin inkább az aktin reorganizáció regulációjában játszik szerepet, főként a Rho-GTP szint befolyásolásán keresztül [131]. A két fehérje egy heterodimert képezve a Ras homolog enriched in brain (Rheb) fehérjén hatva közvetett módon gátolja az mTOR komplex 1 (mTORC1) funkcióját [132]. Ennélfogva a *TSC1/2* gének funkcióvesztő mutációja esetén az mTORC1 és az általa regulált folyamatok aktivációja vagy gátlása következik be a szabályozás irányától függően.

Annak ellenére, hogy a LAM kialakulásának hátterében még ma is az mTORC1-aktivációt tartják a legfontosabb tényezőnek, az utóbbi években néhány mTORC1-független faktorra is fény derült. Ezek nagy része a hamartin-tuberin és a Rheb nem-kanonikus, ezáltal kevésbé ismert funkcióihoz kötöttek. Ilyen például a citoskeleton és a RhoA szintjének szabályozása a hamartin és az mTOR komplex 2 (mTORC2) révén, továbbá a differenciáció és a proliferáció befolyásolása a Notch és BRAF útján. A hamartin-tuberin komplex az mTORC2 aktivitását is befolyásolhatja, így a protein-kináz C (PKC), illetve Rac és Rho-GTP-ázok révén részt vehet az aktin reorganizáció szabályozásában [118, 133-136].

A hamartin-tuberin komplex további, Rheb-független hatása lehet a mátrix metalloproteázok expressziójának szabályozása, amelyek emelkedett szintje figyelhető meg a *TSC1/2*-mutációt hordozó sejtekben. A mátrix metalloproteázoknak fontos szerepe van a LAM patogenezisében, elsősorban az extracelluláris mátrix degradációján keresztül a ciszták kialakításában [128, 137, 138].

Az mTORC1 a sejtek anyagcseréjének központi szabályozója, így a *TSC*-mutáció kapcsán létrejött mTORC1-aktiváció a LAM-sejtek metabolizmusát is befolyásolhatja. Leírták, hogy LAM-sejtekben megjelenhet az ún. Warburg-effektus (aerob glikolízis – a glikolitikus folyamatok előtérbe kerülése annak ellenére, hogy nincs oxigénhiány), a pentóz-foszfát út és a lipid-bioszintézis fokozódása a hypoxia indukálta faktor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) és szterolreguláló elemeket kötő fehérje-1/2 (SREBP1/2) expressziójának növekedése kapcsán, az mTORC1-aktiváció eredményeképpen [139, 140]. Ismert, hogy a LAM az

<sup>18</sup>F-fluorodezoxiglükóz pozitronemissziós tomográfia (FDG-PET) vizsgálatok során viszonylag alacsony FDG-felvételt mutat, ami a glukóz-transzporterek hibás működésének vagy a membránba helyeződés zavarának eredménye lehet [141, 142], ezért a glikolízis szerepén túl a glutaminolízis fontossága is felmerült a LAM patobiológiájában [143].

A LAM-sejtek ösztrogén- és progeszteron-receptort expresszálnak, ami a női nemi hormonok szerepét vetíti elő a betegség patogenezisében. Ezt megerősíti az igen jelentős fokú női predominancia, valamint a tény, hogy a betegség leggyakrabban a menopausa előtt alakul ki, továbbá terhesség alatt általában gyorsabban progrediál [118, 126, 144]. Az ösztrogén és a progeszteron valószínűleg a jelátviteli útvonalakkal lép interakcióba, azonban ez a folyamat még kevésbé tisztázott. Az ösztrogén-receptor pozitív LAM-sejtekben az anti-apoptotikus Bcl-2 expressziója is megfigyelhető, ami az ösztrogén-jelátvitel és a LAM-sejtek túlélése közötti kapcsolatra utalhat [145]. Ismert továbbá, hogy a 17- $\beta$  ösztradiol a *TSC2*-deficiens sejtekben növeli a sejt méretet, segíti a sejtek túlélését és migrációját [146, 147], valamint fokozza a mátrix metalloproteáz-2 expresszióját, ami hozzájárul a tüdőszövet destrukciójához [148].

### 1.5.3. A lymphangiomiomatosis terápiaja

A női hormonok szerepe a LAM patogenezisében régóta ismert, ennek megfelelően többféle hormonrendszert célzó kezelés hatásosságát vizsgálták a LAM kezelésében. A bilaterális oophorectomia eredményességével kapcsolatban ellentmondásos adatok születtek, valamint az anti-ösztrogén terápia és gonadotropin-releasing hormon (GnRH)-analógok hatásosságát sem sikerült bizonyítani [149-151]. Egy újabb, ígéretes lehetőségként az aromatáz-inhibitorok alkalmazása jön szóba, elsősorban menopauzán átesett betegekben [152].

Az mTORC1-inhibitorokat – a sirolimust és az everolimust – hatékonynak találták a LAM kezelésében, eredményesen gátolták a LAM-sejtek proliferációját és a betegség progresszióját a *Multicenter International LAM Efficacy of Sirolimus (MILES)* vizsgálatban, amely alapján törzskönyvezésre kerültek a LAM terápiájában [153, 154]. A kezelés felfüggesztését követően azonban a tüdőfunkció tovább romlik, így a jelenlegi álláspont szerint akár élethosszig tartó sirolimus kezelésre lenne szükség a terápiás eredmény fenntartásához. A hosszútávú kezelés során az mTOR-gátlók mellékhatásai és

a rezisztencia kialakulása azonban terápiás nehézséget okozhat [155], így jelenleg alacsony dózisú sirolimus kezeléssel folynak vizsgálatok [156].

Előrehaladott betegség esetén a tüdőtranszplantáció jön szóba, amellyel 65%-os 5-éves túlélést sikerült elérni LAM betegek esetén [157, 158]. A sirolimus immunszuppresszív és sebgyógyulást negatívan befolyásoló hatásait figyelembe véve fontos a kezelés folytatásának vagy felfüggesztésének kérdése a transzplantációs várólistán levő betegeknél és a transzplantációt követően, ezzel kapcsolatban azonban kevés a rendelkezésre álló adat és egyelőre nincs egységes álláspont. A sirolimus kezelést a bronchiális anasztomózis dehiszcenciájának megelőzése érdekében célszerű elhagyni a közvetlen poszttranszplantációs időszakban, azonban a későbbiekben a terápia folytatása előnyös lehet a betegség transzplantált tüdőben való ismételt megjelenésének megelőzésében [159, 160]. A LAM áttétképző hajlamát alátámasztva több esetben leírták ugyanis, hogy a LAM-sejtek idővel a transzplantált tüdőben – érdekes módon férfi donorból származó szervben is – ismét megjelenhetnek relapszust eredményezve [161, 162], továbbá a vérben és a mellkasi folyadékgyülemében is jelen lehetnek [163-165].

### **1.6. Az mTOR jelátviteli útvonal**

Az mTOR-ral kapcsolatos vizsgálatok 45 évvel ezelőtt – 20 évvel az mTOR-kináz azonosítása előtt – kezdődtek a rapamycin felfedezésével a Húsvét-szigeten. Az elmúlt évtizedekben körvonalazódott, hogy az mTOR-jelátvitel a homeosztázis fontos szabályozója, számos környezeti jelet integrál a sejt növekedésének, proliferációjának és metabolizmusának szabályozása érdekében. Az mTOR-jelút szabályozási zavarai – elsősorban hiperaktivációja – gyakran megfigyelhetők a humán daganatokban. Az utóbbi években végzett molekuláris vizsgálatok kimutatták, hogy ennek a hiperaktivációnak a hátterében gyakran az mTOR-jelátvitelben szerepet játszó fehérjéket kódoló gének (pl. *PIK3CA*, *PTEN*, *STK11* vagy *RICTOR*) genetikai aberrációi állnak. Ezek a genetikai eltérések tüdődaganatokban is gyakoriak és a személyre szabott terápia célpontjait képezhetik. Az mTOR-gátlók monoterápiás hatékonysága korlátozott a legtöbb tüdődaganat esetén, azonban különböző kombinációk részeként ígéretesnek bizonyulnak a hatékonyság növelésében és a szerzett rezisztencia leküzdésében. Az mTOR-jelátvitel

vizsgálata és pontosabb megértése előrelépést hozhat az mTOR-jelút inhibitorainak klinikai transzlációjában.

### 1.6.1. Az mTOR-kináz

A rapamycint 45 évvel ezelőtt Sehgal és munkatársai fedezték fel egy új gombaellenes szerként [166], majd nem sokkal később a rapamycin immunszuppresszív és daganatellenes hatásait is leírták [167, 168]. A hatásmechanizmus azonban további 20 évig ismeretlen maradt. Az mTOR-kinázt 25 évvel ezelőtt azonosították a rapamycin-FK506-kötő fehérje 12 (FKBP-12) komplex direkt célpontjaként [169, 170].

Az mTOR-kináz egy szerin-treonin kináz, ami két, felépítésében és funkciójában különböző fehérjekomplex – az mTORC1 és az mTORC2 – katalitikus alegységét képezi (4. ábra) [171]. Az mTOR-komplexek különböznek rapamycin-érzékenységükben, az őket felépítő fehérje alegységekben, szubcelluláris lokalizációjukban, továbbá upstream szabályozásuk és downstream effektoraik terén [172, 173]. Az mTOR-jelátvitel az mTOR-kináz komplexeken keresztül integrálja a környezeti jeleket és ezek függvényében fontos szerepet játszik számos esszenciális sejtfunció – többek között a túlélés, a sejtnövekedés és a proliferáció – szabályozásában. Az mTOR-kináz a PI3K/Akt/mTOR tengely fontos tagja, ugyanakkor a molekuláris hálózatok központi elemeként számos más, daganatbiológiai szempontból fontos jelátviteli útvonalba (pl. Ras/Raf/MEK/ERK-jelátvitel) szintén bekapcsolódik [174, 175].

### 1.6.2. mTORC1

Az mTORC1 az mTOR, a regulatory-associated protein of mTOR (Raptor) és a mammalian lethal with SEC13 protein 8 (mLST8) fehérjék mellett két gátló alegységet – proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) és DEP domain-containing mTOR-interacting protein (DEPTOR) fehérjék – is tartalmaz [176]. Bizonyos katabolikus útvonalak gátlása mellett a sejtek az anabolikus folyamatok aktivitásának fokozása révén tudják növelni a fehérjék, lipidek és nukleotidok hozzáférhetőségét, ami a sejtnövekedés és proliferáció makromolekula-igényének biztosításához szükséges. Az mTORC1 az anabolizmus és katabolizmus közötti egyensúly fenntartásával központi szerepet játszik ezeknek az anyagcsere-folyamatoknak a szabályozásában, lehetővé téve a változó környezeti feltételekhez való alkalmazkodást [171].



Az mTORC1 aktivációja bekövetkezhet a PI3K/Akt/mTOR útvonalon keresztül a sejtfelszíni növekedési faktor tirozin-kináz receptorok aberráns aktivációja vagy más, PI3K/Akt/mTOR jelátvitelt érintő genetikai eltérés eredményeként [173, 174]. Másrészt különböző nutriensek, illetve az oxigén jelenléte – a sejt energiaszenzoraként működő és az mTORC1-et negatívan szabályozó – adenosin-monofoszfát-aktivált protein-kináz (AMPK) gátlásán keresztül is fokozni tudja az mTORC1-aktivitást [177]. Különböző aminosavak – elsősorban az arginin és a leucin – szintén aktiválják az mTORC1-et a Rag GTP-ázokon keresztül, amelyek az mTORC1 lizoszómákhoz történő transzlokációját támogatják, hozzáférhetővé téve aktivátora, a Rheb számára (4. ábra) [178, 179].

Az aktivált mTORC1 az aktiváció forrásától függetlenül továbbítja a jelet a downstream effektorok irányába. Legfontosabb szubsztrátjaiként a transláció szabályozásáért felelős eukarióta translációs iniciációs faktor 4E-kötő fehérje 1 (4E-BP1) és a riboszomális S6-kináz 1 (S6K1) fehérjéket foszforilálja, fokozva a fehérjeszintézist, ami hozzájárul a sejt méret növekedéséhez és a proliferáció fokozódásához [173, 180]. A proliferáló sejtek bioszintetikus igényeinek biztosítása érdekében az mTORC1 további targeteket is szabályoz (Lipin1, SREBP, CAD, ATF4), amelyek révén a lipidek és nukleotidok szintézisét fokozza [181-184]. Az mTORC1 emellett az autofágiát és a lizoszóma biogenezist is szabályozza az unc-51-szerű autofágiát aktiváló kináz 1 (ULK1) és a transzkripció faktor EB (TFEB) foszforilációján keresztül, párhuzamosan az ubiquitin-proteaszóma rendszer működését is fokozva [185, 186]. További metabolikus hatásait illetően az mTORC1 szabályozza a mitokondriális biogenezist a peroxiszóma-proliferátor aktivált receptor gamma koaktivátor 1 $\alpha$ -án (PGC1 $\alpha$ ) keresztül [187], illetve hypoxiás körülmények között a HIF1 $\alpha$  fokozott translációja révén elősegíti a glikolitikus folyamatok előtérbe kerülését az oxidatív foszforilációval szemben [139, 188, 189]. A reaktív oxigéngyökök szintje szintén erősen függ az mTORC1-től, ami a szuperoxid-dizmutáz 1 (SOD1) aktivitását szabályozva képes minimalizálni az oxidatív károsodásokat [190].

### 1.6.3. mTORC2

Az mTOR-kináz katalitikus alegységen túl az mLST8 és a gátló funkciójú DEPTOR nemcsak az mTORC1-nek, hanem az mTORC2-nek is részét képezi. Az mTORC2 komplexben vázfehérjeként – az mTORC1-gyel szemben – a Raptor helyett a rapamycin-

insensitive companion of mTOR (Rictor) vesz részt. Ezen kívül az mTORC2-ben két további szabályozó alegység, a mammalian stress-activated protein kinase-interacting protein 1 (mSin1) és a protein observed with Rictor (Protor1/2) fehérjék találhatóak. Szemben az mTORC1-re kifejtett hatásaival, az FKBP12-rapamycin komplex az mTORC2-höz nem kötődik, ezért az mTORC2-t rezisztensnek tartják a rapamycin kezeléssel szemben. A hosszú távú rapamycin kezelés azonban a komplex összeépülésének megakadályozásával gátolhatja az mTORC2 funkcióját is [171, 191].

Az mTORC2 upstream regulációja az mTORC1 szabályozásánál kevésbé ismert. Különböző növekedési faktorok a PI3K-on keresztül aktiváló hatást fejthetnek ki az mTORC2-re, míg újabb vizsgálatok szerint a sejtekben kialakuló energetikai stressz hatására az az energiaszenzor AMPK útján is aktiválódhat [192]. Ezen felül az mTORC2-t felépítő fehérje alegységek különféle poszttranszlációs módosulásokon – foszforiláción, acetiláción vagy ubiquitináción – eshetnek át, ami szintén befolyásolhatja a komplex összeépülését és aktivitását [193]. A Rictor (az mTORC2 vázfehérjéje) például több ilyen módosítható oldalláncot tartalmaz, az ezeken bekövetkező poszttranszlációs módosulások hatással lehetnek az mTORC2 aktivációjára. A Rictort az S6K1 a Thr1135 oldalláncon, a glikogén-szintáz-kináz 3 (GSK3) a Ser1235 és Thr1695 oldalláncon foszforilálhatja, azonban ezen modifikációk pontos szerepe egyelőre ismeretlen [194-196].

Míg az mTORC1 elsősorban a sejt anyagcserefolyamatainak és növekedésének szabályozásában játszik fontos szerepet, addig az mTORC2 inkább a sejtproliferáció, a túlélés, a citoszkeleton reorganizáció és ennél fogva a sejtek migrációjának szabályozásában meghatározó. A protein-kináz C (PKC) és a szérum és glükokortikoid regulált kináz 1 (SGK1) foszforilációján túl az mTORC2 az Akt Ser473-as oldallancát is foszforilálhatja, ami végeredményben fokozhatja az mTORC1 aktivitását [171, 175, 191].

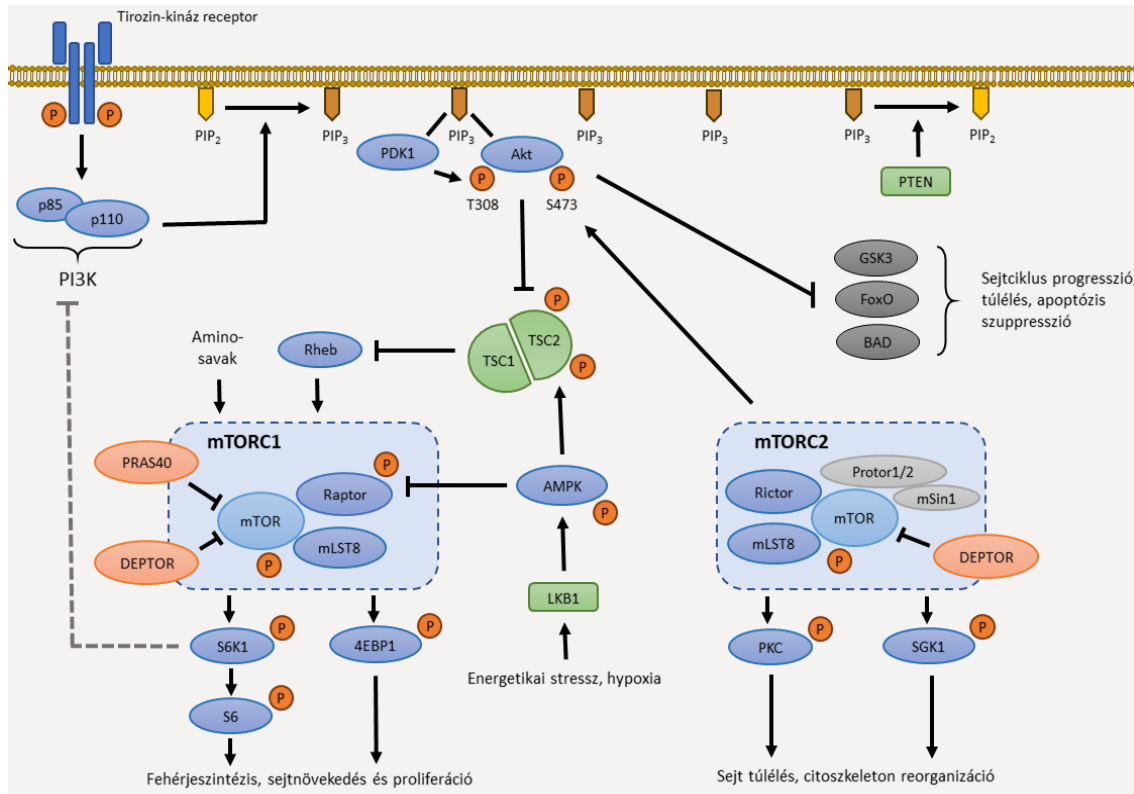
#### **1.6.4. Az mTOR-jelátvitel szabályozása**

Az mTORC1 számos intra- és extracelluláris jelet – növekedési faktorok, DNS-károsodás, energiasztátusz, aminosav- és oxigénszint – integrál és ezáltal több alapvető, a sejtek növekedésében és proliferációjában kulcsfontosságú funkciót szabályoz [171, 197]. Az mTORC2 szintén aktiválódhat növekedési faktorok hatására, ez a PI3K-függő folyamat azonban még kevésbé ismert [198]. A közelmúltban leírták, hogy az AMPK is

fokozhatja az mTORC2 aktivitását [192], ennek ellenére az általános álláspont szerint az mTORC1-gyel ellentétben a tápanyagellátottság az mTORC2 aktivitását nem befolyásolja [197].

A PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonal elsősorban a receptor tirozin-kinázok (pl. EGFR, HER2, VEGFR, IGFR-1, PDGFR) útján aktiválódhat és fontos szerepet játszik számos sejtfunkció – úgymint a proliferáció, a túlélés, a differenciáció, a sejtmotilitás és az anyagcserefolyamatok – szabályozásában [171, 199]. Az receptor tirozin-kinázok által aktivált PI3K a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP<sub>2</sub>) foszfatidilinozitol-3,4,5-trifoszfáttá (PIP<sub>3</sub>) alakítja, ami az effektor fehérjékkel kölcsönhatásba lépve elindítja a jelátvitelt [199, 200]. A tumorszuppresszor foszfatáz és tenzin homológ (PTEN) a PI3K hatását ellensúlyozva a PIP<sub>3</sub>-at PIP<sub>2</sub>-vé alakítja, így gátolja a jelátvitelt [201]. A jelút következő lépéseként az Akt aktivációja következik be a Thr308 oldallánc foszforilációjával, ami a TSC1/2 komplex gátlásához, ezáltal az mTORC1 aktivációjához vezet. Az mTORC1 megnövekedett aktivitása a fehérjeszintézis, a sejtnövekedés és a proliferáció fokozódását eredményezi (4. ábra) [202].

A szerin-treonin kináz Akt három izoformában (Akt1, Akt2, Akt3) fordul elő. Az Akt1 és az Akt2 ubiquiter módon, a legtöbb szövetben kifejeződik, míg az Akt3 expressziója elsősorban az agyban, a szívben és a vesében figyelhető meg [200]. A foszfoinozitol-dependens kináz 1 (PDK1) és az Akt pleckstrin homológ doménje egyaránt a PIP<sub>3</sub>-hoz kapcsolódik, így a kolokalizáció következtében lehetségessé válik, hogy a PDK1 foszforilálja az Akt-ot a Thr308-as oldalláncon, ami annak részleges aktivációját idézi elő. Az mTORC2 szintén foszforilálhatja az Akt-ot a Ser473 oldalláncon, amely az Akt teljes aktivációját, enzimatisz működésének további fokozódását eredményezi [203, 204]. Az aktivált Akt downstream célpontjainak – például a GSK3, a forkhead box O (FoxO) transzkripciós faktorok és a Bcl-2-asszociált sejthalál agonista (BAD) – foszforilálása révén segíti a sejtciklus progresszióját és a sejtek túlélését, miközben gátolja az antiapoptotikus szignálokat. Mindezek mellett az Akt a TSC2 foszforilációja révén gátolja az mTORC1 negatív szabályozójaként működő TSC1/2 komplex funkcióját, fokozva az mTORC1 aktivitását [199].



**4. ábra. Az mTOR-jelátvitel egyszerűsített ábrája.** A PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonal leggyakrabban a tirozin-kináz receptorok irányából aktiválódik. A PI3K a PIP<sub>2</sub>-t PIP<sub>3</sub>-má foszforilálja, amely egy másodlagos hírvivőként az Akt foszforilációját idézi elő a Thr308-as oldalláncon. A PTEN a PIP<sub>3</sub> defoszforilációjával PI3K hatását ellensúlyozva gátolhatja a jelátvitelt. Az aktivált Akt a TSC2-t foszforilálja, ezáltal a TSC1/2 komplex disszociációja révén annak inaktivációját eredményezi. A TSC1/2 gátlása az mTORC1 aktivitásának fokozódásához vezet, ami a downstream effektorok – az S6K1 és a 4E-BP1 – révén elősegíti a fehérjeszintézis fokozódását, a sejtnövekedést és -proliferációt. Az mTORC1 az Akt túlzott aktivitásának megakadályozásában is fontos szerepet játszik egy S6K1 irányából induló negatív visszacsatolási hurkon keresztül (szürke szaggatott vonal), ami csökkenti a PI3K, így az egész jelút aktivitását. Az mTORC2-t aktiváló faktorok kevésbé ismertek. Az aktív mTORC2 az SGK1 és PKC fehérjéken keresztül segíti a sejtek túlélését, valamint részt vesz az aktin citoskeleton reorganizációjának szabályozásában. Ezen kívül az mTORC2 az Akt-ot is foszforilálhatja a Ser473 oldalláncon, így fokozza annak aktivitását. Az Akt az mTORC1-re kifejtett aktiváló hatáson túl a sejtciklus, a túlélés és az apoptózis szabályozásában további effektorai (GSK3, FoxO és BAD) révén is részt vesz. Energetikai stressz és hypoxia esetén a tumorszuppresszor Lkb1 csökkenti az mTORC1 aktivitását a TSC2 és a Raptor AMPK általi foszforilációjával.

A növekedési faktorok és az inzulin PI3K/Akt/mTOR jelátviteli hatásán túl tápanyag-ellátottsággal kapcsolatos környezeti szignálok – mint a magas ATP-, oxigén- és szérum aminosav-szint – szintén fokozhatják az mTORC1 aktivitását. Ezzel ellentétben bizonyos környezeti stressz szignálok – mint az alacsony ATP-szint, a hypoxia vagy a DNS-károsodás – elsősorban az AMPK-n keresztül hatva gátolhatják az mTORC1-aktivitást [171].

Az mTORC1 mellett az AMPK-t is a sejtek anyagcseréjének legfontosabb szabályozói között tartják számon, fontos szerepe van a glükóz és egyéb tápanyagok szintjének monitorozásában [177]. Energia depléción vagy hypoxia esetén az aktivált AMPK a TSC2-t és a Raptort is foszforilálja, így gátolja az mTORC1 aktivitását. Bizonyos környezeti tényezők fennállása esetén a tumorszuppresszor funkciójú, *STK11* gén által kódolt Lkb1 fehérje szintén az mTORC1 negatív regulátoraként működik az AMPK foszforilációja, aktivációja révén. Az *STK11* funkcióvesztő mutációja a gátló funkció kiesését, így az mTOR-aktivitás fokozódását eredményezi [179, 200, 202].

Hypoxiás állapotban az ATP-szint csökkenése az AMPK aktivációját, ezáltal az mTORC1 következményes gátlását okozza. Ezen felül, az alacsony oxigénszint a HIF1 $\alpha$  expresszióját is fokozza, ami a hypoxia indukálta faktor 1 $\beta$ -val együtt számos glikolízisben (glükóz transzporter 1 – GluT1), érújdonképződésben (vaszkuláris növekedési faktor A – VEGF A) és pH szabályozásban (szénsav-anhidráz 9 – CAIX) szerepet játszó gén kifejeződését szabályozza [205]. A hypoxia a regulated in development and DNA damage response 1 (REDD1) fehérje szintjét is növeli, ami a TSC2 aktivációja révén gátolja az mTORC1-et [206].

Az aminosavak jelenléte esszenciális az mTORC1 működéséhez [207]. Az emelkedett aminosav-szint a citoszolikus aminosav-szenzorok – szesztrinek, cellular arginine sensor for mTORC1 (CASTOR1) és S-adenosylmethionine sensor upstream of mTOR (SAMTOR) – révén aktiválja a Rag GTP-ázokat, amelyek a lizoszomális membránokhoz kötötten találhatóak és aminosavak hatására aktív heterodimerekké alakulnak. A Rag GTP-ázok aktív formája az mTORC1 vázfehérjéjéhez, a Raptorhoz kötődik, amelynek eredményeképpen az mTORC1 a lizoszómához transzlokálódik, így lehetővé válik, hogy szintén a lizoszomális membránban elhelyezkedő Rheb hatására aktiválódjon [178, 207-209].

### 1.6.5. Az mTOR-jelút által szabályozott metabolikus folyamatok

A proliferáció és túlélés biztosítása érdekében a daganatsejtek gyakran átprogramozzák anyagcseréjüket. A metabolikus változások a katabolikus és anabolikus folyamatokat egyaránt érinthetik, beleértve a glükóz, az aminosavak, a nukleotidok, a zsírsavak és a lipidek anyagcseréjét [179].

A metabolikus átprogramozódás gyakran különböző jelátviteli folyamatok által meghatározott. Láttuk, hogy a környezeti jelek – közöttük az energiaellátottság – befolyásolni képesek az mTOR-jelátvitel aktivitását, ugyanakkor fordítva, az mTOR-jelút is aktiválhat vagy gátolhat bizonyos anyagcserefolyamatokat (5. ábra) [171].

A glükóz a sejtek egyik legfontosabb energiaforrása. Ismert, hogy a daganatsejtek glükózfelvétele általában fokozott, a glükóz pedig oxigén jelenlétében is leggyakrabban a glikolízis útján hasznosul – ezt aerob glikolízisnek vagy más néven Warburg-effektusnak nevezzük. Az mTOR-jelátvitel fontos szerepet játszik a glükóz metabolizmusának szabályozásában: elsősorban a HIF1 $\alpha$  és a MYC transzkripciós faktorokon keresztül mind az mTORC1, mind az mTORC2 képes fokozni a glükóz transzporterek (pl. a GluT1) és a glikolitikus enzimek expresszióját [210, 211].

Az aerob glikolízis révén a daganatsejtek nagy mennyiségű piruvátot termelnek, amelyet a laktát-dehidrogenáz (LDH) enzim laktáttá alakíthat. A két irányban működő LDH a laktátot vissza tudja alakítani piruváttá, a reakcióhoz pedig a NAD<sup>+</sup> redukciója társul, ami lehetővé teszi a glikolízis fenntartását a daganatsejt számára. A LDH kétirányú működéséből következően bizonyos daganatsejtek egyéni jellemzőiktől és a mikrokoznyezettől függően leadják a laktátot a környezetükbe, míg mások azt felveszik, így akár metabolikus szimbiózis is létrejöhet a sejtek között [179, 212-214]. Az mTORC1 gátlása ezt a metabolikus egyensúlyt megbontva a normoxiás sejtekben fokozott glükózfelvételt és glikolízist, a hypoxiás sejtekben sejtthalált eredményezhet [215].

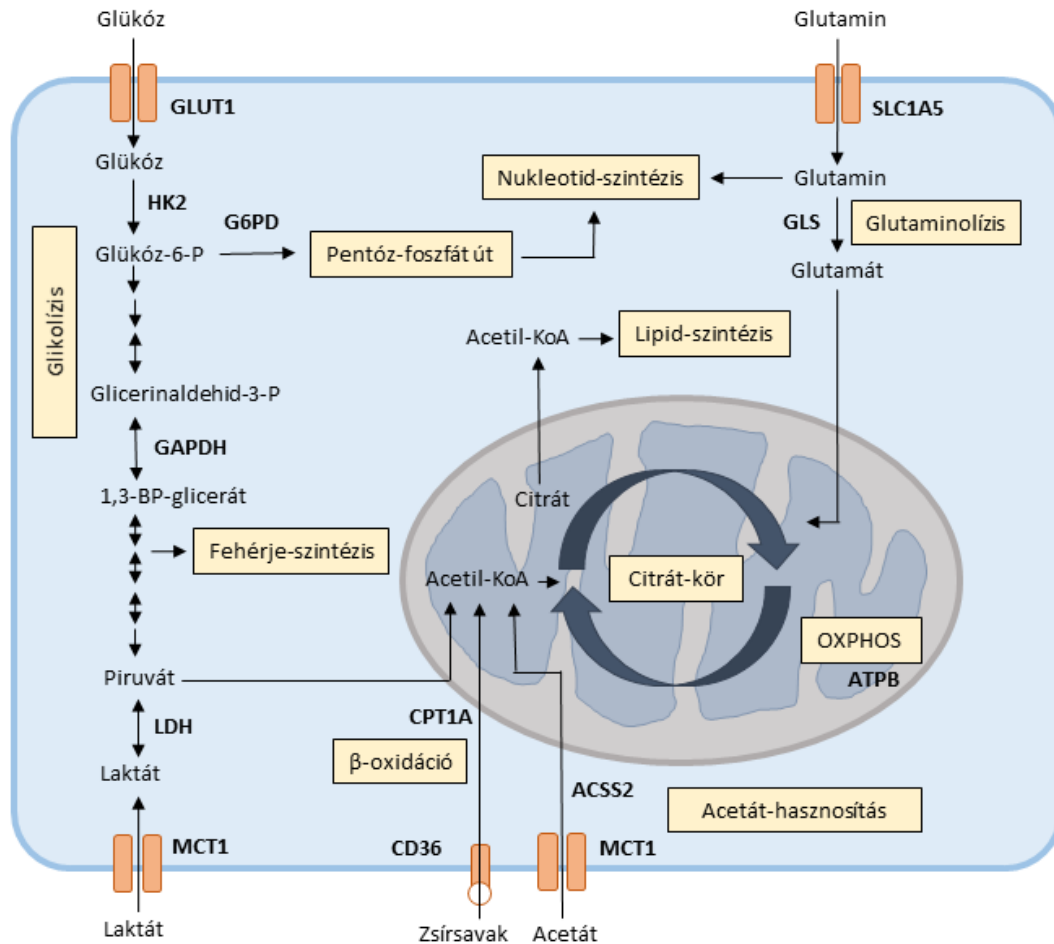
A glutamin egy nem-esszenciális aminosav, amelyet a daganatsejtek egyrészt szén- és nitrogénforrásként hasznosíthatnak különböző aminosavak, nukleotidok és lipidek felépítő folyamataiban, másrészt a citrát-ciklusban, majd a terminális oxidációban ATP-termelésre is felhasználhatják [216]. A glutaminolízist az mTORC1 és az mTORC2 is elősegítheti. Az mTORC1 fokozza a glutamináz (GLS) expresszióját és megakadályozza a glutamát-dehidrogenáz sirtuin 4-mediált gátlását [217, 218]. Az mTORC2 a FoxO3 és/vagy FoxO4 negatív szabályozásán keresztül gátolja a glutamát glutaminná történő

visszaalakításáért felelős glutamin-szintetáz expresszióját [219]. A glutaminolízis-gátlókkal számos klinikai vizsgálat folyik, ezek közül a CB-839 tűnik a legígéretesebb szernek. Az mTOR- és glutaminolízis-gátlók együttes adásánál szinergizmust figyeltek meg [220]. Az mTOR-jelátvitel számos más aminosav – többek között az arginin – anyagcseréjének szabályozásában is kulcsfontosságú szerepet játszik [179].

A daganatsejteknek a fokozott proliferációhoz szükséges DNS-szintézis biztosításához nukleotidokra van szüksége. A nukleotidok *de novo* szintézise a pentóz-foszfát útvonalon keresztül történik, ami szintén az mTOR-jelút szabályozása alatt áll. Az mTORC1 fokozza a pentóz-foszfát út sebességmeghatározó enzimének, a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáznak az expresszióját, az mTORC2 pedig a szubsztrátot biztosítja ehhez a folyamathoz – a hexokináz 2 Akt-mediált foszforilációja és aktivációja révén növeli a glükóz-6-foszfát szintjét a sejtekben [179, 221].

Az mTOR-jelátvitel a zsírsavak felvételét és *de novo* szintézisét is elősegítheti. Az mTORC1 és az mTORC2 egyaránt fokozhatja az SREBP transzkripciós faktor expresszióját, ami számos zsírsav-szintézisben fontos enzim – mint például az ATP-citrát-liáz, az acetyl-CoA karboxiláz vagy a zsírsav-szintetáz (FASN) – és a CD36 zsírsav-transzporter expresszióját szabályozza [222-224]. A MYC egyrészt a fenti enzimek expressziójának szabályozásával befolyásolja a zsírsav-anyagcserét, másrészt fokozza a citrát-ciklus enzimeinek expresszióját is, így fokozódik a citrát képződése, ami prekursorként szolgálhat a zsírsavak *de novo* szintéziséhez [225, 226]. A zsírsav-szintézis inhibitorai közül jelenleg a FASN-gátlókkal (pl. TVB-2640) folynak klinikai vizsgálatok [227, 228]. Az acyl-CoA synthetase short-chain family member 2 (ACSS2) szintén fontos enzim a daganatok zsírsav-anyagcseréjében: egyrészt az exogén acetát acetyl-CoA-vá alakításával a lipid szintézisben lehet szerepe, másrészt az acetát citrát-ciklusban történő felhasználását, ezáltal ATP-termelését teheti lehetővé [229-231]. Az ACSS2 szerepét az epigenetikai szabályozásban is felvetették: a Ser659 oldallánc AMPK általi foszforilációja hatására az ACSS2 a sejtmagba transzlokálódik és részt vesz a hiszton-acetiláció folyamatában [232, 233]. Nemcsak a lipidszintézis, hanem a zsírsavak lebontása is kulcsfontosságú lehet a daganatok patobiológiájában. A zsírsavak mitokondriumban végbemenő  $\beta$ -oxiációja – amelynek sebességmeghatározó lépését a karnitin-palmitoil-transzferáz 1A (CPT1A) végzi – segítheti a daganatsejtek proliferációját, a rezisztencia kialakulását és az áttétképzést. A zsírsav oxidáció

legfontosabb szabályozója az AMPK, ami az acetyl-KoA karboxiláz inaktíváló foszforilációjával gátolja az acetyl-KoA  $\rightarrow$  malonil-KoA átalakulást, így a CPT1A inhibitoraként funkcionáló malonil-KoA csökkenő szintje a CPT1A-n keresztül a zsírsav-oxidáció következményes fokozódását eredményezi [234].



**5. ábra. A daganatsejtek metabolikus folyamatai.** Daganatsejtekben gyakran megfigyelhető az anabolikus folyamatok aktivitásának fokozódása, ami a sejtek proliferációjának bioszintetikus hátterét biztosítja. Fokozódik a glükóz és a glutamin felvétele, amelyek a citromsav-ciklusba jutva végül az oxidatív foszforiláció (OXPHOS) révén hasznosulhatnak. A másik lehetőség, hogy a felvett glükózt és glutamint a sejt aminosavak, lipidek szintézisére vagy a pentóz-foszfát út révén nukleotidok termelésére fordítja. A daganatsejtek laktátot, zsírsavakat vagy acetátot is felvehetnek és a citrát-ciklusba juttatva energiaforrásként hasznosíthatnak. Ezek a metabolitok elsősorban a környező katabolikus működésű sejtekből származhatnak. Forrás: [212] alapján.



## **1.7. A PI3K/Akt/mTOR jelátvitel zavarai tüdődaganatokban**

A PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonal szabályozási zavarai számos daganattípus, többek között a tüdődaganatok patogenezisében is fontos szerepet játszanak [173]. Az mTOR-jelút aberráns aktivációja több mechanizmus útján létrejöhet, beleértve a *PIK3CA*, a *PTEN*, az *STK11*, az *AKT*, a *TSC1*, a *TSC2*, a *RICTOR* és az *MTOR* gének, továbbá egyéb onkogének vagy tumorszuppresszorok mutációit [235, 236]. Mindemellett az mTOR-aktivitást más, az mTOR-jelútba kapcsolódó szignáltranszdukciós útvonalak zavarai is befolyásolhatják. Ilyen például az *EGFR* konstitutív aktivációt előidéző genetikai változásai vagy a *KRAS*-mutáció, amelyek gyakori eltérésként jelennek meg tüdőcarcinomákban [237, 238]. Az említett, mTOR-aktivációt befolyásoló eltérések terápiás lehetőséget jelenthetnek a daganatos betegségek kezelésében.

### **1.7.1. Az mTOR-jelút szabályozási zavarai nem-kissejtes tüdődaganatokban**

A PI3K/Akt/mTOR jelátvitel fokozott aktivitása gyakran megfigyelhető nem-kissejtes tüdődaganatokban (NSCLC): az adenocarcinomák 90%-ában, a laphámrákok 40%-ában és a nagysejtes carcinomák 60%-ában [239]. Az mTOR-jelút szabályozási zavarai fontos szerepet játszanak a tüdődaganatok kialakulásában és növekedésében, downstream effektorainak (p-eIF-4E, p-S6) overexpresszióját adenocarcinomákban és laphámrákokban egyaránt megfigyelték. Kimutatták továbbá a fokozott mTOR-aktiváció és a daganat invazivitása, áttétképzési hajlama, valamint a kedvezőtlen prognózis közötti kapcsolatot is [240-242].

A PI3K/Akt/mTOR jelátvitel szabályozási zavarai számos mechanizmus útján létrejöhetnek. Ilyen a PI3K tirozin-kináz receptorok általi aktivációja, különböző aktiváló genetikai eltérések a *PIK3CA*, *AKT* vagy *RICTOR* génekben, illetve a *PTEN* és *STK11* tumorszuppresszor gének elvesztése [175, 200, 243, 244]. A *PIK3CA* aktiváló mutációit a NSCLC-k 4-7%-ában figyelték meg, míg amplifikációja a laphámrákok 33%-ában, az adenocarcinomák 1%-ában volt jelen. A *RICTOR* amplifikációját a NSCLC-k 10%-ában figyelték meg. Az mTOR jelátvitel negatív szabályozójaként működő *PTEN* és *STK11* tumorszuppresszor gének elvesztése szintén gyakori eltérés NSCLC-kben. A *PTEN*-vesztést gyakran figyelték meg laphámrákokban, míg az *STK11*-vesztés inkább az adenocarcinomákra jellemző (3. táblázat) [243-245].

A *KRAS* mutációi a NSCLC-k 25-35%-ában vannak jelen, leggyakrabban az adenocarcinoma szubtypusban. Más, a RAS útvonalhoz kapcsolható, illetve annak aktivációját előidéző eltérések a NSCLC-k 25%-ában figyelhetők meg, ilyenek az *EGFR* (10-23%) és a *BRAF* (2%) mutációi [246]. Az aktivált *KRAS* a RAF/MEK/ERK és a PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonalakon keresztül elősegíti az malignus transzformációt, így ezen útvonalak gátlása eredményesnek ígérkezett a *KRAS*-mutáns daganatok kezelésében. A klinikai vizsgálatok azonban mindeddig nem igazolták az mTOR-gátló monoterápia hatékonyságát a *KRAS*-mutáns tüdődaganatok kezelésében [247].

### 1.7.2. Az mTOR-jelút szabályozási zavarai a tüdő neuroendokrin tumoraiban

A tüdő neuroendokrin daganatai közül az alacsony és közepes grádusú carcinoidok, valamint a magas grádusú carcinomák többnyire hasonló genetikai eltéréseket hordoznak, azonban eltérő előfordulási gyakorisággal. A carcinoidokkal szemben a PI3K/Akt/mTOR jelátvitel zavarai szignifikánsan gyakrabban jelennek meg a carcinomákban. Ezen felül a carcinomákban több kópiaszám-változással járó eltérést figyeltek meg, mint a carcinoidokban. Az mTORC2 egyik strukturális komponensét kódoló *RICTOR* amplifikációja – amely az egyik leggyakrabban amplifikált gén a tüdő neuroendokrin tumoraiban – szintén gyakrabban figyelhető meg a magasabb grádusú daganatokban [68].

A neuroendokrin eredetű tüdőtumorkok közül az SCLC-k fordulnak elő legnagyobb gyakorisággal, ezek az összes tüdődaganat 15-20%-át jelentik [70]. A sejtciklus szabályozásban fontos szerepet játszó *TP53* és *RBI* gének mutációin, illetve a *MYC* amplifikáción kívül a PI3K/Akt/mTOR jelút tagjait (pl. *PIK3CA*, *PTEN*, *AKT2*, *AKT3*, *MTOR* és *RICTOR*) érintő genetikai változások gyakran jelennek meg SCLC-kben (3. táblázat) [89, 248]. Ezek közül a *RICTOR*-amplifikáció a leggyakrabban előforduló célozható genetikai eltérés SCLC-kben, amelyet az esetek 6-14%-ában figyeltek meg [249, 250].

Az mTOR-jelút aktivációját immunhisztokémiai módszerekkel is igazolták SCLC-kben. A p-mTOR (az mTOR-kináz aktív formája) és a p-S6K (az mTORC1 downstream targetje) az esetek 55%-ában, illetve 84%-ában volt pozitív [251]. Az mTORC2 aktivitásáról és jelentőségéről ezzel szemben lényegesen kevesebb adat érhető el.

**3. táblázat. A PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonalat érintő genetikai eltérések a tüdődaganatok leggyakoribb típusaiban**

Gén	Fehérje	Az eltérés típusa	Az eltérés gyakorisága (%)			Források
			ADC*	SCC*	SCLC	
<i>PIK3CA</i>	PI3K p110 $\alpha$	Mutáció	5	7	3-6	[89, 248, 252]
		Kópiaszám többlet	1	33	2	
<i>PTEN</i>	Pten	Mutáció	2	21	2-6	[89, 252]
<i>STK11</i>	Lkb1	Mutáció	15	2	< 1	[89, 252]
<i>AKT1</i>	Akt1	Mutáció	< 1	1	2	[89, 252]
		Kópiaszám többlet	< 1	3	< 1	
<i>AKT2</i>	Akt2	Mutáció	1	1	1-4	[89, 248, 252]
		Kópiaszám többlet	1	6	9	
<i>AKT3</i>	Akt3	Mutáció	2	< 1	2-4	[89, 248, 252]
		Kópiaszám többlet	5	3	< 1	
<i>TSC1</i>	Hamartin	Mutáció	2	2	< 1	[89, 252]
<i>TSC2</i>	Tuberin	Mutáció	3	3	2	[89, 252]
<i>MTOR</i>	mTOR	Mutáció	5	4	2-8	[89, 248, 252]
		Kópiaszám többlet	< 1	< 1	< 1	
<i>RICTOR</i>	Rictor	Mutáció	3	3	2-3	[89, 248, 250, 252, 253]
		Kópiaszám többlet	8	10	6-14	

Rövidítések: ADC - adenocarcinoma, SCC - laphámsejtes carcinoma, SCLC - kissejtes tüdőrák.

\* A [www.cbioportal.org](http://www.cbioportal.org) (TCGA PanCancer Atlas) adatai alapján.

### 1.7.3. Az mTOR-jelút szabályozási zavarai lymphangioleiomyomatosisban

A lymphangioleiomyomatosis (LAM) alapvetően két formában jelenhet meg: ezek a sporadikus LAM (S-LAM), illetve a sclerosis tuberosa részjelenségét képező LAM (TSC-LAM). Mindkét formát a *TSC1/2* gének funkcióvesztő mutációja hozza létre, ami a LAM sejtek proliferációja, növekedése és inváziója révén a tüdőszövet károsodását eredményezi [129, 254, 255]. A *TSC1* és *TSC2* gének mutációjának analízise [256-258] mellett az mTORC1 fokozott aktivitását a downstream markerek (p-S6K, p-S6, p-4E-BP1) immunhisztokémiai vizsgálatával is igazolták [144, 256, 259], az mTORC2 aktivitásának vizsgálata azonban még nem történt meg LAM-ban.

## **1.8. Fejlesztés alatt álló mTOR-gátlók a tüdődaganatok kezelésében**

A PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonal gátlására az elmúlt években több mint 40 különböző szer fejlesztettek ki. Ezek közül számos a klinikai vizsgálatok különböző fázisaiba jutott, az FDA és az EMA által azonban csak néhány szer – az allosztérikus mTOR-gátló temsirolimus és everolimus, valamint a PI3K-gátló idelalisib és copanlisib – került elfogadásra különböző daganatok kezelésében [236]. Az előbbieken kívül az mTORC1-gátló sirolimust 2015-ben engedélyezték a LAM kezelésére [153].

Az mTOR-jelút legtöbb inhibitora monoterápiaként alkalmazva korlátozott terápiás hatást eredményezett a daganatok kezelésében. Ez a jelenség az mTORC1-gátlók esetén valószínűleg részben azzal magyarázható, hogy az inhibitor megszakítja az mTORC1/S6K1-mediált negatív visszacsatolást, így paradox módon a PI3K-on és az mTORC2-n keresztül az Akt aktivációjához vezet [191]. Az előzetes klinikai adatok azt mutatják, hogy az mTOR-jelátvitel gátlói kemoterápiás szerekkel vagy más, célzott terápiával kombinációban adva hatékonyabbnak bizonyulhatnak, mint monoterápiában. A kombinációk alkalmazása a hatékonyság fokozásán túl a szerzett rezisztencia leküzdésében is eredményes lehet [236].

### **1.8.1. mTORC1-gátlók**

Az mTORC1 allosztérikus inhibitorai közé tartozik a rapamycin (vagy más néven sirolimus), az everolimus, a temsirolimus és a ridaforolimus [260].

Az mTORC1-gátlók hatékonyságát széles körben vizsgálták a NSCLC-k terápiájában. A limitált monoterápiás hatékonyság miatt [261] a klinikai vizsgálatok az utóbbi időben inkább az mTORC1-gátlók más szerekkel való kombinációira fókuszálnak, amelyekkel jelenleg fázis I/II vizsgálatok folynak (4. táblázat).

Az mTORC1-gátlók kombinációk tagjaként neuroendokrin tüdődaganatokban is eredményesebbnek ígérkeznek. A *RADIANT-2* vizsgálat igazolta az everolimus plusz a szomatosztatin-analóg octreotid LAR hatékonyságát a progressziómentes túlélés növelésében alacsony és közepes grádusú neuroendokrin tüdődaganatokban [262, 263]. A *LUNA* fázis II vizsgálat pedig az everolimus és hosszú hatású pasireotid kombináció biztonságosságát és előzetes adatként annak terápiás hatékonyságát igazolta előrehaladott tüdőcarcinoidban szenvedő betegek esetén [264]. Az intravénásan alkalmazott, nanorészecske formában albuminhoz kötött rapamycinnel (nab-rapamycin) – amely a per

os adagolásnál jobb biohasznosulási tulajdonságokkal bír – jelenleg fázis II vizsgálatok folynak neuroendokrin tüdődaganatban szenvedő betegek bevonásával (4. táblázat). Az everolimust és a temsirolimust egyaránt vizsgálták az SCLC-k kezelésében, azonban monoterápia formájában mindkét szer hatástalannak bizonyult a vizsgált, biomarkerek alapján nem szelektált betegcsoportokban [265, 266].

A sirolimus és az everolimus hatékonyságát LAM-ban több klinikai vizsgálat igazolta [154, 155, 267, 268]. Elsősorban a *MILES* vizsgálat [154] adatai alapján a sirolimust engedélyezték a LAM kezelésére [153, 156]. Jelenleg az alacsony dózisu sirolimus, valamint a sirolimus plusz resveratrol kombináció hatékonyságát vizsgálják LAM-ban (4. táblázat) [269, 270].

### 1.8.2. mTORC1/2-gátlók

Az mTOR-kináz ATP-kompetitív (katalitikus) inhibitorai az mTORC1-et és az mTORC2-t egyaránt hatékonyan gátolják, így a PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonal aktivitását jelentős mértékben csökkentik. További előnyük, hogy az Akt aktivációját eredményező negatív visszacsatolási kört is blokkolják, szemben az mTORC1-gátlókkal [191, 236].

A vistusertib hatékonyságát kissejtes és nem-kissejtes tüdődaganatokban fázis I és II vizsgálatokban is elemzik. Ezek közül néhány fázis II vizsgálatban a betegek mTORC1 és/vagy mTORC2 hiperaktivációt eredményező genetikai eltérések jelenléte alapján kerülnek beválogatásra, hiszen ezekben a betegpopulációkban fokozott hatékonyságot várnak a kezeléstől. Egy fázis I vizsgálatban a vistusertib terápiát paclitaxellel kombinálva hatékonyan találták a tüdő laphámcarcinomáinak kezelésében [271], illetve további vizsgálatok folynak más kombinációkkal is (pl. selumetinib, navitoclax és durvalumab). A kombinációs terápia a feltételezések szerint előnyös lehet a szerzett rezisztencia leküzdésében és növelheti a hatékonyságot.

A sapanisertib egy másik mTORC1/2-inhibitor, ami szintén ígéretes eredményeket mutatott különböző szolid tumorok kezelésében egy fázis I vizsgálatban [272], továbbá hatékonyságát jelenleg is több klinikai vizsgálatban elemzik mind monoterápia, mind különböző kombinációk (pl. sapanisertib és osimertinib) formájában NSCLC-ben. (4. táblázat).

#### 4. táblázat. Folyamatban levő klinikai vizsgálatok a PI3K/Akt/mTOR jelút inhibitoraival tüdődaganatokban

Inhibitor csoport	Hatóanyag	Célpont	Kombinációban alkalmazott hatóanyag	Biomarker-alapú szelekció (a PI3K/Akt/mTOR jelút inhibitorai szempontjából)	Daganattípus	Fázis	ClinicalTrials.gov azonosító	
<b>mTORC1-gátlók</b>	Sirolimus	mTORC1	Nincs	Nem	LAM	III	NCT03150914	
	Sirolimus	mTORC1	Resveratrol	Nem	LAM	II	NCT03253913	
	Sirolimus	mTORC1	Auranofin	Nem	NSCLC, SCLC	I/II	NCT01737502	
	Sirolimus	mTORC1	Epacadostat	Nem	NSCLC	I	NCT03217669	
	Everolimus	mTORC1	Pasireotide LAR	Nem	Tüdő NET	II	NCT01563354	
	Everolimus	mTORC1	Ceritinib	Nem	NSCLC	I	NCT02321501	
	ABI-009	mTORC1	Nincs	Nem	Tüdő NET	II	NCT03670030	
	Vistusertib	mTORC1 és mTORC2	Nincs	Igen (nem meghatározott)	NSCLC	II	NCT02664935	
	Vistusertib	mTORC1 és mTORC2	Nincs	Igen (nem meghatározott)	NSCLC	II	NCT02117167	
	Vistusertib	mTORC1 és mTORC2	Durvalumab	Nem	NSCLC	II	NCT03334617	
<b>mTORC1/2-gátlók</b>	Vistusertib	mTORC1 és mTORC2	Selumetinib	Nem	NSCLC	I/II	NCT02583542	
	Vistusertib	mTORC1 és mTORC2	Navitoclax	Nem	SCLC	I/II	NCT03366103	
	Sapanisertib	mTORC1 és mTORC2	Nincs	Nem	NSCLC	I	NCT02417701	
	Sapanisertib	mTORC1 és mTORC2	Osimertinib	Nem	NSCLC	II	NCT02503722	
	Gedatolisib	IA osztályú PI3K-ok, mTORC1 és mTORC2	Paclitaxel és carboplatin	IHC-val detektált PTEN-vesztés, a PI3K aktíváló vagy a PTEN inaktíváló mutáció	NSCLC	I/II	NCT02920450	
	Gedatolisib	IA osztályú PI3K-ok, mTORC1 és mTORC2	Palbociclib	PIK3CA mutáció, PIK3CA kópiaszám-növekedés vagy PTEN-vesztés	SCC	I	NCT03065062	
	<b>PI3K-gátlók</b>	LY303414	IA osztályú PI3K-ok, mTORC1 és mTORC2	Abemaciclib	Nem	NSCLC	I	NCT02079636
		Taselisib	PI3K $\alpha$ izoforma	Nincs	PIK3CA mutáció RAS mutáció nélkül vagy PTEN-vesztés	Tüdőrák	II	NCT02465060
		Alpelisib	PI3K $\alpha$ izoforma	Nincs	PIK3CA genetikai változásai	NSCLC	II	NCT02276027
		Serabelisib	PI3K $\alpha$ izoforma	Canagliflozin	PIK3CA vagy KRAS mutáció	Tüdőrák	I/II	NCT04073680
GSK2636771		PI3K $\beta$ izoforma	Nincs	PTEN mutáció vagy deléción	Tüdőrák	II	NCT02465060	
Idelalisib		PI3K $\delta$ izoforma	Pembrolizumab	Nem	NSCLC	I/II	NCT03257722	
IPI-549		PI3K $\gamma$ izoforma	Nivolumab	Nem	NSCLC	I	NCT02637531	
Copanlisib		IA osztályú PI3K-ok (PI3K $\alpha$ / $\beta$ / $\delta$ / $\gamma$ )	Nincs	PIK3CA mutáció, PTEN-vesztés vagy mutáció	Tüdőrák	II	NCT02465060	
Copanlisib		IA osztályú PI3K-ok (PI3K $\alpha$ / $\beta$ / $\delta$ / $\gamma$ )	Nivolumab	Nem	NSCLC	I/II	NCT03735628	
Buparlisib		IA osztályú PI3K-ok (PI3K $\alpha$ / $\beta$ / $\delta$ / $\gamma$ )	Gefitinib	EGFR mutáció, PI3KCA mutáció, PTEN-vesztés	NSCLC	I	NCT01570296	
<b>Akt-gátlók</b>	Capivasertib	Akt1, Akt2 és Akt3	Nincs	Igen (nem meghatározott)	NSCLC	II	NCT02664935	
	Capivasertib	Akt1, Akt2 és Akt3	Nincs	Igen (nem meghatározott)	NSCLC	II	NCT02117167	
	Capivasertib	Akt1, Akt2 és Akt3	Nincs	AKT mutáció	Tüdőrák	II	NCT02465060	
	Ipatasertib	Akt1, Akt2 és Akt3	Nincs	AKT mutáció	Tüdőrák	II	NCT02465060	
	Ipatasertib	Akt1, Akt2 és Akt3	Atezolizumab	Nem	NSCLC	I/II	NCT03337698	
	MK-2206	Akt1, Akt2 és Akt3	Erlotinib vagy selumetinib	Nem	NSCLC	II	NCT01248247	
	<b>Rövidítések:</b> Akt - protein-kináz B, EGFR - epidermális növekedési faktor receptor, KRAS - Kirsten rat sarcoma 2 vírus onkogén homológ, LAM - lymphangioleiomyomatosis, mTORC1 - mammalian target of rapamycin komplex 1, mTORC2 - mammalian target of rapamycin komplex 2, NET - neuroendocin tumor, NSCLC - nem-kissejtes tüdőrák, PI3K - foszfátillinozil-3-kináz, PIK3CA - foszfátillinozil-3-kináz katalitikus alegység, PTEN - foszfátáz és tenzin homológ, SCC - tüdő laphámsejtes carcinoma, SCLC - kissejtes tüdőrák.							
	Az adatgyűjtés dátuma: 2019. október 9. (www.clinicaltrials.org)							

Az mTORC1/2-gátlók hatékonyságáról LAM-ban egyelőre nincs adat, azonban egy közelmúltban megjelent preklinikai vizsgálat a vistusertib hatékonyságát igazolta az epitheliális-mesenchymális tranzíció és a tumorprogresszió gátlásában a TSC-asszociált daganatok állatmodelljében [273].

### 1.8.3. Az mTOR jelátviteli útvonal egyéb inhibitorai

A PI3K/Akt/mTOR jelút további inhibitorai az alábbi csoportokba sorolhatók: kettős (dual) PI3K/mTOR-gátlók, pan-PI3K-inhibitorok, izoforma-specifikus PI3K-inhibitorok, valamint Akt-gátlók [200, 236]. Ezek közül számos szer biztonságosságát és hatékonyságát fázis I és II vizsgálatokban elemzik.

A kettős PI3K/mTOR-inhibitorok (pl. gedatolisib) hatékonyan gátolják a PI3K/Akt/mTOR jelátvitel egészét, ugyanakkor éppen ebből következően a toxicitás esélye is nagyobb. A gedatolisibet jelenleg kemoterápiás szerekekkel és célzott terápiával (pl. a CDK4/6-gátló palbociclibbel) kombinációban is vizsgálják elsősorban NSCLC-ben szenvedő betegekben, akiknél *PTEN* funkcióvesztő vagy a *PIK3CA* aktiváló mutáció van jelen (4. táblázat).

Az pan-PI3K-gátlók az IA osztályú PI3K-ok mindegyikét gátolják bizonyos mértékben, míg az izoforma-specifikus PI3K-gátlók csak a PI3K $\alpha$ , PI3K $\beta$ , PI3K $\gamma$  vagy PI3K $\delta$  izoformák valamelyikére specifikusak. A PI3K-inhibitorokat széles körben vizsgálják fázis I és II vizsgálatokban, néhányat szelektált betegpopulációkban, ahol a beválasztás alapja a *PTEN*-vesztés vagy a *PIK3CA* genetikai aberrációjának jelenléte (4. táblázat). A közelmúltban sajnos a taselisib PI3K $\alpha$  izoformára specifikus inhibitor egy biomarker alapú vizsgálatban (Lung-MAP) nem érte el az elsődleges végpontot a *PIK3CA* genetikai eltéréseit hordozó tüdő laphámcarcinomákban [274]. A terápiás paletta szélesedése és a *BASALT* vizsgálatokban megfigyelt problémás biztonságossági profil miatt a buparlisib további fejlesztése és vizsgálata sem várható tüdődaganatokban [275, 276].

Az Akt-gátlók a PI3K/Akt/mTOR jelút downstream útvonalát gátolják [236]. Míg az *AKT1*, *AKT2* és *AKT3* genetikai eltérései viszonylag ritkák tüdődaganatokban (3. táblázat), addig a p-Akt overexpresszióját gyakran megfigyelték [277-279]. Az Akt-inhibitorok potenciális hátránya viszont, hogy a PI3K Akt-hoz nem köthető effektorait nem gátolják, így egy negatív visszacsatolási kör révén ezen effektorok PI3K-dependens

aktivációját idézhetik elő [200]. Preklinikai vizsgálatok igazolták, hogy az Akt-nak fontos szerepe lehet az EGFR-gátlókkal szembeni rezisztencia kialakításában [280, 281]. Ezen megfigyelés alapján az Akt-gátló MK-2206 és az EGFR-gátló erlotinib kombinációját vizsgálták, azonban az elsődleges végpontot csak *EGFR*-vad NSCLC-ben sikerült elérni [282]. A további Akt-inhibitorok hatékonyságáról tüdődaganatokban kevés adat érhető el, azonban több fázis II vizsgálat is folyamatban van, amelyek közül kettőben a betegek beválasztása az *AKT*-mutáció jelenlétén alapul (4. táblázat).

#### **1.8.4. A biomarker-alapú betegszelekció jelentősége a tüdődaganatok mTOR-gátló terápiájában**

Annak ellenére, hogy a PI3K/Akt/mTOR jelút inhibitoraival számos klinikai vizsgálatot folytattak, csupán néhány hatóanyag került elfogadásra különböző daganatok kezelésében. Az egyik legfontosabb ok az mTOR-gátlók klinikai transzlációjának elmaradásában a megbízható prediktív biomarkerek hiánya lehet.

A potenciális biomarkerek, amelyek előjelezhetik az mTOR-gátlókkal szembeni érzékenységet egyrészt genetikai eltérések (pl. *PIK3CA*-mutáció vagy -amplifikáció, a *PTEN* funkcióvesztő mutációja vagy *RICTOR*-amplifikáció), másrészt fehérje biomarkerek (pl. a p-S6 vagy a p-Akt overexpressziója) lehetnek [236, 283].

Preklinikai vizsgálatok igazolták a *PIK3CA*-mutáció prediktív értékét, azonban a klinikai vizsgálatok ellentmondásosak voltak ebben a kérdésben [274, 284-286]. Az mTOR-jelátvitelt érintő genetikai eltérések (pl. *MTOR*, *TSC1*, *TSC2* és *PIK3CA*) jelenlétét vizsgálva különböző szolid daganatokban kimutatták, hogy a jelutat érintő aberrációk a tumorok 45%-ában jelen vannak és az everolimussal szemben fokozott érzékenységet biztosítanak [287]. Néhány potenciális biomarkerrel kapcsolatban – mint például az *AKT*-mutáció vagy a *RICTOR*-amplifikáció – a vizsgálatok jelenleg is folynak [236, 288]. Egy közelmúltban megjelent tanulmány az *AKT1* E17K mutációjának prediktív szerepére hívta fel a figyelmet a szolid tumorok capivasertib kezelésében, viszont a megfigyelt válaszadási arány alacsonyabb volt, mint más célzott terápiák esetén (pl. EGFR, ALK, ROS1 és BRAF) [288]. A *RICTOR*-amplifikáció prediktív szerepe szintén felmerült SCLC és tüdő laphámcarcinoma sejtvonalakon végzett *in vitro* vizsgálatok alapján [250, 289], azonban ennek klinikai hasznosíthatósága még nem igazolódott.



A fehérje biomarkerek prediktív szerepét a PI3K/Akt/mTOR jelút inhibitoraira adott válasz előrejelzésében csupán néhány tanulmány vizsgálta [283]. A magas p-Akt-expresszió és a magas p-S6/összes S6 arány prediktív értékét az everolimus terápiával szemben mutatott szenzitivitás tekintetében már leírták [290]. A PI3K-gátló pictilisibre adott válasz *in vitro* vizsgálatokban korrelált a magas p-4E-BP1- és p-Akt-expresszióval [291], továbbá az Akt hiperaktivációjának markerei (pl. a magas p-Akt-expresszió) egy preklinikai vizsgálat során korreláltak az ipatasertib-szenzitivitással [292].

Összefoglalva, a PI3K/Akt/mTOR jelút számos inhibitora áll fejlesztés és klinikai vizsgálat alatt, azonban napjainkig csupán néhány gátlószer került elfogadásra a daganatok terápiájában. Annak érdekében, hogy ezt a számot növelni tudjuk és egyre több mTOR-gátló klinikai transzlációja bekövetkezhesen, elengedhetetlen, hogy prediktív markereket azonosítsunk, amelyek segítik a terápiás döntést. A biomarker-alapú betegszelekción túl fontos a minél hatékonyabb és emellett jó biztonságossági profillal rendelkező szerek és adagolási módok kifejlesztése, továbbá racionális kombinációk alkalmazása, amelyek eredményesek lehetnek a primer vagy szerzett rezisztencia leküzdésében.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Az mTOR jelátviteli útvonal szabályozási zavarai gyakran megfigyelhetők humán daganatokban, beleértve a tüdőtumorsejteket. Ennek ellenére az mTORC1-gátló rapalogok nem váltották be maradéktalanul a hozzájuk fűzött reményeket, csupán néhány entitásban (pl. LAM) kerültek fel a standard terápia palettára. A hatékonyság növelése, valamint az újgenerációs mTOR-gátlók klinikai transzlációjának elősegítése érdekében fontos az mTOR-aktivitás karakterizálása és potenciális prediktív markerek azonosítása. Ennek megfelelően vizsgálataink célja az volt, hogy különböző tüdődaganatokban vizsgáljuk az mTORC1/2-aktivitást és az ehhez kapcsolódó metabolikus változásokat az alábbiak szerint:

1. Az mTORC1- és mTORC2-aktivitás immunhisztokémiai vizsgálata és a klinikopatológiai adatokkal való összefüggések elemzése primer és agyi metasztatikus tüdő adenocarcinomákban.
2. A *RICTOR*-amplifikáció és az mTORC2-aktivitás vizsgálata kissejtes tüdődaganatokban:
  - A *RICTOR*-amplifikáció előfordulásának, valamint a Rictor és p(Ser473)-Akt expressziójának vizsgálata humán kissejtes tüdődaganatokban, az eredmények összevetése a klinikai és túlélési adatokkal.
  - A PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonal különböző inhibitorainak hatása *RICTOR*-amplifikált, illetve egyéb, mTOR-jelátvitelt érintő genetikai eltéréseket hordozó humán kissejtes tüdőrák sejtvonalak proliferációjára *in vitro*.
3. Az mTORC1- és mTORC2-aktivitás, valamint ehhez kapcsolódóan metabolikus kulcsenzimek expressziójának, valamint a klinikopatológiai adatok összefüggéseinek vizsgálata lymphangiomiomatosisban.

### 3. MÓDSZEREK

#### 3.1. Vizsgált betegek

##### 3.1.1. Adenocarcinoma (ADC) kohorsz

Munkánk során primer tüdő adenocarcinomákat (N = 67) és tüdő adenocarcinómák agyi áttéteit (N = 67) vizsgáltuk. A minták között 15 ugyanazon betegből származó primer tumor-agyi metasztázis pár is volt. A primer adenocarcinómák műtéti eltávolítását az Országos Korányi Pulmonológiai Intézetben (Budapest) és a Bajcsy-Zsilinszky Kórházban (Budapest), az agyi áttétek eltávolítását az Országos Klinikai Idegtudományi Intézetben (Budapest) végezték 2003 januárja és 2011 decembere között. Az archivált szövetblokkok felhasználása az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának 510/2013 és 86/2015 számú engedélyei alapján történt.

A minták szövettani klasszifikációjának ellenőrzését és esetleges reklaszifikációját a 2015. évi WHO beosztás alapján végeztük [7]. A dokumentáció alapján a klinikopatológiai adatok közül az alábbiakat volt lehetőségünk összegyűjteni: életkor, nem, stádium, dohányzási anamnézis, az agyi áttétek mérete és száma.

##### 3.1.2. Kissejtes tüdőrák (SCLC) kohorsz

Kissejtes tüdődaganatokkal kapcsolatos vizsgálataink során 92 beteghez tartozó 100 archivált mintát (80 sejtblokkot, 4 transzbronchiális biopszia mintát és 16 műtéti reszekátumot) elemeztünk (5. táblázat). A műtetre vagy mintavételre 2018. augusztus 1-je és 2018. április 30-a között került sor a floridai Mayo Klinikán (Jacksonville, USA). A vizsgálatot a Mayo Klinika kutatósetikai bizottsága engedélyezte (IRB#: 18-001887). A szövettani besorolás a 2015. évi WHO klasszifikáció alapján történt, a diagnózist a legtöbb esetben citokeratin AE1/AE3, TTF-1, synaptophysin és chromogranin A immunhisztokémiai vizsgálatok támasztották alá. A mintavétel előtt egy beteg sem kapott kemoterápiás kezelést. A vizsgálatba csak a metszetenként több mint 500 daganatsejtet tartalmazó mintákat vontunk be.

**5. táblázat. A vizsgált SCLC betegek és minták klinikopatológiai adatai <sup>a</sup>**

	<b>Betegek (N=92)</b>	<b>Minták (N=100)</b>
<b>Életkor (év)</b>		
<65	29 (32)	
≥65	63 (68)	
<b>Nem</b>		
Férfi	54 (59)	
Nő	38 (41)	
<b>Tumor</b>		
Primer tumor		30 (30)
Nyirokcsomó áttét		52 (52)
Távoli áttét		18 (18)
<b>Mintavételi eljárás</b>		
Vékonytű aspiráció (sejtblokk)		75 (75)
Kefebiopszia (sejtblokk)		4 (4)
Thoracocentesis (sejtblokk)		1 (1)
Transzbronchiális biopszia		4 (4)
Ékreszekció		3 (3)
Lobectomy		7 (7)
Távoli áttét excíziós biopsziája		6 (6)

<sup>a</sup> Az számértékek az esetszámot jelzik (%).

### 3.1.3. Lymphangioliomyomatosis (LAM) kohorsz

Összesen 11 S-LAM beteg műtéileg eltávolított, formalin-fixált paraffinba ágyazott tüdőszövet mintáját vizsgáltuk, ezek közül 7 esetben a minta explantált tüdőből, 4 esetben diagnosztikus célú mintavételből származott. A műtétekre 2004. január 1-je és 2016. december 31-e között került sor a floridai Mayo Klinikán (Jacksonville, USA). A vizsgálatot a Mayo Klinika kutatásetikai bizottsága engedélyezte (IRB#: 15-000406). A LAM diagnózisa a jellemző klinikai tüneteken, valamint a radiológiai és szövettani jellegzetességeken alapult, továbbá simaizom aktin (SMA), HMB-45 és  $\beta$ -catenin immunreakciókkal került megerősítésre. A klinikopatológiai adatokat a 6. táblázat tartalmazza. Két beteg (a 6. és 8. számú) hormonterápiában részesült, azonban egy beteg sem kapott mTOR-gátló kezelést a műtéti beavatkozás előtt.

**6. táblázat. A vizsgált LAM betegek klinikopatológiai jellemzői**

Beteg	Életkor (évek)	Dx-Bx idő (évek)	Műtét típusa	Nyirokcsomó áttét	Dohányzás	VEGF-D (pg/ml)	Műtét előtti kezelés	
							Hormonterápia	mTOR-gátló
1	59	0	Ékreszekció (VATS)	N. A.	Soha	N. A.	Nem	Nem
2	39	1	BLT	Igen	Korábban	N. A.	Nem	Nem
3	41	1	BLT	Nem	Korábban	N. A.	Nem	Nem
4	35	5	BLT	Nem	Soha	N. A.	Nem	Nem
5	37	5	BLT	Igen	Korábban	N. A.	Nem	Nem
6	39	3	BLT	Igen	Soha	N. A.	Igen	Nem
7	58	2	BLT	Igen	Soha	N. A.	Nem	Nem
8	49	11	BLT	Nem	Korábban	N. A.	Igen	Nem
9	34	0	Ciszta kimetszése	N. A.	Soha	N. A.	Nem	Nem
10	43	0	Ékreszekció (VATS)	N. A.	Soha	385	Nem	Nem
11	32	0	Ékreszekció (VATS)	N. A.	Soha	8888	Nem	Nem

Rövidítések: BLT – bilaterális tüdőtranszplantáció, Bx – biopszia, Dx – diagnózis, mTOR – mammalian target of rapamycin, N. A. – nincs adat, VATS - videoasszisztált thoracoscopos sebészet, VEGF-D – vaszkuláris endotheliális növekedési faktor D.

**3.2. Szöveti multiblokkok készítése az adenocarcinoma mintákból**

A vizsgált tüdő adenocarcinoma mintákból (ADC kohorsz) szöveti multiblokkokat (TMA) készítettünk TMA Master (3DHitech, Budapest, Magyarország) használatával. A paraffinos blokkokból a H&E metszetek alapján kiválasztott reprezentatív területekről – a minta méretének és tumorsejt-tartalmának függvényében – 2-3 db 2 mm átmérőjű szövethengert szúrtunk ki és gyűjtöttünk a recipiens blokkokba, amelyek így összesen 70 szövethengert tartalmaztak 7×10-es elosztásban. Az orientáció biztosítása érdekében az A1 pozícióba májszövet részlete került. A májszöveten kívül normál szöveti kontrollként vese, tonsilla és peritumorális tüdőszövet mintákat helyeztünk a TMA blokkokba.

**3.3. Az mTOR- és metabolikus markerek immunhisztokémiai vizsgálata**

Az immunhisztokémiai reakciókat a formalinban fixált, paraffinba ágyazott minták és TMA blokkok 4 µm vastagságú metszetein végeztük. A deparaffinálást követően az endogén-peroxidázokat perjódsav (0,01%, 10 perc) és Na-borohydrid (0,01%, 10 perc), majd 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t tartalmazó metanol 20 perces alkalmazásával is blokkoltuk. Ezt

követően az antigénfeltárást elektromos kuktában 105 °C 30 percig végeztük az ellenanyagtól függően citrát (pH=6), TRS (Target Retrieval Solution, pH=6,1; Dako, Glostrup, Dánia) vagy 0,1 M-os tris-hidroximetil-aminometánt (Tris) és 0,01 M-os etiléndiamin-tetraecetsavat (EDTA) tartalmazó (pH=9) pufferoldatban, majd a blokkolást (3%-os lószérum; Merck-Sigma Aldrich, Darmstadt, Németország) követően a mintákat az elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk (ld. 7. táblázat). Novolink Polymer (Leica Biosystems, Wetzlar, Németország), illetve Vectastain Universal Elite ABC HRP Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) másodlagos detektáló rendszereket alkalmaztunk, majd a reakciót 3,3'-diaminobenzidinnel (DAB; Aligent, Santa Clara, CA, USA) hívtuk elő. Magfestésként hematoxilint használtunk.

Az ösztrogén- és progeszteron-receptor (ER $\alpha$ , PR) immunreakciókat Cell Conditioning 1 (CC1, pH=8,5; Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) feltárással mellett Ventana Benchmark automatával (Ventana Medical Systems) és Ultraview (Ventana Medical Systems) detektálással végeztük.

### 7. táblázat. A vizsgálatokhoz használt immunhisztokémiai festések paraméterei

Antitest	Hígítás	Antigén feltárási	Funkció, jelentőség	Katalógusszám (klón)	Gyártó	Vizsgálat ADC SCLC LAM		
Anti-phospho(Ser2448)-mTOR	1:100	Citrát (pH=6)	mTOR aktív formája	#2976 (49F9)	Cell Signaling	✓	-	-
Anti-phospho(Ser235/236)-S6	1:100	Citrát (pH=6)	mTORC1-aktivitás	#2211	Cell Signaling	✓	-	✓
Anti-Rictor	1:1000	Citrát (pH=6)	mTORC2 mennyisége	A500-002A (1G3P2C9)	Bethyl	✓	✓	✓
Anti-phospho(Ser473)-Akt	1:100	Citrát (pH=6)	mTORC2-aktivitás	#4060 (D9E)	Cell Signaling	-	✓	-
Anti-GluT1	1:400	Citrát (pH=6)	Glükóz-felvétel	ab652	Abcam	-	-	✓
Anti-GAPDH	1:600	Citrát (pH=6)	Glikolízis	ab8245 (6C5)	Abcam	-	-	✓
Anti-GLS	1:200	Citrát (pH=6)	Glutaminolízis	ab156876 (EP7212)	Abcam	-	-	✓
Anti-MCT1	1:100	Citrát (pH=6)	Laktát- és acetát-felvétel	A304-358A	Bethyl	-	-	✓
Anti-ACSS2	1:200	Citrát (pH=6)	Acetát-hasznosítás	#3658 (D19C6)	Cell Signaling	-	-	✓
Anti-CPT1A	1:500	Citrát (pH=6)	Zsírsvak $\beta$ -oxidációja	ab128568 (8F6AE9)	Abcam	-	-	✓
Anti-ATPB	1:100	Citrát (pH=6)	Oxidatív foszforiláció	ab14730 (3D5)	Abcam	-	-	✓
Anti- $\beta$ -catenin	1:100	Tris-EDTA (pH=9)	LAM-marker	PA0083 (17C2)	Novocastra	-	-	✓
Anti-HMB-45	Előhígított	TRS (pH=6,1)	LAM-marker	GA052 (HMB45)	Dako	-	-	✓
Anti-SMA	1:400	Citrát (pH=6)	LAM-marker	M0851 (1A4)	Dako	-	-	✓
Anti-ER $\alpha$	Előhígított	CC1 (pH=(8,5)	Ösztrogén-receptor státusz	#790-4324 (SP1)	Ventana	-	-	✓
Anti-PR	Előhígított	CC1 (pH=(8,5)	Progeszteron-receptor státusz	#790-2223 (1E2)	Ventana	-	-	✓

**Rövidítések:** ACSS2 - acyl-coenzyme A synthetase short-chain family member 2, ADC - adenocarcinoma, Akt - protein-kináz B, ATPB -  $\beta$ -F1-ATP-áz, CC1 - cell conditioning 1, CPT1A - karnitin-palmitoiltranszferáz 1A, ER $\alpha$  - ösztrogén receptor  $\alpha$ , GAPDH - gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz, GLS - glutamináz, GluT1 - glükóz transzporter 1, HMB-45 - homatropin metilbromid 45, LAM - lymphangioleiomyomatosis, MCT1 - monokarboxilát-transzporter 1, mTOR - mammalian target of rapamycin, mTORC - mammalian target of rapamycin komplex, PR - progeszteron receptor, p-S6 - foszforilált riboszomális S6 fehérje, Rictor - rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin, SCLC - kissejtes tüdőrák, SMA - simaizom aktin, TRS - target retrieval solution.

#### 3.3.1. Az ADC minták immunhisztokémiai értékelése

A p-mTOR, p-S6 és Rictor immunhisztokémiai festések szemikvantitatív értékelése során a 0-300-ig terjedő H-score-t használtuk, amely az festődés intenzitásának (0 - 3+) és az

adott intenzitással festődő tumorsejtek százalékos arányainak szorzataként adható meg az alábbi képlet alapján:

$$\begin{aligned} \text{H-score} = & 1 \times (1+ \text{intenzitással festődő sejtek \% -a}) + \\ & 2 \times (2+ \text{intenzitással festődő sejtek \% -a}) + \\ & 3 \times (3+ \text{intenzitással festődő sejtek \% -a}). \end{aligned}$$

A pontszámok meghatározását két vizsgáló végezte egymástól függetlenül. A végső H-score értéket az ugyanazon esethez tartozó TMA core-ok H-score értékeinek átlagolásával kaptuk. A cut-off értékeket a medián H-score értékek alapján állapítottuk meg ellenanyagokként. A medián alatti értékeket *alacsony*, míg a mediánnal megegyező vagy afeletti H-score értékeket *magas* expresszióknak tekintettük. Az így meghatározott cut-off értékek szerint magas expressziót állapítottunk meg H-score  $\geq 110$  p-mTOR-expresszió, H-score  $\geq 115$  p-S6-expresszió, illetve H-score  $\geq 60$  Rictor-expresszió esetén.

### 3.3.2. Az SCLC minták immunhisztokémiai értékelése

A Rictor és p-Akt immunhisztokémiai reakciók értékelésénél az IHC előszűrési módszerként való alkalmazásának vizsgálata is célunk volt, ezért az értékelésnél nem a korábban ismertetett H-score-t, hanem egy egyszerűbb, csak a pozitív sejtek %-os arányának meghatározásán alapuló módszert alkalmaztunk. Az ún. hot-spotokra (erősebb intenzitással festődő területek) fókuszáltunk, legalább 500 daganatsejt figyelembevételével. A cut-off értékeket ellenanyagokként az átlagos expresszióhoz, valamint a *RICTOR*-amplifikáció gyakoriságát alapul véve a 15. és 85. percentilishez igazítottuk a 8. táblázat szerint.

### 8. táblázat. Az SCLC minták értékelése során használt cut-off értékek

	Nincs expresszió	Alacsony expresszió	Közepes expresszió	Magas expresszió
<b>Rictor</b>	pozitív sejtek < 5%	5% < pozitív sejtek < 20%	20% < pozitív sejtek < 50%	pozitív sejtek > 50%
<b>p-Akt</b>	pozitív sejtek < 5%	5% < pozitív sejtek < 35%	35% < pozitív sejtek < 70%	pozitív sejtek > 70%
<b>Szenzitivitás/specificitás vizsgálatok</b>	Negatív	Negatív	Pozitív	Pozitív

A *RICTOR*-amplifikációval összevetve az immunhisztokémia szenzitivitását és specificitását is vizsgáltuk az előszűrő módszerként való alkalmazás megállapítására,

amely vizsgálathoz a fenti kategóriákat *negatív* (nincs/alacsony expresszió), illetve *pozitív* (közepes/magas expresszió) csoportokba soroltuk (8. táblázat).

### 3.3.3. A LAM minták immunhisztokémiai értékelése

A LAM minták esetén a legalább 100 LAM-sejtet tartalmazó LAM-nodulusokban értékeltük az immunreakciókat. Ezt ismert prekursor sejtek hiányában kontrollként a normál bronchiális simaizomsejtekben (BSM) megfigyelt expresszióval hasonlítottuk össze, aminek alapját a LAM-sejtek simaizom eredetét felvető hipotézis, illetve a BSM- és LAM-sejtekben egyaránt megfigyelt erős SMA-pozitivitás képezte.

Az mTOR jelátviteli útvonal (p-S6, Rictor) és különböző metabolikus folyamatok (GluT1, GAPDH, GLS, MCT1, ACSS2, CPT1A, ATPB) markereinek expresszióját a fentiekben ismertetett H-score szerint értékeltük, és az alábbi csoportokat hoztuk létre: *negatív* – H-score  $\leq 10$ , *alacsony expresszió* – H-score 11-100, *magas expresszió* – H-score  $> 100$ .

Az SMA, HMB-45 és  $\beta$ -catenin immunreakciónál csak a pozitivitás jelenlétét vagy hiányát értékeltük, míg az ER $\alpha$  és PR immunfestéseknél a pozitív sejtek százalékos arányát adtuk meg.

### 3.4. RICTOR-amplifikáció vizsgálata fluoreszcens *in situ* hibridizációval

A paraffinba ágyazott SCLC minták, illetve az SCLC sejtvonalakból készült sejtblokkok 4  $\mu$ m vastag metszetein végeztük a *RICTOR* fluoreszcens *in situ* hibridizációt (FISH). A deparaffinálást követően az előkezelést 79°C-on 25 percig (Vysis IntelliFISH Pretreatment SSC Solution; Abbott Molecular, Abbott Park, IL, USA), majd a proteáz emésztést 38°C-on 25 percig (Vysis IntelliFISH Protease; Abbott Molecular) végeztük. A *RICTOR* (#RICTOR-20-OR; Empire Genomics, Williamsville, NY, USA) és az 5. kromoszóma (*Chr5*) kontroll (#CHR05-10-GR; Empire Genomics) próbákat a hibridizációs pufferhez (Vysis IntelliFISH Hybridization Buffer; Abbott Molecular) hozzáadva 37°C-on 2 órán keresztül hibridizáltunk, majd a mintákat 73°C-on 3 percig mostuk (Vysis IntelliFISH Post-Hybridization Buffer; Abbott Molecular), szárítottuk, végül DAPI I (Abbott Molecular) háttérfestést alkalmaztunk.



A reprezentatív területek kiválasztása a H&E metszetek alapján történt, a FISH reakciókat fluoreszcens mikroszkóppal értékeltük (DM5500 B; Leica, Buffalo Grove, IL, USA) CytoVision szoftverrel (Leica). Az értékelést ún. hot-spotokra fókuszálva két független vizsgáló végezte mintánként legalább 2-2 területen 30 sejtmagban, a narancsszínű *RICTOR* és a zöld színű *Chr5* jelek számolásával. A jelek számát mintánként átlagoltuk és meghatároztuk a *RICTOR/Chr5* arányt. A mintát 4 alatti *RICTOR* kópiaszám, illetve 2 alatti *RICTOR/Chr5* arány esetén *negatívnak*, 6 feletti *RICTOR* kópiaszám vagy 2 feletti *RICTOR/Chr5* arány esetén *pozitívnak* tekintettük. Amennyiben a *RICTOR* kópiaszám 4 és 6 között volt és a *RICTOR/Chr5* arány nem érte el a kettőt, a mintát amplifikáció tekintetében *bizonytalan* („equivocal”) esetként regisztráltuk.

### **3.5. In vitro vizsgálatok**

#### **3.5.1. Sejtvonalak, sejt- és szövettényésztés**

A vizsgálataink során felhasznált H196 (ATCC #CRL-5823), H1048 (ATCC #CRL-5853), H146 (ATCC #HTB-173) és DMS153 (ATCC #CRL-2064) humán SCLC sejtvonalak jellemző genetikai eltéréseit és morfológiai jellegzetességeiket a 6. ábrán foglaltam össze.

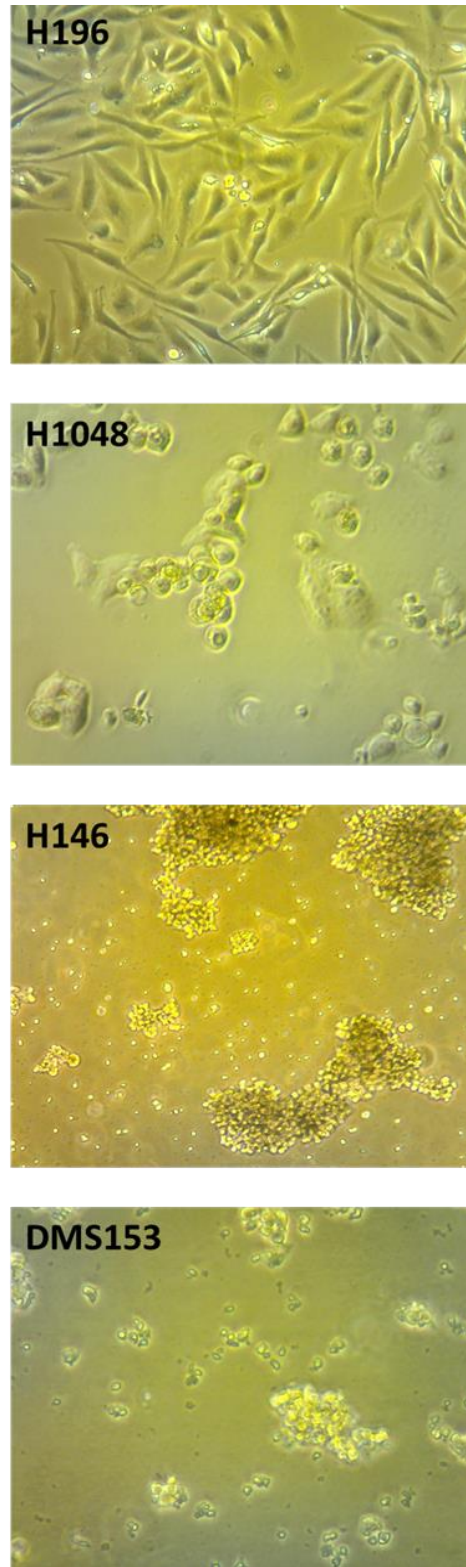
A sejtek tenyésztését RPMI 1640 médiumban (Merck-Sigma Aldrich, Darmstadt, Németország), 10% főtális borjú savó (hő inaktivált FBS, Merck-Sigma Aldrich) és 0,5% gentamycin (Sandoz, Holzkirchen, Németország) mellett végeztük 37°C-on, 5%-os CO<sub>2</sub> termosztátban. Az adherens és szuszpenziós (illetve kevert adhézios és szuszpenziós) sejteket a sejt proliferációs tulajdonságának függvényében 4-6 naponként passzáltuk, tripszin-EDTA (Merck-Sigma Aldrich) hozzáadásával. Vizsgálatainkban T25-ös és T75-ös tenyésztőflaskákat (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Svájc), illetve 96-lyukú plate-eket (Sarstedt, Nümbrecht, Németország) használtunk.

**A**

Sejtvonal	Nem	Típus	Eredet	Tulajdonságok, morfológia	PIK3CA	PTEN	AKT1	AKT2	AKT3	RICTOR	TP53	RB1
H196	férfi	SCLC	metasztatikus (pleurális effúzió)	adherens	-	Y138C (missense)	-	-	-	AMP	R175H (missense)	Q383* (nonsense)
H1048	nő	SCLC	metasztatikus (pleurális effúzió)	adherens	H1047R, K111R (missense)	-	-	-	AMP	-	P47Rfs*76 (FS del)	R552* (nonsense)
H146	férfi	SCLC	metasztatikus (csontvelő)	szuszpenziós, sejt- aggregátumok	AMP	-	AMP	-	-	-	P318Lfs*21 (FS del)	Q850* (nonsense)
DMS153	férfi	SCLC	tüdő (primer daganat)	adherens sejtcsoportok	AMP	-	-	-	-	K582N (missense)	T155P (missense)	I573Nfs*2 (FS ins)

Rövidítések: AMP - amplifikáció, SCLC - kissejtes tüdőrák, FS del - frameshift deléció, FS ins - frameshift inzerció, IF del - in frame deléció.

\* Mutációs adatok forrása: Cancer Cell Line Encyclopedia (Broad, 2019) Letöltve: 2019. november 5., <https://www.cbioportal.org/>

**B**

6. ábra. Az *in vitro* vizsgálatokhoz használt sejtvonalak egyedi mutációs jellegzetességei (A) és morfológiai jellemzői (B). A morfológiai jellemzőket bemutató mikroszkópos képek TouPCam kamerával, ToupView programmal készültek 40x (H196, H146), illetve 100x (H1048, DMS153) nagyítás mellett.

### 3.5.2. Sejtblokkok készítése az SCLC sejtvonalakból

Az SCLC sejtvonalak *RICTOR* FISH vizsgálata céljából sejtblokkokat készítettünk. A sejtenyésző flaskákból 1-10 millió sejtet gyűjtöttünk össze, amelyeket centrifugáltuk és a tápfolyadék teljes eltávolítása céljából kétszer foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS) mostuk. Ezt követően a sejteket – sejtszámtól függően – 10-30 ml 96%-os etil-alkoholban fixáltuk 20 percen keresztül, majd ismét 10 percen keresztül centrifugáltuk. A pelletet a centrifugacsőből szondatú segítségével tüllzacskóba, majd kazettába helyeztük. Kisebb sejtszám esetén a tüllzacskó alkalmazása helyett agar gélbe (Bio-Agar citoinklúziós aggregációs gél; Bio-Optica, Milánó, Olaszország) ágyasztuk a centrifugacső alján összegyűlt sejteket, amelyeket csipesz segítségével helyeztünk kazettába szivacsok közé. A sejtek utófixálása 10%-os pufferolt formalinban, a sejtszámtól függően 1-4 órány keresztül történt. A víztelenítést (felszálló alkoholsor, majd xilol) követően a mintákat paraffinba ágyasztuk.

### 3.5.3. Az mTOR-jelátvitel inhibitorok SCLC sejtvonalak proliferációját érintő hatásainak vizsgálata Alamar Blue tesztel

A kísérletek előtt meghatározott optimális sejtszámmal (H196 – 5000/well, H1048 – 10.000/well, H146 – 30.000/well, DMS153 – 30.000/well) indított *in vitro* rapamycin (mTORC1-gátló, 50 ng/ml; Merck-Sigma Aldrich), PP242 (mTORC1/2-gátló, 1  $\mu$ M; Tocris, Bristol, UK), vistusertib (mTORC1/2-gátló, 1  $\mu$ M; Cayman, Ann Arbor, MI, USA), dactolisib (PI3K/mTORC1 és C2-gátló, 1  $\mu$ M; Cayman), ipatasertib (Akt-gátló, 1  $\mu$ M; Cayman) és cisplatin (3  $\mu$ M; Accord Healthcare Polska, Varsó, Lengyelország) kezeléseket alkalmaztunk. A kísérletekben tesztelt dózisokat korábbi vizsgálataink és irodalmi adatok [293-295] alapján választottuk ki.

A kezeléseket a 24. órában kezdtük, majd a proliferációs hatásokat 72 órány inkubációs idő után határoztuk meg a mitokondriális reduktáz aktivitáson alapuló Alamar Blue tesztel. Az Alamar Blue oldatot (resazurin; Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) 10% végkoncentrációban használtuk a kezelés utolsó 4 órájában, majd a fluoreszcencia értékeket fluoriméterel határoztuk meg (570-590 nm, Ascent szoftver; Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher). Az eredményeket a kezeletlen kontroll sejtek %-ában adtuk meg. Három független kísérletben 6 párhuzamos mérést végeztünk a hatások kiértékeléséhez.

### **3.6. Statisztikai analízis**

A statisztikai analízist IBM SPSS Statistics szoftverrel végeztük (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Az immunhisztokémiai és klinikopatológiai adatok összehasonlítását Mann-Whitney *U*-teszttel és Fisher-féle egzakt próbával, mintapárok esetén Wilcoxon-féle előjeles rangpróbával végeztük. A korreláció számításához a Spearman-féle rangkorrelációt, a túlélési analízishez a Kaplan-Meier módszert használtuk, a túlélési görbék összehasonlítása log-rank teszttel történt. Az *in vitro* kísérletek esetén kétmintás t-próbát használtunk a szignifikancia megállapítására.

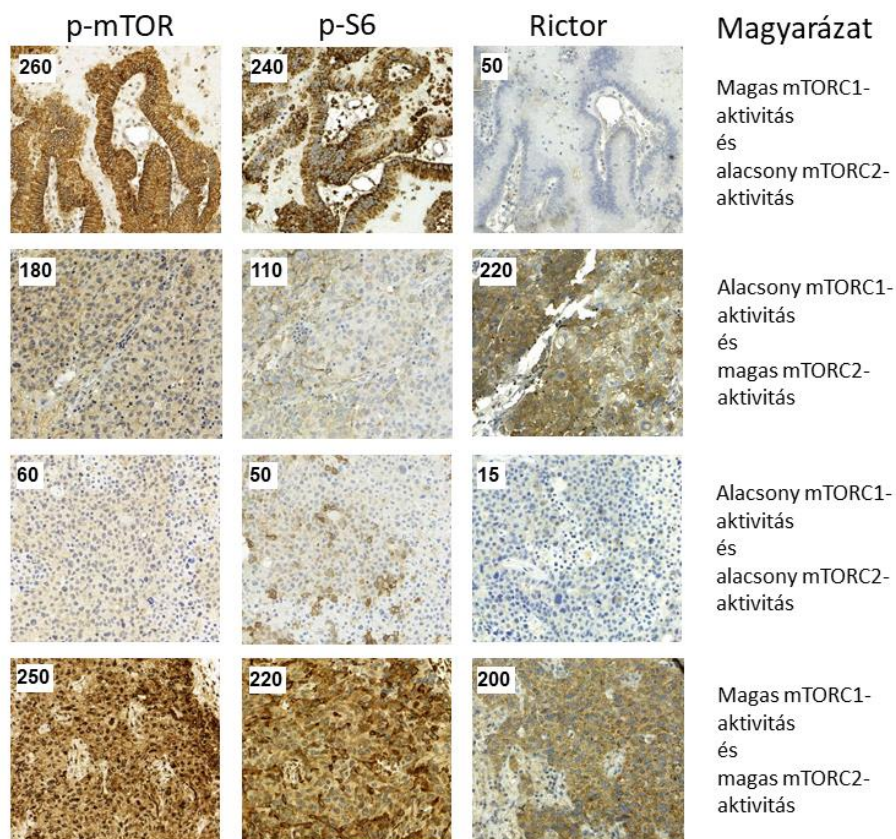
A szignifikanciaszintet kétféle próbák használata mellett az adenocarcinomákkal és kissejtes tüdődaganatokkal kapcsolatos vizsgálatokban  $P \leq 0,05$  értéknél, a LAM mintáknál – az esetszámra tekintettel –  $P \leq 0,01$  értéknél határoztuk meg.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. Az mTORC1/2 komplexek mennyiségével és aktivitásával összefüggő fehérjék expressziója primer és áttéti tüdő adenocarcinomákban

Az mTOR jelátviteli útvonal markereinek (p-mTOR, p-S6 és Rictor) expresszióját vizsgáltuk primer tüdő adenocarcinomákban (N=67) és tüdő adenocarcinomák agyi áttéteiben (N=67).

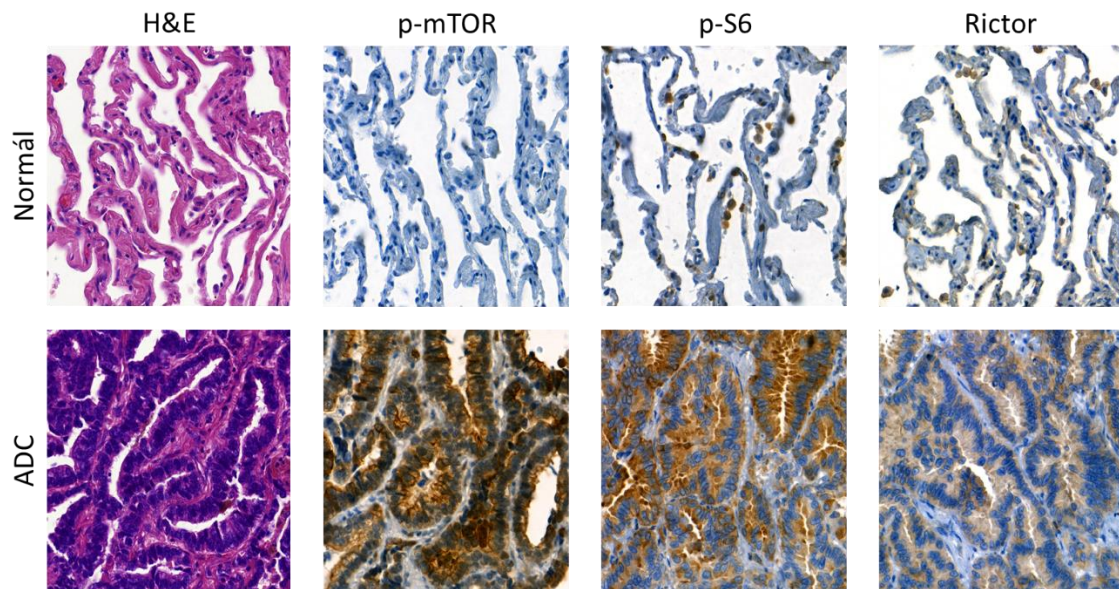
A vizsgált mintákban az mTORC1 és az mTORC2 aktivitására a p-mTOR, a p-S6 és a Rictor immunhisztokémiai reakció intenzitása alapján következtettünk. A p-mTOR expressziója az mTOR-kináz aktív formáját jelzi, ami mindkét komplex katalitikus alegységét alkothatja. A p-S6 az mTORC1 downstream targetje, expressziója az mTORC1 aktivitásának markere. A Rictor expressziója az mTORC2 vázfehérjéjeként az mTORC2 mennyiségét jelzi. Az mTORC2 aktivitására a p-mTOR és a Rictor expressziójának együttes értékelésével következtettünk (7. ábra).



**7. ábra.** Az mTORC1- és mTORC2-aktivitás meghatározása tüdő adenocarcinomák agyi metasztázisaiban. A különböző p-mTOR, p-S6 és Rictor H-score értékek a bal felső sarokban kerültek feltüntetésre. A képek 200x-os nagyítással készültek.

#### 4.1.1. A p-mTOR, a p-S6 és a Rictor expressziója a peritumorális tüdőszövetben, a primer tüdő adenocarcinómákban és az agyi áttétekben

A daganat melletti ép tüdőszövetben az mTOR jelátviteli útvonal mindhárom vizsgált markerének expressziója alacsony volt, az I. és II. típusú pneumocytákban egyaránt gyenge festődést láttunk (8. ábra). A daganatsejtekben a p-mTOR, a p-S6 és a Rictor leginkább citoplazmatikus expressziót mutatott, azonban néhány esetben – a primer adenocarcinómák 15%-ában, az agyi áttétek 34%-ában – a p-mTOR magi expresszióját is megfigyeltünk. A Rictor az esetek kevesebb, mint 10%-ában membránreakciót is mutatott, azonban a magban egy esetben sem figyeltünk meg Rictor- vagy p-S6-expressziót.

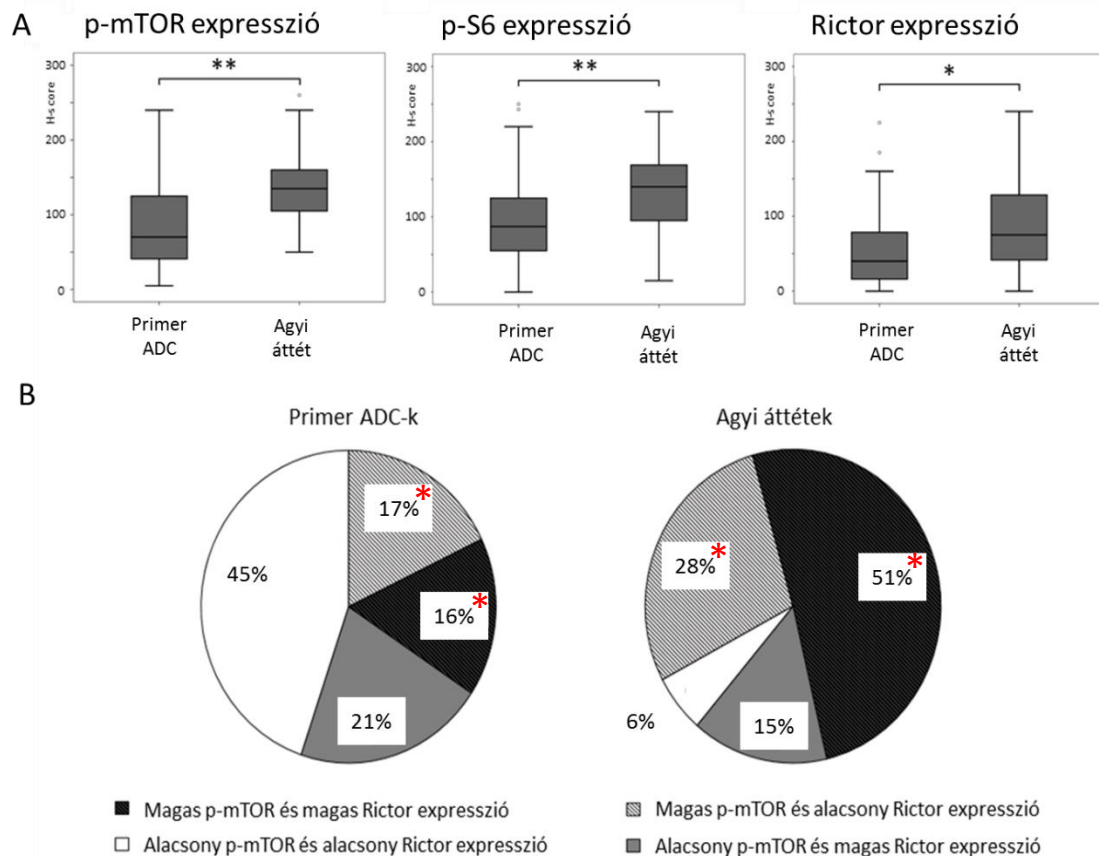


8. ábra. A p-mTOR, a p-S6 és a Rictor expressziója a tumor melletti ép tüdőszövetben és a primer tüdő adenocarcinómákban. A képek 400x-os nagyítással készültek.

Magas p-mTOR-, p-S6- és Rictor-expresszió sorrendben a primer adenocarcinómák 33%-ában, 34%-ában és 37%-ában, illetve az agyi áttétek 79%-ában, 70%-ában és 66%-ában volt megfigyelhető. Mindhárom marker expressziója szignifikánsan magasabb volt az agyi metasztázisokban, mint a primer daganatokban (9.A ábra).

A p-mTOR- és p-S6-expresszió konkordanciáját, tehát alacsony p-mTOR-expresszió alacsony p-S6-expresszióval, illetve az magas p-mTOR-expresszió magas p-S6-expresszióval való együttes előfordulását az esetek 72%-ában (96/134 eset) figyeltük

meg, az ettől eltérő esetek többségében (22/38 eset, 58%) a magas p-mTOR-expresszióhoz alacsony p-S6-expresszió társult. Ezen minták 45%-ában (10/22 eset) a magas p-mTOR- és alacsony p-S6-expresszióhoz magas Rictor-expresszió társult, jelezve, hogy az aktív mTOR-kináz ezekben az esetekben inkább az mTORC2 részét képezi. A magas p-mTOR- és magas Rictor-expresszió együttes előfordulását a primer tüdő adenocarcinómák 16%-ában, az agyi áttétek 51%-ában figyeltük meg (9.B ábra).



**9. ábra. A p-mTOR, a p-S6 és a Rictor expressziója a primer tüdő adenocarcinómákban és az agyi áttétekben. A.** A p-mTOR, a p-S6 és a Rictor expressziója szignifikánsan magasabb volt az agyi metasztázisokban, mint a primer adenocarcinómákban. \*  $P < 0,001$  és \*\*  $P < 0,0001$  (Mann-Whitney  $U$ -teszt). **B.** A p-mTOR és a Rictor expressziója primer tüdő adenocarcinómákban és agyi áttétekben. A magas p-mTOR- és a magas Rictor-expresszió együttes előfordulása a primer daganatok 16%-ában, az agyi metasztázisok jelentősen nagyobb hányadában, 51%-ában volt megfigyelhető. A piros csillaggal jelölt területek a magas p-mTOR-expressziót jelzik, ami az mTOR-kináz fokozott aktivitására utal – ez az mTORC1 és mTORC2 komplexekben is megjelenhet.

#### **4.1.2. A p-mTOR, a p-S6 és a Rictor expressziójának összefüggése a klinikopatológiai adatokkal**

A p-mTOR-, p-S6- és Rictor-expresszió, valamint a klinikopatológiai adatok között sem a primer, sem az áttéti daganatokban nem találtunk szignifikáns összefüggést. Primer adenocarcinomák esetén a Rictor-expresszió és a magasabb stádium között statisztikai trendet ( $P \leq 0,10$ ) figyeltünk meg ( $P = 0,067$ ), továbbá a magas Rictor-expresszió jellemzőbb volt szoliter, mint multiplex agyi áttétek esetén (70% vs. 33%,  $P = 0,061$ ). Ezzel ellentétben a magas p-S6-expresszió inkább a multiplex áttétek esetén volt gyakoribb, mint szoliter áttétekben (92% vs. 65%,  $P = 0,178$ ) (9. táblázat).

#### **4.1.3. A p-mTOR, a p-S6 és a Rictor expressziója a primer tumor-agyi áttét mintapárokban**

A vizsgált minták közül összesen 15 esetben (6 férfi és 9 nőbeteg) volt lehetőségünk ugyanazon betegből származó primer tumor és agyi áttét összehasonlítására. A primer daganat eltávolítása és a központi idegrendszeri metasztázis megjelenése között eltelt átlagos időtartam  $25,8 \pm 19,3$  hónap volt.

A mintapárok vizsgálata során az agyi áttétekben a primer daganatokhoz képest mind az p-mTOR, mind a p-S6 expressziója változott az esetek 60%-ában (9/15 eset), míg a Rictor kifejeződése az esetek 40%-ában mutatott eltérést (6/15 eset). A p-mTOR és a p-S6 expressziójának változása esetén az esetek többségében az mTORC1-aktivitás fokozódását láttuk az agyi áttétekben: a p-mTOR expressziója 9-ből 6 esetben, a p-S6 expressziója 9-ből 8 esetben növekedett az agyi áttétben a primer tumorhoz képest (10. ábra). A Rictor expressziója a mintapárok igazoltan agyi áttétet adó primer daganatainak többségében (10/15 eset, 67%) magas volt, míg a többi vizsgált primer tüdő adenocarcinoma esetén csak a minták 28%-ában figyeltünk meg magas Rictor-expressziót ( $P < 0,01$ ).

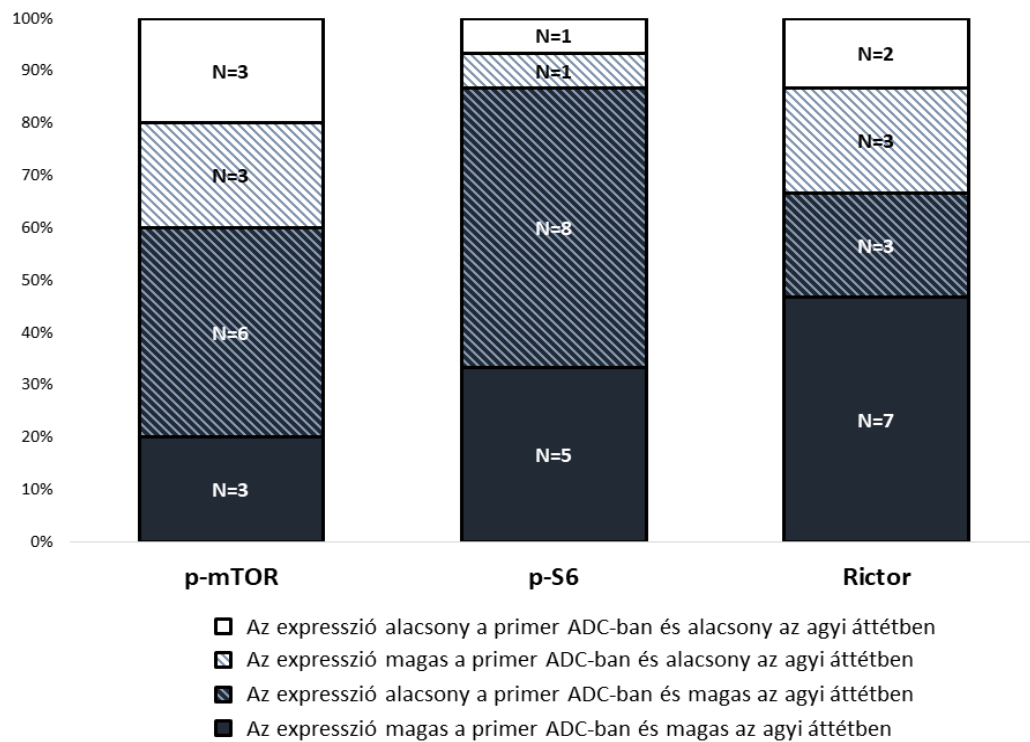


9. táblázat. A p-mTOR-, p-S6- és Rictor-expresszió összefüggései a klinikopatológiai adatokkal

	Összes (%)	p-mTOR expresszió			p-S6 expresszió			Rictor expresszió		
		Magas (%)	Alacsony (%)	P-érték	Magas (%)	Alacsony (%)	P-érték	Magas (%)	Alacsony (%)	P-érték
<b>Primer tüdő ADC-k (n=67)</b>										
Életkor (évek, átlag±SD)	61 ± 10	60 ± 11	62 ± 9	0.644	62 ± 10	61 ± 10	0.540	59 ± 10	62 ± 10	0.244
Nem (n=67)										
Férfi	25 (37)	5 (20)	20 (80)	0.110	8 (32)	17 (68)	1.000	9 (36)	16 (64)	1.000
Nő	42 (63)	17 (40)	25 (60)		14 (33)	28 (67)		16 (38)	26 (62)	
Dohányzás (n=51)										
Soha	16 (31)	7 (44)	9 (56)	0.480	5 (31)	11 (69)	0.435	4 (25)	12 (75)	0.854
Korábban	15 (29)	4 (27)	11 (73)		6 (40)	9 (60)		5 (33)	10 (66)	
Jelenleg is	20 (39)	5 (25)	15 (75)		4 (20)	16 (80)		5 (25)	15 (75)	
Stádium a diagnóziskor (n=56)										
I	28 (49)	7 (25)	21 (75)	0.147	8 (29)	20 (71)	0.120	6 (21)	22 (79)	0.067†
II	7 (13)	2 (29)	5 (71)		0 (0)	7 (100)		1 (14)	6 (86)	
III	12 (21)	5 (42)	7 (58)		4 (33)	8 (67)		4 (33)	8 (67)	
IV	9 (16)	6 (67)	3 (33)		5 (56)	4 (44)		6 (67)	3 (33)	
<b>Tüdő ADC-k agyi áttétei (n=67)</b>										
Életkor (évek, átlag±SD)	60 ± 9	61 ± 10	59 ± 5	0.820	61 ± 9	60 ± 8	0.696	59 ± 9	63 ± 9	0.556
Nem (n=67)										
Férfi	37 (55)	27 (73)	10 (27)	1.000	23 (62)	14 (38)	0.179	25 (68)	12 (32)	0.221
Nő	30 (45)	22 (73)	8 (27)		24 (80)	6 (20)		15 (50)	15 (50)	
Agyi áttét mérete (n=39)										
< 21 mm	19 (49)	13 (68)	6 (32)	0.273	16 (84)	3 (16)	0.155	9 (47)	10 (53)	0.341
≥ 21 mm	20 (51)	17 (85)	3 (15)		12 (60)	8 (40)		13 (65)	7 (35)	
Szoliter vagy multiplex áttét (n=49)										
Szoliter	37 (76)	26 (70)	11 (30)	0.747	24 (65)	13 (35)	0.178	26 (70)	11 (30)	0.061†
Multiplex	12 (24)	10 (83)	2 (17)		11 (92)	1 (8)		4 (33)	8 (67)	

Rövidítések: ADC - adenocarcinoma, SD - standard deviáció.

† Statisztikai trend:  $P < 0.10$ .



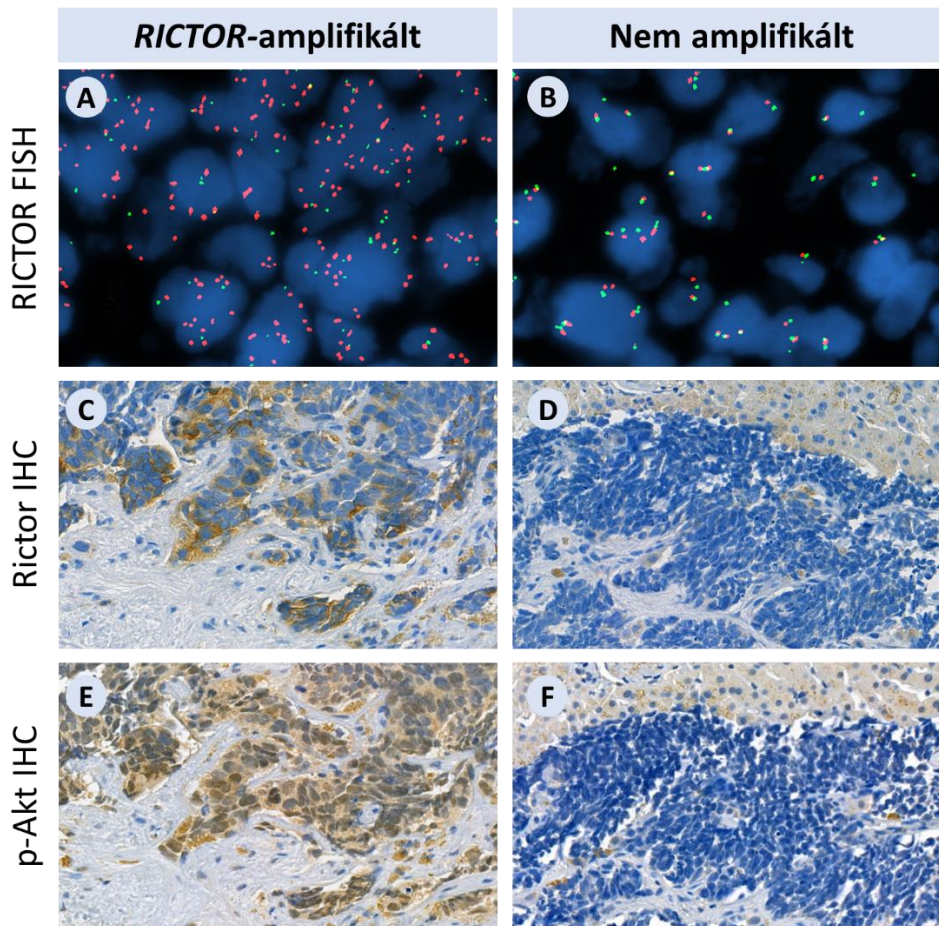
**10. ábra. A p-mTOR, a p-S6 és a Rictor expressziójának különbségei a primer tüdő adenocarcinomák és agyi áttétek között.** A p-mTOR expressziója agyi áttétek többségében, 9 esetben magas volt: 6 esetben az expresszió növekedett a primer daganatban megfigyelt értékhez képest, 3 esetben már a primer daganatban is fokozott expressziót láttunk. A p-S6 expressziója 2 eset kivételével az összes áttéti daganatban magas volt, ez 8 esetben az expresszió fokozódását jelentette a primer daganathoz képest, 5 esetben a primer tumor is fokozott p-S6-expressziót mutatott és ezt a tulajdonságot az agyi metasztázis is megtartotta. A Rictor expressziója az áttéti daganatok közül 10 esetben volt magas, itt csupán 3 esetben növekedett az expresszió a primer tumorhoz képest, 7 esetben már a primer, agyi áttétet adó adenocarcinomában is magas Rictor-expressziót láttunk. A csíkozott háttérű terület azokat az eseteket jelzi, ahol különbözött a vizsgált markerek expressziója a primer daganat és az agyi metasztázis között.

#### 4.2. A *RICTOR*-amplifikáció és az mTORC2-aktivitás jelentőségének vizsgálata kissejtes tüdődaganatokban

Vizsgálatunk során 92 beteg összesen 100 mintáját elemeztük. A vizsgált betegek közül 6 beteg esetén 2, míg egy beteg esetén 3 különböző időpontban vett mintával rendelkezünk, a többi vizsgált beteghez csak 1 minta tartozott. A klinikopatológiai adatokat az 5. táblázat tartalmazza.

##### 4.2.1. A *RICTOR*-amplifikáció gyakorisága kissejtes tüdődaganatokban

A FISH vizsgálat (11.A-B ábra) alapján a mintákban a medián (tartomány) *RICTOR* kópiaszám 2,90 (1,26-8,35) volt. *RICTOR*-amplifikációt 100-ból 15 esetben (15%) állapítottuk meg. A többi 85 esetből 3 (3%) bizonytalan, míg 82 (82%) negatív volt.



11. ábra. Példák a *RICTOR* FISH, valamint Rictor és p-Akt IHC reakciókra *RICTOR*-amplifikált, illetve nem amplifikált SCLC mintákban. A D és F képeken az SCLC áttét melletti májszövet belső pozitív kontrollként használható. A képek 1000x-es (A-B), illetve 400x-os (C-E) nagyítással készültek.

#### 4.2.2. A Rictor és a p(Ser473)-Akt expressziója kissejtes tüdődaganatokban

Az SCLC mintákban a Rictor (az mTORC2 vázfehérjéje) és a p-Akt (az mTORC2 downstream targetje és aktivációjának markere) expresszióját immunhisztokémiai módszerrel elemeztük (11.C-E ábra).

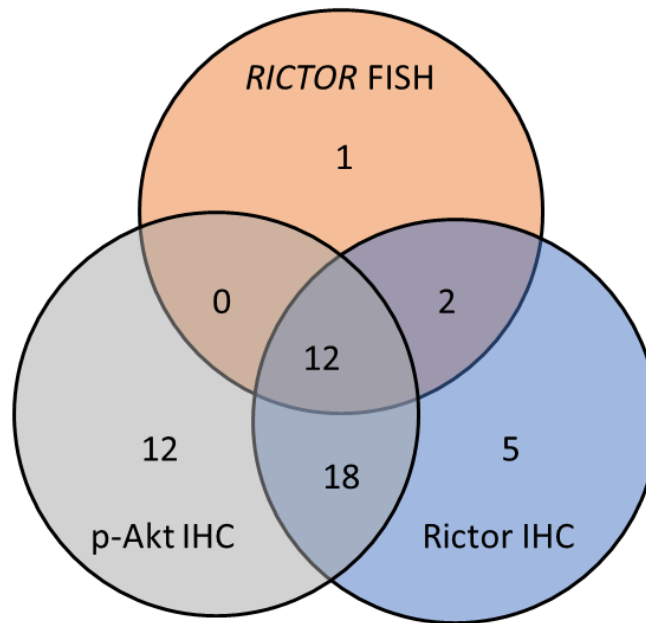
A Rictor expressziója 14 esetben (14%) magas, 23 esetben (23%) közepes, 25 esetben (25%) alacsony volt, 38 esetben (38%) pedig nem figyeltünk meg expressziót. A p-Akt expressziója 16 esetben (16%) magas, 26 esetben (26%) közepes, 35 esetben (35%) alacsony fokú volt, míg 23 esetben (23%) nem detektáltunk p-Akt-expressziót. A továbbiakban az IHC szenzitivitásának és specificitásának vizsgálatához a magas és közepes expressziót pozitívként, míg az ez alattiakat negatívként regisztráltuk.

#### 4.2.3. Korreláció a RICTOR FISH, valamint a Rictor és p(Ser473)-Akt IHC eredmények között

A *RICTOR* kópiaszám pozitív korrelációt mutatott mind a Rictor ( $\rho = 0,416$ ;  $P < 0,001$ ), mind a p-Akt ( $\rho = 0,289$ ;  $P < 0,01$ ) expressziójával. A Rictor- és p-Akt-expresszió között szintén erős pozitív korrelációt találtunk ( $\rho = 0,466$ ;  $P < 0,001$ ).

A 15 *RICTOR*-amplifikált esetből 14-ben (93%) IHC-val is Rictor pozitivitást detektáltunk (az expresszió 5 esetben magas, 9 esetben közepes volt), illetve a 15-ből 12 eset mutatott p-Akt IHC pozitivitást (5 esetben magas, 7 esetben közepes expresszió) (12. ábra). Csupán egy *RICTOR*-amplifikált eset volt negatív mind a Rictor, mind a p-Akt IHC vizsgálata során. Ezzel szemben a 85 *RICTOR*-amplifikációt nem mutató – negatív vagy bizonytalan – esetből 23 (27%) volt Rictor IHC pozitív (9 esetben magas, 14 esetben közepes expresszióval), illetve 30 eset (35%) volt p-Akt IHC pozitív (11 esetben magas, 19 esetben közepes expresszióval).

A *RICTOR* FISH-t gold standard eljárásnak tekintve a Rictor IHC szenzitivitása 93%, specificitása 73%; a p-Akt IHC szenzitivitása 80%, specificitása 65% volt a *RICTOR*-amplifikáció kimutatásában (10. táblázat).



**12. ábra.** A *RICTOR* FISH, Rictor IHC és p-Akt IHC között megfigyelt konkordanciát bemutató Venn-diagramm. A diagramm a pozitív esetek számát mutatja mindegyik vizsgálati módszernél.

**10. táblázat.** Konkordancia a *RICTOR* FISH, valamint a Rictor és p-Akt IHC vizsgálatok eredményei között

	Rictor expresszió	
	Negatív	Pozitív
<b>FISH amplifikált</b>	1	14 (szensitivitás = 93%)
<b>FISH nem amplifikált*</b>	62 (specifitás = 73%)	23

	p-Akt expresszió	
	Negatív	Pozitív
<b>FISH amplifikált</b>	3	12 (szensitivitás = 80%)
<b>FISH nem amplifikált*</b>	55 (specifitás = 65%)	30

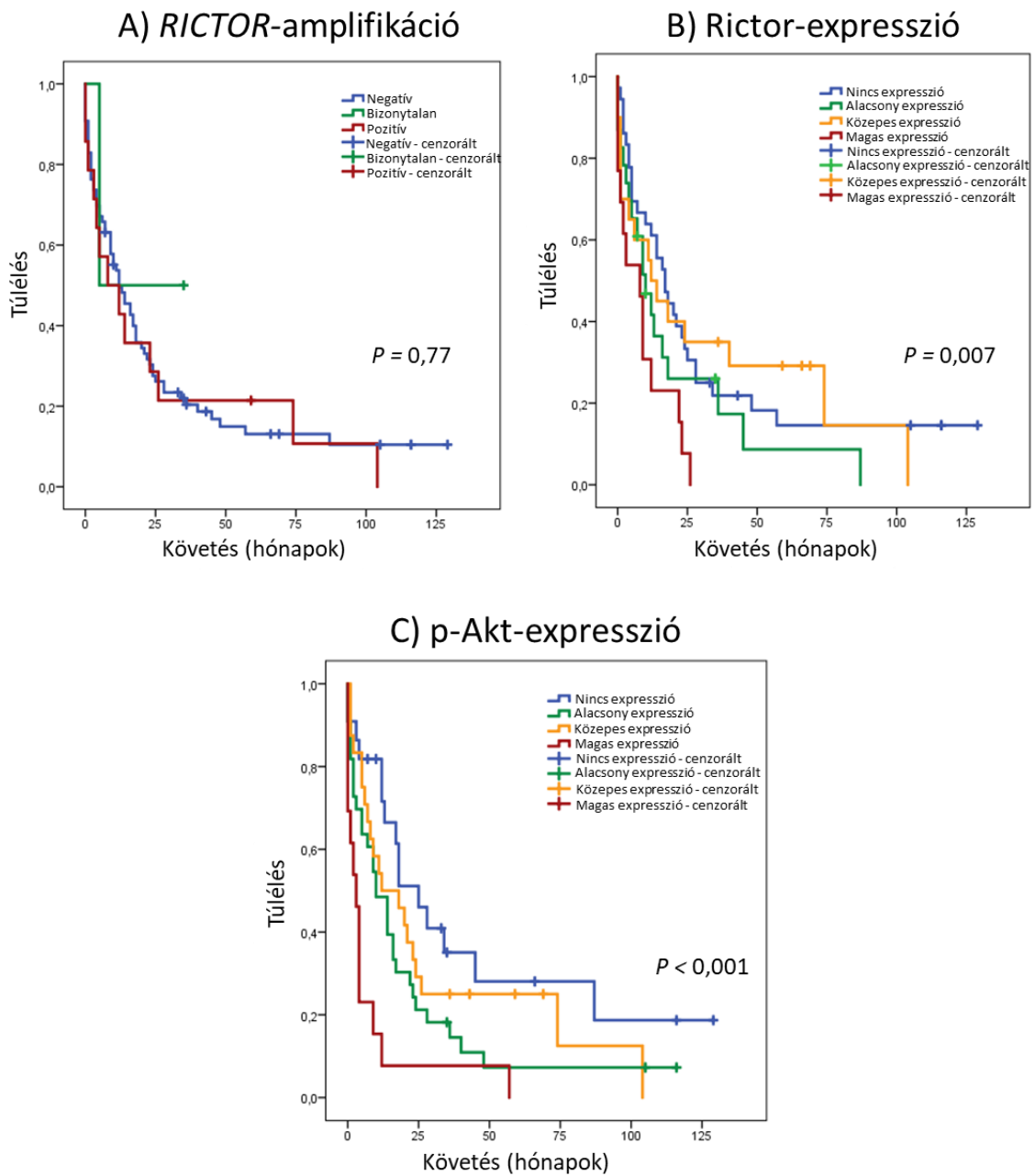
\* *RICTOR*-amplifikáció tekintetében negatív vagy bizonytalan.

#### **4.2.4. Összefüggések a klinikopatológiai adatok és a *RICTOR*-amplifikáció, valamint a Rictor- és p(Ser473)-Akt-expresszió között**

A *RICTOR*-amplifikáció és a klinikopatológiai adatok – az életkor, a nem, a tumor típusa (primer vagy áttéti) és a mintavételi eljárás – között nem találtunk szignifikáns összefüggést. A Rictor expressziója szignifikánsan magasabb volt a távoli áttétekben, mint a primer tumorokban vagy a nyirokcsomó metasztázisokban ( $P < 0,001$ ). A p-Akt expressziója szintén magasabb volt a távoli áttétekben, de ez az összefüggés nem volt statisztikailag szignifikáns ( $P = 0,09$ ). A Rictor- és p-Akt-expresszió, valamint a többi klinikopatológiai adat (életkor, nem, mintavételi eljárás) között nem volt összefüggés.

#### **4.2.5. A *RICTOR*-amplifikáció, valamint a Rictor- és p(Ser473)-Akt-expresszió összefüggései a túléléssel**

A *RICTOR*-amplifikáció jelenléte vagy hiánya nem mutatott összefüggést a teljes túléléssel (13.A ábra). Ezzel szemben mind a Rictor (log-rank  $P = 0,007$ ), mind a p-Akt (log-rank  $P < 0,001$ ) magas expressziója szignifikánsan rövidebb teljes túléléssel társult azokkal az esetekkel összehasonlítva, amelyekben nem figyeltünk meg Rictor-, illetve p-Akt-expressziót (13.B és C ábra).



**13. ábra.** A *RICTOR*-amplifikáció, valamint a Rictor- és p-Akt-expresszió összefüggései a teljes túléléssel SCLC betegeknél. A Kaplan-Meier analízis alapján a *RICTOR*-amplifikáció nem mutatott összefüggést a teljes túléléssel (A), ezzel szemben a magas Rictor- (B) és p-Akt-expresszió (C) esetén szignifikánsan rövidebb volt a betegek túlélése, mint az expressziót nem mutató minták esetén. A függőleges vonalak a cenzorált adatokat jelzik.

### **4.3. In vitro vizsgálatok az PI3K/Akt/mTOR jelátviteli út inhibitoraival SCLC sejtvonalakban**

Az SCLC minták vizsgálata során megfigyeltük, hogy a Rictor és p-Akt expressziója a *RICTOR*-amplifikáció negatív minták egy részében is jelen van. A fokozott mTORC2-aktivitás *RICTOR*-amplifikáció nélkül, más szabályozási zavar következtében is kialakulhat. A betegek túlélési adatainak vizsgálatakor nem tudtuk igazolni azt a korábban leírt megfigyelést, amely szerint a *RICTOR*-amplifikáció kedvezőtlenebb túléléssel társul. Ugyanakkor a Rictor és a p-Akt magas expressziója a tumorsejtek nagy százalékában – a *RICTOR*-amplifikáció jelenlététől függetlenül – szignifikánsan rövidebb teljes túléléssel függött össze.

*In vitro* vizsgálatainkban ezért az mTOR-jelút inhibitorok proliferáció-gátló hatásait elemeztük igazoltan *RICTOR*-amplifikált, illetve más, az mTOR-jelút aktivitását szintén fokozó mutációkat hordozó, de *RICTOR*-amplifikáció negatív SCLC sejtvonalakban.

#### **4.3.1. A *RICTOR*-amplifikáció vizsgálata az SCLC sejtvonalakban**

A *RICTOR*-amplifikáció jelenlétét a sejtvonalakból készített sejtblokkok paraffinos metszetein vizsgáltuk FISH módszerrel, az eredmények a 14. ábrán láthatók.

A H196 sejtvonalon az irodalmi adatoknak megfelelően sikerült igazolnunk a *RICTOR*-amplifikációt (*RICTOR*/*Chr5* arány > 2), a többi három sejtvonalon nem figyeltünk meg számbeli eltérést a *RICTOR* génben. Kiemelendő azonban az irodalmi adatok szerint *RICTOR* missense mutációt hordozó DMS153 sejtvonalonban a zöld 5q kontroll jelek alacsony száma, ami 5q-vesztésre utalhat.

#### **4.3.2. Az mTOR jelátviteli út inhibitorainak hatása az SCLC sejtvonalak proliferációjára**

Vizsgálataink során az mTOR jelátviteli útvonal genetikai aberrációit (lásd még a 6. ábrán) hordozó sejtvonalakot vizsgáltunk:

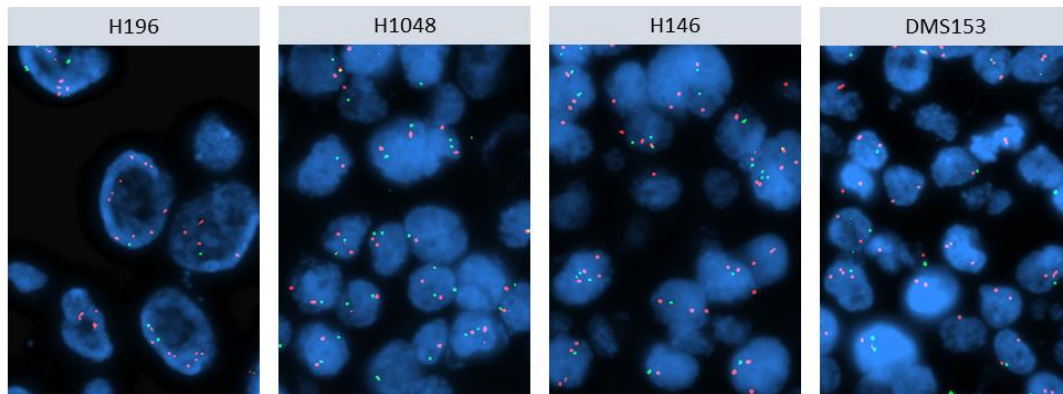
- 1) H196: *RICTOR*-amplifikáció és *PTEN*-mutáció;
- 2) H1048: a *PIK3CA* kettős mutációja és az *AKT3* amplifikációja;
- 3) H146: *PIK3CA*- és *AKT1*-amplifikáció;
- 4) DMS153: *PIK3CA*-amplifikáció és *RICTOR*-mutáció.



A

Sejtvonal	<i>RICTOR</i> kópiaszám	<i>Chr5</i> kópiaszám	<i>RICTOR/Chr5</i> arány
H196	4,62	1,71	2,79
H1048	1,87	1,67	1,12
H146	2,43	1,70	1,43
DMS153	2,53	1,2	2,11

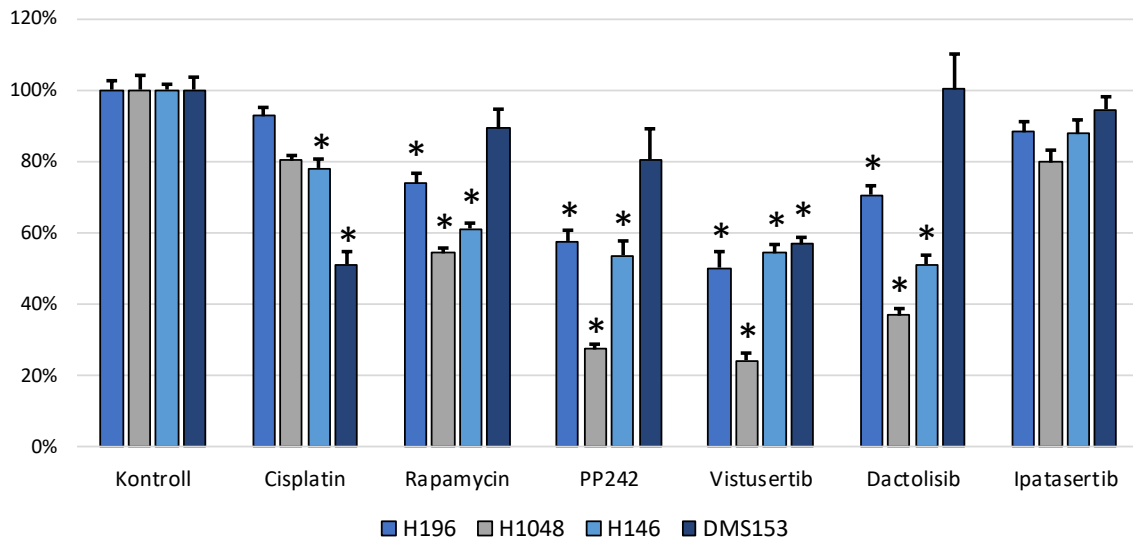
B



**14. ábra. A *RICTOR* FISH vizsgálatok eredményei (A) és reprezentatív fotói (B) az SCLC sejtvonalakban.** A *RICTOR* próba (piros) mellett kontrollként az 5. kromoszóma hosszú karjára (5q) tervezett próbát (*Chr5*, zöld) használtunk. A képek 1000x-es nagyítással készültek.

A vizsgált sejtvonalak eltérő cisplatin érzékenységet mutattak, a *RICTOR*-mutációt hordozó DMS153 cisplatin-érzékenynek (~50%-os csökkentés,  $P < 0,05$ ), míg a *RICTOR*-amplifikált H196 sejtvonal cisplatin-rezisztensnek bizonyult.

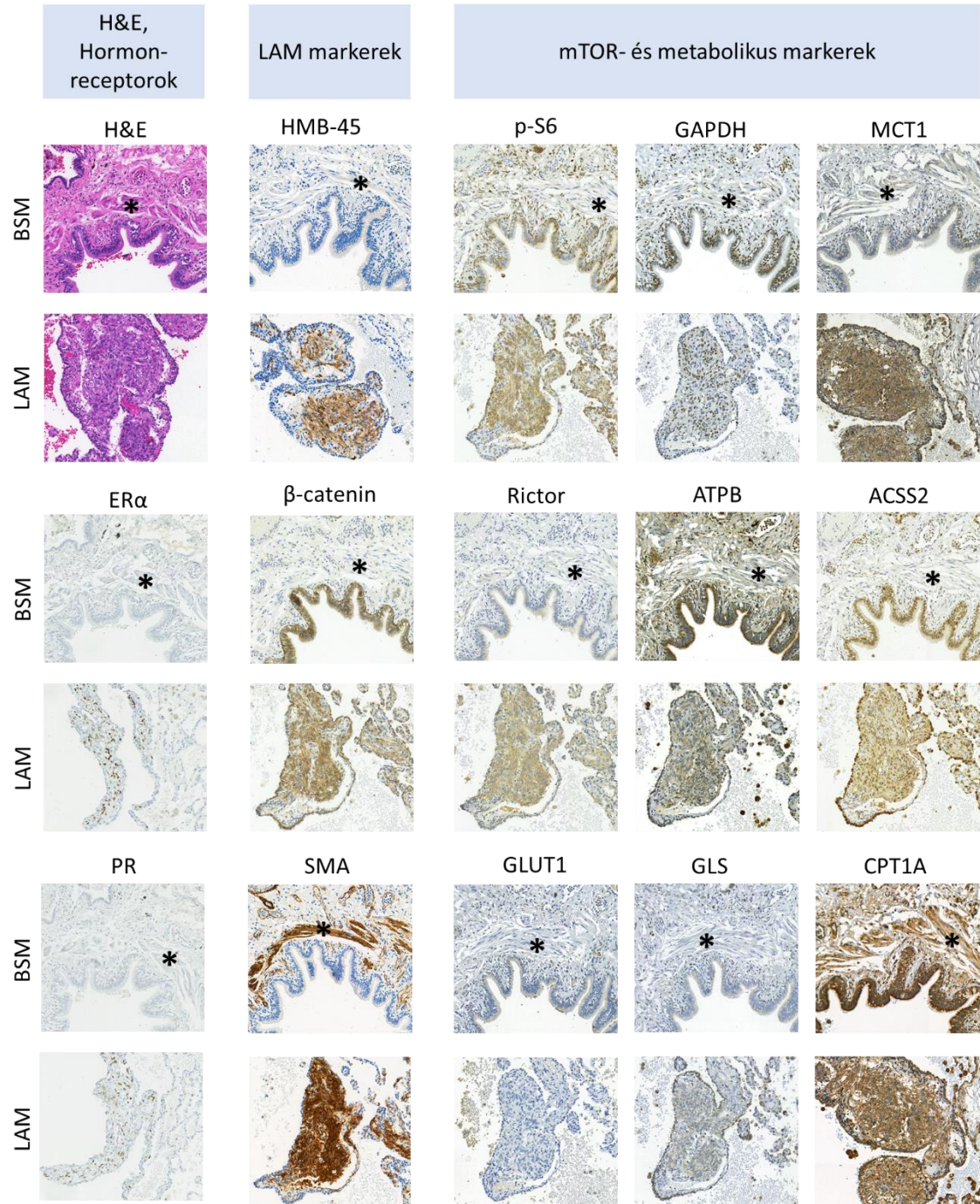
Az mTORC1-gátló rapamycin a H196 sejtvonalban ~25%-os, a H1048 és H146 sejtvonalakban 40-50%-os proliferáció-csökkenést eredményezett, míg a *RICTOR*-mutáns sejtvonal (DMS153) rapamycin-rezisztensnek bizonyult. Az mTORC1/2-gátló PP242 a H196, H1048 és H146 sejtvonalakban szignifikánsan, nagymértékben csökkentette a proliferációt, a rapamycin-rezisztens DMS153 sejtekben azonban 20%-os proliferáció-csökkenést eredményezett. A szintén mTORC1/2-gátló vistusertib mind a 4 sejtvonalban jelentősen, legalább 40%-al csökkentette a proliferációt. A PI3K/mTOR inhibitor dactolisib a rapamycinhez hasonló hatást mutatott. Az Akt-gátló ipatasertib az alkalmazott 1  $\mu$ M-os koncentrációban nem okozott jelentős proliferáció-csökkenést, még a legérzékenyebb H1048 sejtvonalban is legfeljebb 20%-os proliferáció-csökkenést tapasztaltunk (15. ábra).



**15. ábra. Az mTOR-jelút gátlószereinek hatása az SCLC sejtvonalakra.** A proliferáci-csökkentő hatást a kezeletlen kontroll %-ában adtuk meg. \*-gal jelöltük a  $P \leq 0,05$  szignifikanciaszint melletti legalább 20%-os csökkenést.

#### **4.4. Az mTOR-jelátvitelhez és metabolikus folyamatokhoz kapcsolható fehérjék expressziója lymphangioleiomyomatosisban**

A *TSC1/2*-mutációval összefüggésben az mTORC1-aktivitás jelentősége régóta ismert LAM-ban. Vizsgáltunk célja az volt, hogy az mTORC1-aktivitás szerepén túl az mTORC2 jelenlétének, aktivitásának jelentőségét is vizsgáljuk a LAM patobiológiájában. Ahogyan az a bevezetőben ismertetésre került, az mTOR-jelátvitel az anyagcsere fontos szabályozója, ezért nemcsak az mTOR-jelút immunhisztokémiai markereit, hanem metabolikus folyamatok – úgymint glikolízis, glutaminolízis, zsírsavak  $\beta$ -oxidációja, acetát-hasznosítás és oxidatív foszforiláció – kulcsenzimeinek expresszióját is tanulmányoztuk a LAM mintákban (16. ábra).



**16. ábra.** A vizsgált LAM-markerek (HMB-45,  $\beta$ -catenin, SMA), hormonreceptorok (ER $\alpha$ , PR), mTOR-jelátvitelhez (p-S6, Rictor) és metabolikus folyamatokhoz (GluT1, GAPDH, ATPB, GLS, MCT1, ACSS2, CPT1A) kapcsolható fehérjék expressziója a LAM- és BSM-sejtekben. A képek 200x-os nagyítással készültek. A csillagok a BSM sejteket jelzik.

#### 4.4.1. LAM-markerek és hormonreceptorok expressziója a LAM mintákban

A LAM-sejtek mindegyik esetben (100%) pozitívak voltak SMA és  $\beta$ -catenin, ill. 9/11 esetben (82%) HMB-45 immunhisztokémiai reakcióval. A hormonreceptorok (ösztrogén- és progeszteron-receptor) expressziója a 11. táblázatban szintén feltüntetésre került.

**11. táblázat. A LAM-markerek (HMB-45,  $\beta$ -catenin, SMA) és a hormon-receptorok (ösztrogén- és progeszteron-receptor) expressziója a LAM mintákban**

Beteg	HMB-45	$\beta$ -Catenin	SMA	ER $\alpha$ (%)	PR (%)
1	pozitív	pozitív	pozitív	50	10
2	pozitív	pozitív	pozitív	60	40
3	negatív	pozitív	pozitív	0	60
4	pozitív	pozitív	pozitív	50	20
5	pozitív	pozitív	pozitív	40	70
6	pozitív	pozitív	pozitív	50	30
7	pozitív	pozitív	pozitív	60	30
8	pozitív	pozitív	pozitív	70	20
9	pozitív	pozitív	pozitív	70	60
10	negatív	pozitív	pozitív	–	–
11	pozitív	pozitív	pozitív	75	60

**Rövidítések:** ER $\alpha$  – ösztrogén-receptor  $\alpha$ ; HMB-45 – homatropine-metilbromid 45; LAM – lymphangioliomyomatosis; PR – progeszteron-receptor; SMA – simaizom aktin.

#### 4.4.2. Az mTORC1/2 komplexek mennyiségével és aktivitásával összefüggő fehérjék expressziója LAM-ban

A LAM-sejtekben 11-ből 10 esetben (91%) magas p-S6-expressziót láttunk, jelezve az mTORC1 fokozott aktivitását. Az mTORC2 karakterisztikus vázfehérjéjének, a Rictornak 11-ből 6 esetben (55%) volt magas az expressziója, jelezve az mTORC2 komplex fokozott mennyiségét ezekben az esetekben. Csupán egy olyan esetet találunk, ahol mind a p-S6, mind a Rictor expressziója alacsony volt (17. ábra).

Ezzel szemben a kontrollként vizsgált bronchiális simaizomsejtekben (BSM) a p-S6 és a Rictor alacsony expressziót mutatott, vagy nem fejeződött ki. A p-S6- és Rictor-expresszió szignifikánsan magasabb volt a LAM-, mint a BSM-sejtekben (18. ábra).

### 4.4.3. A metabolikus folyamatokhoz kapcsolható transzporterek és enzimek expressziója LAM-ban

#### 4.4.3.1. Glikolízis és oxidatív foszforiláció

A daganatsejtek glükóz-felvételéért döntően felelős GluT1 transzportfehérje citoplazmatikus és membránreakciót mutatott a LAM- és a BSM-sejtekben. GluT1-pozitivitást a 11-ből 5 esetben (45%) figyeltünk meg, ezek közül 4 esetben alacsony, egy esetben magas volt a GluT1 expressziója a LAM-sejtekben (17. ábra). A BSM-sejtekben a GluT1 nem fejeződött ki vagy csak alacsony fokú expresszió volt detektálható. A H-score-ok tekintetében a LAM- és BSM-sejtekre egyaránt az alacsony fokú GluT1-expresszió volt jellemző, a két csoport között így nem találtunk szignifikáns különbséget ( $P = 0,61$ ) (18. ábra).

A GAPDH (glikolízis-marker) és az ATPB (az oxidatív foszforiláció kulcsenzime) esetén csak a citoplazmatikus expressziót értékeltük, a GAPDH esetében ezen felül magi reakciót is megfigyeltünk az esetek többségében. A LAM-sejtekben a GAPDH expressziója 7 esetben (64%), az ATPB expressziója 4 esetben (36%) volt magas (17. ábra). A BSM-sejtekben csak egy esetben figyeltünk meg magas ATPB-expressziót (9%), a GAPDH expressziója pedig egy esetben sem volt intenzív. Az ATPB reakció H-score értékei nem mutattak szignifikáns különbséget a LAM- és BSM-sejtek között ( $P = 0,02$ ), míg a GAPDH expressziója szignifikánsan magasabb volt a LAM-sejtekben ( $P < 0,01$ ) (18. ábra).

#### 4.4.3.2. Glutaminolízis

A GLS (glutaminolízis marker) expresszióját a 11-ből 10 esetben (91%) figyeltük meg a LAM-sejtekben, az expresszió 7 esetben (64%) volt magas H-score értéket mutatott (17. ábra). Ezzel szemben a GLS expressziója a vizsgált esetek 91%-ában nem volt megfigyelhető a BSM-sejtekben. A GLS H-score értékek a LAM-sejtekben szignifikánsan magasabbak voltak, mint a BSM-sejtekben ( $P < 0,01$ ) (18. ábra).

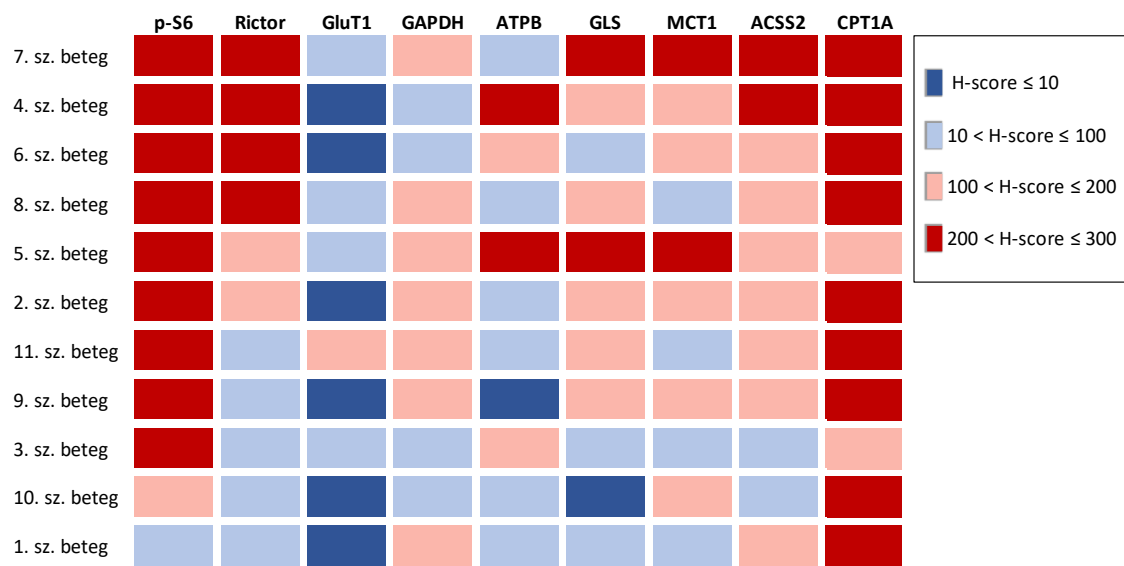
#### 4.4.3.3. Zsírsavak $\beta$ -oxidációja

A zsírsavak  $\beta$ -oxidációjának sebességmeghatározó lépését végző CPT1A expressziója a LAM- és BSM-sejtekben egyaránt magas volt az összes vizsgált esetben (17. ábra).

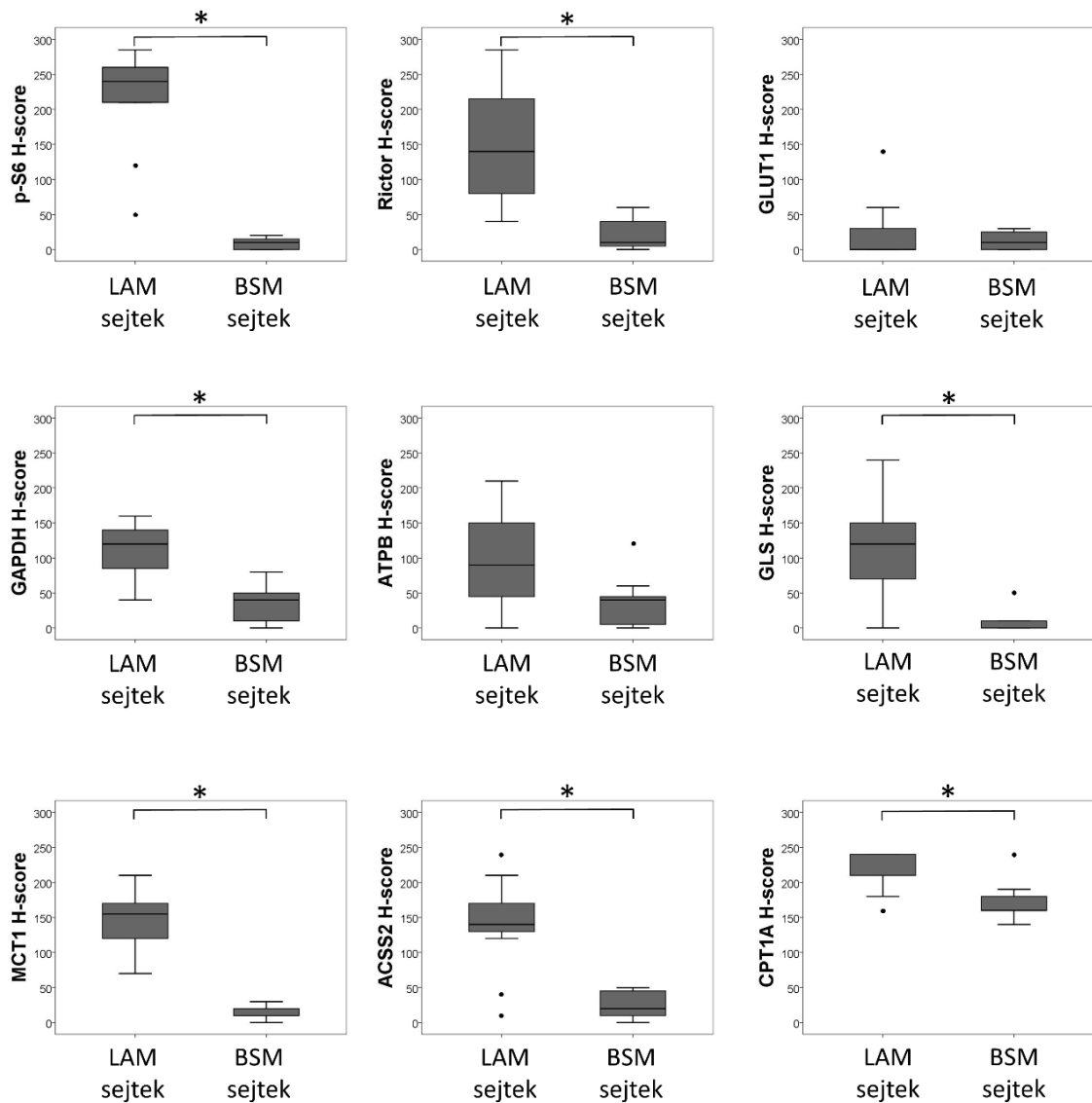
Összességében a H-score értékek alapján a CPT1A-expresszió szignifikánsan magasabb volt a LAM-sejtekben, mint a BSM-sejtekben ( $P < 0,01$ ) (18. ábra).

#### 4.4.3.4. Acetát-felvétel és -hasznosítás

Az MCT1 (monokarboxilát-transzporter – pl. laktát és acetát) expressziója 11-ből 7 esetben (64%), az ACSS2 (az acetát-hasznosítás kulcsenzime) expressziója 11-ből 9 esetben (82%) volt magas a LAM-sejtekben (17. ábra). Ezzel ellentétben BSM-sejtekben az összes esetben alacsony volt vagy hiányzott mind az MCT1, mind az ACSS2 expressziója. Ennek megfelelően az MCT1 és ACSS2 H-score értékek is szignifikánsan magasabbak voltak a LAM-sejtekben, mint a BSM-sejtekben ( $P < 0,01$ ) (18. ábra).



17. ábra. A p-S6, a Rictor, a GluT1, a GAPDH, az ATPB, a GLS, az MCT1, az ACSS2 és a CPT1A H-score értékei a betegek LAM-sejtjeiben. Az immunhisztokémiai vizsgálat során megfigyelt H-score értékeket az alábbiak szerint kategorizáltuk: nincs expresszió (negatív) – H-score  $\leq 10$ ; alacsony expresszió – H-score 11-100, magas expresszió – H-score  $> 100$ .



**18. ábra.** Az mTOR-jelátvitel és a metabolikus folyamatok markereinek expressziója a LAM- és BSM-sejtekben. A p-S6, a Rictor, a GAPDH, a GLS, az MCT1, az ACSS2 és a CPT1A expressziója szignifikánsan magasabb volt a LAM-sejtekben, mint a BSM-sejtekben. Ezzel szemben a GluT1 és az ATPB expressziójában nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget. \*  $P \leq 0,01$  (Wilcoxon-féle előjeles rangpróba).

#### **4.4.4. Korreláció az mTOR-jelátvitelhez kapcsolható fehérjék és a metabolikus markerek között**

Munkánk során az mTOR-jelátvitelhez kapcsolható fehérjék (p-S6, Rictor) és a metabolikus folyamatokban kulcsszerepet játszó enzimek, transzporterek expressziója közötti összefüggéseket is vizsgáltuk. A LAM-sejtekben erős pozitív korrelációt figyeltünk meg a p-S6 és a GLS expressziója ( $\rho = 0,732$ ;  $P = 0,01$ ), valamint a Rictor és az ACSS2 expressziója ( $\rho = 0,849$ ;  $P < 0,01$ ) között. A Rictor és ACSS2 közötti pozitív korreláció a BSM-sejtekben is megjelent ( $\rho = 0,769$ ;  $P < 0,01$ ).

#### **4.4.5. Az mTOR- és metabolikus markerek expressziójának összefüggései a klinikopatológiai adatokkal**

A Rictor és az ATPB expressziója magasabb volt az explantált végállapotú tüdőkből, mint a betegség korábbi stádiumát reprezentáló diagnosztikus biopsziákban. A CPT1A-expresszió és az ösztrogén-receptor pozitivitást között pedig erős pozitív korrelációt figyeltünk meg ( $\rho = 0,808$ ;  $P < 0,01$ ). Egyéb összefüggést nem találtunk a vizsgált fehérjék expressziója és a klinikopatológiai adatok között.



## 5. MEGBESZÉLÉS

### 5.1. Az mTORC1/2-aktivitás jelentősége primer adenocarcinomákban és agyi metasztázisaikban

A tüdőrák világszerte vezető daganatos halálok és az agyi áttétek jelentős része (40-50%-a) szintén a tüődaganatok hematogén terjedéséhez köthető. A tüdő adenocarcinomái esetén sincs ez másként, az agyi metasztázisok sok esetben megjelennek a betegség progressziója során, tovább rontva az egyébként is kedvezőtlen prognózist [296-298]. A terápiás lehetőségek korlátozottak, így a klinikai kimenetel javítását célzó személyre szabott kezelési lehetőségek vizsgálata, az eredményesen gátolható terápiás célpontok azonosítása új reményeket hozhat a központi idegrendszeri érintettséggel járó, előrehaladott tüdő adenocarcinoma kezelésében.

Vizsgálatunk során primer tüdő adenocarcinomákban és tüdő adenocarcinomák agyi áttéteiben potenciális célzott terápiás targetként az mTORC1 és mTORC2 aktivitását elemeztük immunhisztokémiai módszerrel. Az alkalmazott immunhisztokémiai panel alapján az mTORC1-aktivitásra a p-mTOR (aktív mTOR-kináz) és a p-S6 (mTORC1 downstream targetje), az mTORC2-aktivitásra a p-mTOR és a Rictor (mTORC2 mennyiségét jelző vázfehérje) expressziója alapján következtettünk. A klinikopatológiai jellemzőktől függetlenül a primer adenocarcinomák 30%-ára, az agyi áttétek 70%-ára volt jellemző a fokozott mTORC1-aktivitás. Ezek az eredmények megfelelnek az irodalmi adatoknak, amelyek szerint a tüődaganatokra jellemző az mTOR jelátviteli út hiperaktivációja. Korábbi tanulmányok szerint a fokozott mTOR-aktivitás korrelál a távoli metasztázisok megjelenésével és a kedvezőtlenebb túléléssel [299-302].

A tüdő adenocarcinomák agyi metasztázisainak vonatkozásában lényegesen kevesebb információ érhető el. Kimutatták, hogy az mTOR jelátviteli útvonalnak az epitheliális-mesenchymális tranzíció szabályozásával fontos szerepe lehet az áttétképződésben és aktivációja agyi metasztázisok esetén is megjelenhet. Az mTORC1 és C2 gátlása a metasztatikus potenciál csökkenését eredményezte ezekben a vizsgálatokban [303-304].

Eredményeink megerősítik az utóbbi néhány évben publikált adatokat, amelyek számos, az agyi áttétek kialakulásának hátterében álló, mTOR-jelátvitellel kapcsolatos mechanizmusra rávilágítottak. Azonosították a PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonal azon genetikai variációit is (SNP-k, egyedi nukleotid-polimorfizmusok), amelyek

hozzájárulhatnak a tüdődaganatok központi idegrendszeri terjedéséhez: az *AKT1* rs2498804 és rs2494732, valamint a *PIK3CA* rs2699887 variáns alléljait hordozó betegeknél szignifikánsan magasabb volt az agyi áttét kialakulásának esélye [305]. Az mTOR jelátviteli útvonal tumorszuppresszor génjei közül pedig az *STK11*-vesztés vagy haploinsufficiencia [306] és a *PTEN*-vesztés [307] szintén összefüggést mutatott a központi idegrendszeri áttétképzéssel.

Vizsgálatunkból kiemelendő továbbá, hogy a p-mTOR és a Rictor expresszióját együttesen értékelve a primer daganatok 16%-ában, az agyi metasztázisok 51%-ában volt magas mindkét marker expressziója, ami felveti az mTORC2 jelentőségét az agyi metasztázisok patobiológiájában. A közelmúltban *Cheng és mtsai* az mTORC2 fontos aktivációs mechanizmusaként azonosították a *RICTOR*-amplifikáció megjelenését, amit a tüdődaganatok 13%-ában (ezen belül a tüdő adenocarcinomák 10,3%-ában) figyeltek meg [235]. Ezen felül a Rictort több vizsgálatban is az áttétképzés fontos szabályozójaként azonosították, expressziója összefüggést mutatott emlődaganatok nyirokcsomó áttéteinek [308] és melanomák májmetasztázisainak [309] kialakulásával is.

Az mTORC2 szerepét az áttétképzési folyamatokban megerősíti az is, hogy a vizsgált primer tumor-agyi áttét párokban a Rictor expressziója már a primer daganatok 67%-ában magas volt, míg a többi esetben – ahol az agyi áttétek kialakulásáról nem volt információnk – a daganatok csupán 28%-ában detektáltunk magas Rictor-expressziót. Ezen felül a magasabb Rictor-expresszió összefüggést mutatott az előrehaladottabb stádiummal is a vizsgált primer adenocarcinomákban. Egy közelmúltban megjelent tanulmány az mTORC2 aktivitását jelző p(Ser473)-Akt expresszióját vizsgálta primer nem-kissejtes tüdődaganatokban. Eredményeinkhez hasonlóan megállapították, hogy az mTORC2-aktivitás fontos tényező lehet az agyi metasztázisok kialakulásában: expresszió hiányában vagy alacsony p-Akt-expresszió esetén 16%, míg közepes vagy magas p-Akt-expresszió esetén 39% volt az agyi áttétek incidenciája [310].

A kezdeti ígéretes eredmények ellenére az mTORC1-gátlókkal végzett klinikai vizsgálatok nem hozták meg a várt sikert a tüdődaganatok kezelésében [261, 311]. A terápiás sikertelenség hátterében számos mechanizmus állhat, ezek közül az egyik legfontosabb a prediktív markerek és ennek következtében a megfelelő betegszelekció hiánya, valamint az mTORC2-aktivitás jelenléte. Az mTORC2 aktivációja a daganatban megjelenő genetikai eltérések (pl. *PIK3CA*-mutáció, *PTEN*-vesztés vagy *RICTOR*-

amplifikáció) eredményeképpen is létrejöhet [198, 250]; jellemző azonban, hogy az mTORC1-gátlás következtében az inzulin receptor szubsztrát 1-en keresztül egy negatív visszacsatolási mechanizmus aktiválódik, ami a PI3K-on keresztül az mTORC2 aktivációját, így az mTORC1-gátló kezeléssel szembeni rezisztencia kialakulását hozza létre [191]. Az mTOR-jelátvitel új, ígéretes gátlói az mTOR-kináz ATP-kompetitív inhibitorai, amelyek az mTORC1 és mTORC2 aktivitását is gátolják – hiszen az mTOR-kináz képezi mindkét komplex katalitikus alegységét [171]. Alátámasztva az mTORC2 jelentőségét a metasztázisok kialakulásában, egy közelmúltban megjelent tanulmány preklinikai modellben igazolta az mTORC1/2-gátló MTI-31 hatékonyságát a daganat növekedésének, az epitheliális-mesenchymális tranzíciónak és az áttétképződésnek a gátlásában nem-kissejtes tüdődaganatokban [312]. Az mTORC1 és mTORC2 aktivitásának, illetve ezek arányainak megállapítása, továbbá a prediktív markerek azonosítása tovább segítheti a célzott terápiás törekvéseket. Az mTOR-gátló kezelés prediktív markereiként az általunk használt immunhisztokémiai reakciók vizsgálata is megfontolandó.

Összefoglalásként elmondható, hogy az általunk megfigyelt magas mTORC1- és mTORC2-aktivitás felhívja a figyelmet az mTOR jelátviteli út gátlóinak potenciális szerepére a primer és áttéti tüdő adenocarcinomák kezelésében. Az mTOR-inhibitorok a vér-agy gáton átjutva [313, 314] lassíthatják a központi idegrendszeri áttétek növekedését és ezáltal enyhíthetik a neurológiai tünetek súlyosságát, ami nagymértékben befolyásolhatja az életminőséget és az életkilátásokat. A mTORC1- és mTORC2-aktivitás vizsgálata a betegek tumorszöveteiben és az ennek megfelelő kezelés növelheti az mTOR-gátlók hatékonyságát a tüdődaganatok terápiájában.

## **5.2. A RICTOR-amplifikáció és az mTORC2-aktivitás mint terápiás target kissejtes tüdődaganatokban**

Az SCLC rendkívül agresszív daganattípus, ami hozzávetőlegesen 15%-át teszi ki a tüdőcarcinomáknak [315]. A legtöbb betegnél a tumort már előrehaladott stádiumban diagnosztizálják, ami nagyrészt a kezdetben tünetszegény daganat gyors növekedésének és korai disszeminációjának a következménye. Az utóbbi évtizedek intenzív célzott terápiás törekvései ellenére az SCLC kezelésében nem történt érdemi előrelépés az elmúlt

20-30 évben, a terápia standardját – és lényegében egyetlen elérhető opcióját – ma is a platinabázisú kemoterápiás kezelés jelenti [66, 316].

A genomikai instabilitás SCLC-kben kiemelten magas, a genetikai aberrációk pedig elsősorban a sejtciklust szabályozó géneket és a PI3K/Akt/mTOR jelátviteli út tagjait érintik [66]. A közelmúltban a *RICTOR*-t az egyik leggyakrabban amplifikált génként azonosították SCLC-kben, az amplifikáció a daganatok egy részében az egyetlen célzott terápiás szerrel gátolható genetikai eltérést jelenti [68, 248, 249, 317], így kimutatása a személyre szabott kezelésben is jelentőséggel bírhat. A *RICTOR*-amplifikáció prediktív szerepét több tanulmányban leírták [250, 318] és fázis II klinikai vizsgálatok is indultak, amelyekben az mTORC1/2-gátló vistusertib hatékonyságát vizsgálják *RICTOR*-amplifikált daganatokban [175].

Vizsgálatunkban a *RICTOR*-amplifikáció előfordulását, valamint a Rictor és a p(Ser473)-Akt fehérjék expresszióját elemeztük SCLC-kben. Korábbi tanulmányokban a *RICTOR*-amplifikáció prevalenciáját 6-14% közötti értéként határozták meg [175, 248-250, 317]. A *RICTOR*-amplifikáció gyakorisága az általunk vizsgált mintákban ennél némileg magasabb, 15% volt. A tanulmányokban megfigyelt eltérő gyakoriság hátterében a különböző kohorszok eltérő klinikopatológiai sajátosságai állhatnak. Vizsgálatunk az első tanulmány, ami a Rictor és a p-Akt immunhisztokémiai expresszióját elemzi SCLC-kben. A *RICTOR* FISH módszerrel meghatározott amplifikációját gold standard eljárásnak tekintve a Rictor IHC szenzitivitása 93%, specificitása 73%, míg a p-Akt IHC szenzitivitása 80%, specificitása 65% volt a *RICTOR*-amplifikáció kimutatásában. A vizsgált minták közül csupán egy *RICTOR*-amplifikált tumor volt negatív Rictor IHC-val. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a Rictor IHC – a FISH-nél olcsóbb, gyorsabb és egyszerűbben kivitelezhető eljárásként – alkalmas lehet a *RICTOR*-amplifikáció előszűrésére.

A Rictor és a p-Akt immunhisztokémiai pozitivitását több esetben *RICTOR*-amplifikáció hiányában is megfigyeltük. A jelenség hátterében számos mechanizmus állhat, úgymint egyéb mTOR-jelátvitelt érintő aberrációk, különféle epigenetikai modifikációk vagy a miRNS-expresszió zavara, ahogyan ezt már más daganattípusokban is leírták [319-323].

A Rictor expressziója mind mRNS-, mind fehérje szinten magasabb a távoli metasztázisokban, mint a primer tumorban, ezt adenocarcinomákkal kapcsolatos

vizsgálatunkban mi is megfigyeltük, illetve melanómák májáttéteinél is igazolták [309]. A Rictor expressziója SCLC-k esetén is szignifikánsan magasabb volt a távoli áttétekben, mint a primer daganatokban vagy a nyirokcsomóáttétekben. Mindez arra utal, hogy az mTORC2 és ennek részeként a Rictor fontos szerepet játszik a távoli áttétek kialakulásában.

Egy korábbi vizsgálatban 42 SCLC beteg mintáján végzett genetikai analízis alapján a *RICTOR*-amplifikáció és a kedvezőtlenebb túlélés között szignifikáns összefüggést találtak [250]. Ezt a megfigyelést 92 beteg mintáján végzett *RICTOR* FISH vizsgálattal nem tudtuk megerősíteni, azonban a magas Rictor- és p-Akt-expresszió rövidebb teljes túléléssel társult, ahogyan ezt az összefüggést már több egyéb daganattípusban is megfigyelték [309, 324-328]. Ez arra utalhat, hogy a magas Rictor- és p-Akt-expresszió által meghatározott fokozott mTORC2-aktivitás jobb előjelzője lehet a túlélésnek, mint önmagában a *RICTOR*-amplifikáció igazolása.

A Rictor a daganatokban gyakran szabályozási zavart szenvedő PI3K/Akt/mTOR jelátviteli út fontos tagja [329]. Korábbi vizsgálatokban leírták, hogy a *RICTOR* amplifikációjának igazolása prediktív markerként használható azon betegek kiválasztásához, akik legjobban reagálhatnak az mTORC1/2-gátló kezelésre [235, 250, 318]. Eredményeink felvetik, hogy a magas Rictor- és p-Akt-expressziót mutató SCLC-k *RICTOR*-amplifikáció hiányában is jól reagálhatnak az mTORC1/2-gátló kezelésre, ezért érdemes lenne ezeket a betegeket bevonni az ilyen irányú vizsgálatokba.

*In vitro* vizsgálatainkban *RICTOR*-amplifikációt és az mTOR jelátviteli út egyéb aktiváló genetikai eltéréseit (*PIK3CA*-mutáció és -amplifikáció, *AKT*-amplifikáció) hordozó SCLC sejtvonalakat vizsgáltunk. A 4 SCLC sejtvonal közül 3 érzékeny volt az mTORC1-gátló rapamycin kezelésre, csupán a DMS153 (nem *RICTOR*-amplifikált, de *RICTOR*-mutáns és *PIK3CA*-amplifikált) sejtvonal bizonyult rapamycin rezisztensnek. A PI3K/mTOR-gátló dactolisib a rapamycinhez hasonló, *PIK3CA*-amplifikációtól és / vagy -mutációtól független hatást mutatott a vizsgált sejtvonalakban – a H196, H1048 és H146 sejtvonalak érzékenyek, a DMS153 rezisztensnek bizonyult a kezeléssel szemben. A proliferáció-csökkentő hatás tekintetében az mTORC1/2-gátlók voltak a leghatékonyabbak, kiemelten a vistusertib, amely mind a 4 sejtvonalban jelentős proliferáció-csökkenést eredményezett.

Vizsgálatunk alátámasztja, hogy az mTORC1/2-gátlók eredményesek lehetnek a *RICTOR*-amplifikált daganatok kezelésében, ugyanakkor egyéb, az mTOR-jelátvitel aktivációját eredményező eltérés esetén is hatékonyak bizonyulhatnak. Kiemelendő a H1048 sejtvonallal fokozott érzékenysége az mTOR-jelút inhibitoraival szemben – az alkalmazott gátlószerek közül mindegyik ebben a sejtvonallal eredményezte a legjelentősebb antiproliferatív hatást. A H1048 sejtvonallal az PI3K/Akt/mTOR jelátviteli út komplex aberrációit hordozza (kettős *PIK3CA*-mutáció és *AKT3*-amplifikáció), ez hozzájárulhat az mTOR-jelátvitel fokozott aktivitásához és ennek következtében az mTOR-jelút gátlóival szembeni fokozott érzékenységhez. Hasonló jelenséget emlődaganatokban már megfigyeltek, a *PIK3CA* kettős mutációja a PI3K-inhibitor alpelisibbel szemben fokozott érzékenységet eredményezett [330].

Az mTOR-gátlók fokozhatják a hagyományos kemoterápiás szerek – beleértve a ciszplatin – hatását is [173], továbbá fontos szerepük lehet a rezisztencia megelőzésében, illetve visszafordításában [331]. Eredményeink felvetik a kombinációs kezelés lehetőségét az SCLC terápiájában, azonban ez még további vizsgálatokat igényel.

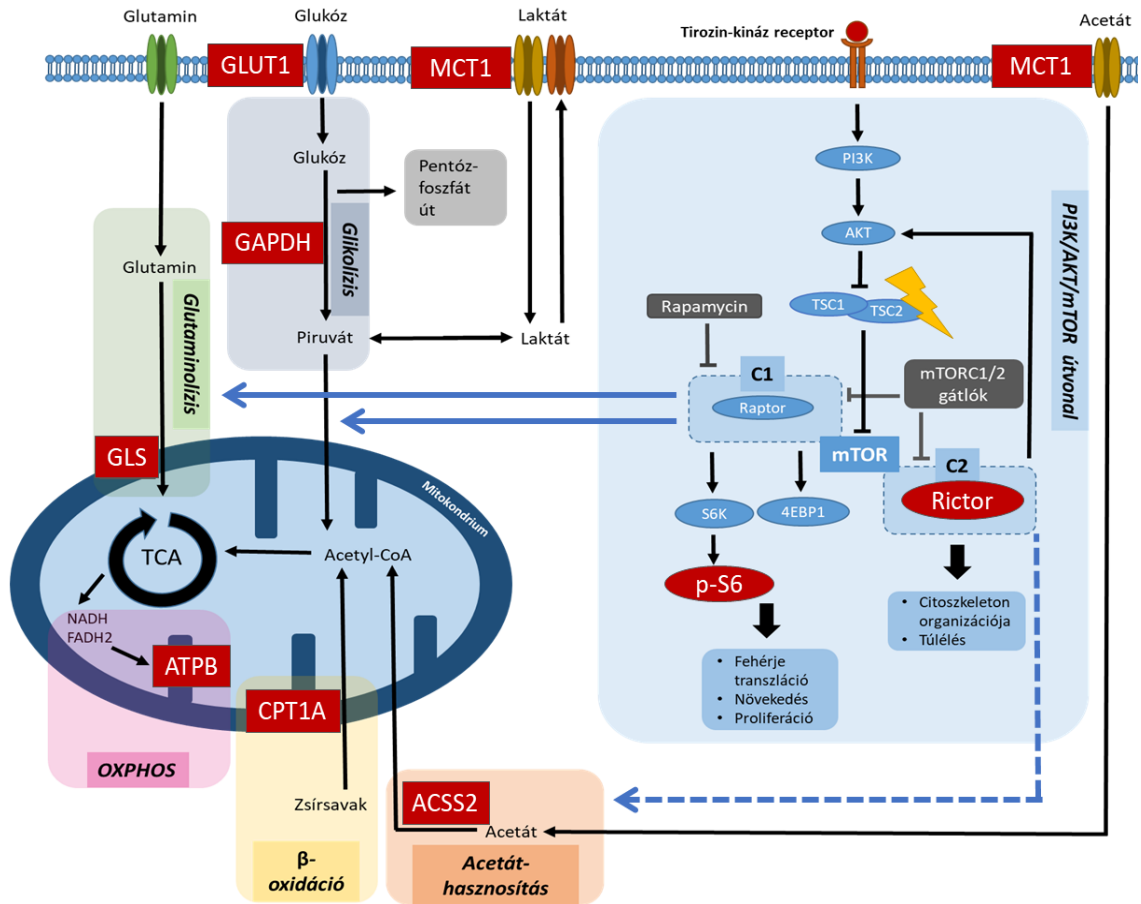
Összességében eredményeink megerősítik, hogy az mTORC1/2-gátlók ígéretes terápiás lehetőséget jelentenek az SCLC-k személyre szabott terápiájában, azonban alkalmazásuk feltételei és lehetőségei, valamint prediktív markereik azonosítása további vizsgálatokat tesz szükségessé. Az mTORC1/2-aktiváció az SCLC-k egy részében a *RICTOR*-amplifikáció helyett más mechanizmussal is létrejöhet, ami mTOR-gátlókkal szembeni érzékenységet eredményez. Ennek megfelelően, ezeket a betegeket is érdemes lenne bevonni az mTORC1/2-gátlókkal végzett klinikai vizsgálatokba. Az mTORC1/2-gátlók alkalmazása kiemelten eredményes lehet azokban az SCLC-kban, ahol a *RICTOR*-amplifikáció az egyetlen célozható onkogén „driver”. A Rictor IHC megbízható és költséghatékony eljárásként alkalmazható a *RICTOR*-amplifikáció előszűrésére, az IHC eredménye alapján pedig az amplifikáció igazolására további megerősítő *RICTOR* FISH vizsgálat végezhető. Az mTORC1/2-gátlók lehetséges prediktív biomarkereinek azonosítása során a genetikai eltérések vizsgálatán túl a fehérjeszintű biomarkerek elemzése is megfontolandó, amelyek vizsgálata alapján kiválaszthatók lennének azok a betegek, akik várhatóan legkedvezőbben reagálnak az mTORC1/2-gátló kezelésre.

### **5.3. Az mTOR-komplexek és az anyagcsere-folyamatok összefüggései lymphangiomiomatosisban**

Az mTOR jelátviteli útvonal fontos szerepet játszik a transzláció, a sejtnövekedés, a proliferáció, a citoskeleton reorganizáció és az anyagcsere szabályozásában [171, 332]. A vizsgált LAM mintákban a p-S6 (az mTORC1 downstream targetje) és a Rictor (az mTORC2 vázfehérjeje) expresszióját elemeztük, így következtettünk az mTORC1 és C2 jelenlétére és aktivitására. A p-S6 expresszióját csaknem mindegyik esetben (91%) megfigyeltük, ugyanakkor a minták 55%-ára a Rictor expressziója is jellemző volt. A LAM esetek többségében megfigyelt magas mTORC1-aktivitás alátámasztja a korábbi ismereteket, miszerint a betegség hátterében álló *TSC1/2*-mutáció eredményeképpen az mTORC1-aktivitás fokozódása a LAM kialakulásának egyik kulcslépése [129, 144, 259]. Eredményeink azonban kiemelik, hogy nemcsak az mTORC1-nek, hanem az mTORC2-nek is szerepe lehet a LAM patobiológiájában.

Az előbbieket mellett elsőként vizsgáltuk az mTOR-jelátvitel és különböző anyagcsere-folyamatok – úgymint glikolízis, oxidatív foszforiláció, glutaminolízis, zsírsav-oxidáció és acetát-hasznosítás – összefüggéseit humán LAM mintákban (19. ábra).

A GLS, a CPT1A, az MCT1 és az ACSS2 fokozott expresszióját figyeltük meg a LAM-sejtekben, ami arra utal, hogy a glutaminolízis, a zsírsavak  $\beta$ -oxidációja és az acetát-hasznosítás kiemelt szerepet játszhat ezen sejtek metabolizmusában. A glutaminolízis jelentőségére már korábbi *in vitro* vizsgálatokban rávilágítottak, amelyekben a humán eredetű LAM-sejtek problémás *in vitro* fenntarthatósága miatt [333] *TSC2*-deficiens egér embrionális fibroblaszt sejteket használtak a LAM-sejtek modelljeként [334, 335]. Az acetát és a lipidek energiaforrásként történő hasznosítását már szintén megfigyelték különböző daganatsejtekben [231, 234]. Immunhisztokémiai eredményeink arra utalnak, hogy a LAM-sejtek is hasznosíthatják az acetátot és a zsírsavakat, továbbá a CPT1A-expresszió és az ösztrogén-receptor pozitivitás között megfigyelt pozitív korreláció arra hívja fel a figyelmet, hogy a LAM-sejtek zsíryanagyseréje az ösztrogén szabályozó hatása alatt állhat, ahogyan ezt emlő- és endometriumcarcinomákban már hasonlóképpen leírták [336, 337].



**19. ábra. A PI3K/Akt/mTOR jelátvitel és a bioenergetikai útvonalak egyszerűsített ábrája.** Piros háttérszínnel kerültek kiemelésre azok a fehérjék, amelyek expresszióját immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk. A LAM sejtekben a *TSC1* vagy – gyakrabban – a *TSC2* mutáció eredményeképpen az mTOR-jelátvitel fokozott aktivitása jön létre. Az mTOR-komplexek központi szerepet játszanak az anyagcsere-folyamatok szabályozásában, beleértve a glükóz, a glutamin, az acetát és a lipidek metabolizmusát. Közelmúltban megjelent tanulmányok alapján [143, 217] az mTORC1 fokozhatja a glikolízist és a glutaminolízist (folytonos kék vonalakkal jelölve). LAM sejtekben az mTORC1 és a glutaminolízis közötti pozitív korrelációt sikerült igazolnunk. Ezen felül a Rictor és az ACSS2 expressziója között is erős pozitív korrelációt találtunk, ami arra utal, hogy az mTORC2 fokozhatja a LAM-sejtek acetát-hasznosító képességét (szaggatott kék vonallal jelölve).



A LAM-sejtek és a normál kontrollként vizsgált BSM-sejtek között nem figyeltünk meg jelentős különbséget a GluT1 és az ATPB expressziójában, mindkét marker a LAM- és BSM-sejtekben egyaránt viszonylag alacsony expressziót mutatott. Mindez arra utalhat, hogy a LAM-sejtekben a glükóz-felvétel és az oxidatív foszforiláció alacsony aktivitással működhet. Az alacsony glükóz-felvételt az a klinikai megfigyelés is alátámasztja, amely szerint a LAM FDG-PET vizsgálattal nem mutatható ki, az FDG nem dúsul a kóros tüdőszövet LAM-nodulusaiban [142]. Ezzel szemben egy közelmúltban megjelent tanulmány – megerősítve a magas ACSS2-expresszióval kapcsolatos eredményeinket – a LAM preklinikai modelljében igazolta, hogy a *TSC2*-mutáns sejtek felveszik az acetátot (és a kolint), ennél fogva a <sup>18</sup>F-fluoroacetát (és a <sup>18</sup>F-fluorokolin) PET jól használható módszer lehet a LAM vizsgálatára a képalkotó diagnosztikában [338].

Az mTOR jelátviteli útvonal és a bioenergetikai folyamatok gátlása fontos szerepet tölthet be a daganatok személyre szabott terápiájában [143, 171, 172, 332, 339]. Az mTORC1-gátló sirolimust eredményesen alkalmazzák a LAM kezelésében [154], azonban a mellékhatások és a rezisztencia kialakulása jelentősen ronthatják a terápiás eredményeket [340, 341]. Vizsgálatunk alapján a LAM patobiológiájában nemcsak az mTORC1-nek, hanem az mTORC2-nek is fontos szerepe lehet, ezért az mTORC1-et és C2-t egyaránt gátló mTOR-kináz inhibitoroknak is lehet további jelentősége a LAM kezelésében, különösen azonban az esetekben, amelyek magas mTORC2-aktivitással jellemezhetők. A Rictor immunhisztokémiai vizsgálata segítséget nyújthat azon betegek kiválasztásában, akik várhatóan kedvezőbben reagálnak az mTORC1/2-inhibitor kezelésre.

Az mTOR jelátviteli út és a metabolikus folyamatok markerei közötti összefüggéseket vizsgálva az találtuk, hogy a p-S6 (mTORC1) és a GLS (glutaminolízis), valamint a Rictor (mTORC2) és az ACSS2 (acetát-hasznosítás) expressziója erős pozitív korrelációt mutat. Ezek az összefüggések azt is jelenthetik, hogy az mTORC1 és az mTORC2 inhibitorai nemcsak az mTOR-jelútra kifejtett gátlás révén érik el hatásukat, hanem az mTOR-komplexek által szabályozott metabolikus folyamatokat – jelen esetben a glutaminolízist és az acetát-hasznosítást – is befolyásolhatják, ami hozzájárulhat a terápiás hatás kialakulásához. Az mTOR-gátlókon felül vizsgálatunk több olyan potenciális terápiás targetre irányítja a figyelmet (pl. ACSS2), amelyek további vizsgálatra érdemesek.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy vizsgálatunk az első humán LAM mintákon végzett tanulmány, amelyben nemcsak a – korábban már leírt – mTORC1-hiperaktivásra utaló p-S6 overexpressziót igazoltuk, hanem a Rictor és különböző anyagcserefolyamatok kulcsenzimeinek expresszióját is vizsgáltuk. Eredményeink az mTORC2 és egyes metabolikus folyamatok – kiemelten a glutaminolízis, az acetát-hasznosítás és a lipid anyagcsere – jelentőségére és potenciális terápiás célpontként való hasznosíthatóságára is felhívják a figyelmet.

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK

### I. Primer tüdő adenocarcinomák és agyi áttétek immunhisztokémiai vizsgálata során igazoltuk, hogy:

1. A p-mTOR, a p-S6 és a Rictor fokozott expressziója a primer tüdő adenocarcinomák 30-40%-ára, az agyi áttétek 65-80%-ára jellemző, mindhárom marker expressziója szignifikánsan magasabb tüdő adenocarcinomák agyi metasztázisaiban, mint primer tüdő adenocarcinomákban.
2. Az mTOR-aktivitás az áttétképzés során fokozódik, a magas Rictor-expresszió a primer tumorban jelezheti a későbbi áttétképzést.

### II. Kissejtes tüdődaganatok vizsgálata során tett megfigyeléseink:

1. *RICTOR*-amplifikáció esetén magasabb a Rictor- és a p(Ser473)-Akt-expresszió, a Rictor immunhisztokémia magas szenzitivitással (93%) és közepes-magas specificitással (73%) használható a *RICTOR*-amplifikáció előszűrésére.
2. A Rictor expressziója szignifikánsan magasabb a kissejtes tüdődaganatok távoli áttéteiben, mint a primer tumorokban, ami az mTORC2 potenciális szerepére utal az áttétképzés folyamatában.
3. A Rictor és a p(Ser473)-Akt magas szintje a *RICTOR*-amplifikáció jelenlététől függetlenül szignifikánsan rövidebb teljes túléléssel társul.
4. Az mTORC1/2-gátlók jelentős antiproliferatív hatással rendelkeznek *in vitro* a *RICTOR*-amplifikált és az PI3K/Akt/mTOR jelátviteli út egyéb eltéréseit hordozó SCLC sejtvonalakban.

### III. Az mTOR-jelátvitelhez és a tumormetabolizmushoz kapcsolódó fehérjék vizsgálata lymphangiomiomatosisban:

1. A fokozott mTORC1-aktivitás mellett a magas Rictor-expresszió az esetek több, mint felében, valamint a magasabb Rictor-expresszió a végállapotú tüdőkből vett mintákban az mTORC2-aktivitás jelentőségére utal a betegség patobiológiájában és progressziójában.

2. A LAM-sejtek anyagcseréjében a glutaminolízis, a zsírsavak  $\beta$ -oxidációja és az acetát-hasznosítás fontos szerepet játszhat, a p-S6 és a GLS, valamint a Rictor és az ACSS2 korrelációja pedig felveti, hogy az mTOR-gátlók terápiás hatásához a bioenergetikai folyamatok befolyásolása is hozzájárul.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az mTOR jelátviteli útvonal a homeosztázis fontos regulátora, számos környezeti jelet integrálva szabályozza a sejtek növekedését, proliferációját és metabolizmusát. Az mTOR-jelátvitel hiperaktivációja gyakori tüdődaganatokban és célzott terápiás targetként szolgálhat. Az mTOR-gátló terápia hatásait számos vizsgálat tanulmányozta különböző daganatokban, eddig azonban csak néhány hatóanyag került törzskönyvezésre. Az mTOR-gátlók klinikai transzlációjának elmaradását eredményező tényezők közül az egyik legfontosabb a megfelelő betegszelekciót lehetővé tevő prediktív biomarkerek hiánya lehet. Munkánk során ezért az mTOR-komplexek aktivitását vizsgáltuk tüdődaganatokban, valamint az mTOR jelátviteli úthoz kapcsolódóan különböző metabolikus folyamatok kulcsenzimeinek expresszióját elemeztük LAM mintákban.

ADC-kben a p-mTOR, a p-S6 és a Rictor expressziója szignifikánsan magasabb volt az agyi áttétekben, mint a primer daganatokban. Az mTOR-aktivitás az áttétképzés során fokozódott, továbbá eredményeink alapján a magas Rictor-expresszió a primer tumorban jelezheti a későbbi áttétképzést.

Az SCLC mintákban a *RICTOR* gén amplifikációjának prevalenciája 15% volt. Igazoltuk, hogy a Rictor IHC 93%-os szenzitivitással eredményesen használható a *RICTOR* FISH előszűrési módszereként. Az ADC-khez hasonlóan a Rictor expressziója SCLC-k esetén is magasabb volt a távoli áttétekben, továbbá mind a Rictor, mind a p-Akt expressziója – a *RICTOR*-amplifikáció jelenlététől függetlenül – rövidebb teljes túléléssel társult. Az mTORC1/2-gátlók hatékonyan csökkentették a vizsgált – mTOR-jelű különböző genetikai eltéréseit hordozó – SCLC sejtvonalak proliferációját *in vitro*.

A fokozott mTORC1-aktivitás mellett az esetek 55%-ában megfigyelt magas Rictor-expresszió, illetve a végállapotú tüdőkből vett mintákban a magasabb Rictor-expresszió az mTORC2-aktivitás jelentőségére utal a LAM patobiológiájában és progressziójában. A glutaminolízis, a zsírsavak  $\beta$ -oxidációja és az acetát-hasznosítás fontos szerepet játszhat a LAM-sejtek anyagcseréjében; a p-S6 és a GLS, valamint a Rictor és az ACSS2 korrelációja pedig felveti, hogy az mTOR-gátlók terápiás hatásához a bioenergetikai folyamatok befolyásolása is hozzájárul.

Eredményeink alátámasztják, hogy az mTORC1- és C2-aktivitás karakterizálása segítheti a terápiás döntést, valamint a meghatározó bioenergetikai útvonalak azonosítása új célzott terápiás lehetőséget jelenthet a tüdődaganatok kezelésében.

## 8. SUMMARY

As a master regulator of homeostasis, the mTOR pathway integrates several environmental signals to regulate cell growth, proliferation, and metabolism. Hyperactivation of the mTOR signaling frequently occurs in lung neoplasms and may serve as a target for personalized therapy. Several mTOR pathway inhibitors are under clinical development; but to date, only a few compounds have been approved for the treatment of different tumors. One of the most important barriers to the clinical translation of mTOR pathway inhibitors is the lack of predictive biomarkers for patient selection. Therefore, we investigated the activity of the mTOR complexes in lung neoplasms and, in relation to the mTOR pathway, the expression of proteins involved in tumor metabolism in LAM.

In lung ADCs, the expression of p-mTOR, p-S6 and Rictor was significantly higher in brain metastases than in primary tumors. The mTOR activity increased during metastasis formation, moreover, our results suggest that high Rictor expression in the primary tumor can predict subsequent metastasis formation.

In SCLC, we observed *RICTOR* amplification with a prevalence of 15%. The sensitivity of Rictor IHC was 93% suggesting that it may be a useful prescreening method to select cases for *RICTOR* FISH. Similarly to ADCs, Rictor expression was higher in distant metastases of SCLCs, moreover, high expression of Rictor and p-Akt – even without *RICTOR* amplification – was associated with decreased overall survival. The mTORC1/2 inhibitors showed a remarkable antiproliferative effect *in vitro* on the studied SCLC cell lines with genetic alterations in the mTOR pathway.

In addition to the increased mTORC1 activity, high expression of Rictor in 55% of the cases, and higher Rictor expression in the end-stage lungs indicate the importance of mTORC2 activity in the pathobiology and progression of LAM. Glutaminolysis, fatty acid  $\beta$ -oxidation, and acetate utilization may have an important role in LAM cell metabolism; and the positive correlation between p-S6 and GLS as well as Rictor and ACSS2 suggest that mTOR inhibitors can also influence bioenergetic processes, which may contribute to their therapeutic effects.

Our results suggest that characterization of the mTORC1 and C2 activity can guide treatment decisions. Moreover, identification of preferred bioenergetics pathways may also represent a promising opportunity for personalized therapy of lung neoplasms.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Gibson GJ, Loddenkemper R, Lundbäck B, Sibille Y. (2013) Respiratory health and disease in Europe: the new European Lung White Book. *Eur Respir J*, 42(3):559-563.
2. Witschi H. (2001) A Short History of Lung Cancer. *Toxicological Sciences*, 64(1):4-6.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6):394-424.
4. Fidler MM, Bray F, Soerjomataram I. (2018) The global cancer burden and human development: A review. *Scand J Public Health*, 46(1):27-36.
5. Cheng TY, Cramb SM, Baade PD, Youlden DR, Nwogu C, Reid ME. (2016) The International Epidemiology of Lung Cancer: Latest Trends, Disparities, and Tumor Characteristics. *J Thorac Oncol*, 11(10):1653-1671.
6. Bogos K, Ostoros G. (2019) Tüdörák. *Korányi Bulletin*, 1:32-41.
7. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, Geisinger K, Hirsch FR, Ishikawa Y, Kerr KM, Noguchi M, Pelosi G, Powell CA, Tsao MS, Wistuba I, WHO Panel. (2015) The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*, 10(9):1243-1260.
8. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JH, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier JP, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang PC, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelewitz D. (2011) International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 6(2):244-285.

9. Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. (2013) New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol*, 31(8):992-1001.
10. Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. (2017) The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest*, 151(1):193-203.
11. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WE, Nicholson AG, Groome P, Mitchell A, Bolejack V, International Association for the Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee, Advisory Boards, and Participating Institutions, International Association for the Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee Advisory Boards and Participating Institutions. (2016) The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol*, 11(1):39-51.
12. Nicholson AG, Tsao MS, Travis WD, Patil DT, Galateau-Salle F, Marino M, Dacic S, Beasley MB, Butnor KJ, Yatabe Y, Pass HI, Rusch VW, Detterbeck FC, Asamura H, Rice TW, Rami-Porta R. (2018) Eighth Edition Staging of Thoracic Malignancies: Implications for the Reporting Pathologist. *Arch Pathol Lab Med*, 142(5):645-661.
13. Eguchi T, Kadota K, Park BJ, Travis WD, Jones DR, Adusumilli PS. (2014) The new IASLC-ATS-ERS lung adenocarcinoma classification: what the surgeon should know. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 26(3):210-222.
14. Popper HH. (2016) Progression and metastasis of lung cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 35(1):75-91.
15. Luo YH, Luo L, Wampfler JA, Wang Y, Liu D, Chen YM, Adjei AA, Midthun DE, Yang P. (2019) 5-year overall survival in patients with lung cancer eligible or ineligible for screening according to US Preventive Services Task Force criteria: a prospective, observational cohort study. *Lancet Oncol*, 20(8):1098-1108.
16. Fukui T, Shaykhiev R, Agosto-Perez F, Mezey JG, Downey RJ, Travis WD, Crystal RG. (2013) Lung adenocarcinoma subtypes based on expression of human airway basal cell genes. *Eur Respir J*, 42(5):1332-1344.
17. Wistuba II, Gazdar AF. (2006) Lung cancer preneoplasia. *Annu Rev Pathol*, 1:331-348.



18. Ostoros G. (2001) A tüdőrák és a mellhártya elsődleges rosszindulatú megbetegedéseinek diagnosztikája és kezelése – Irányelvek 2001. *Medicina Thoracalis*, 54:1-24.
19. Kadota K, Suzuki K, Kachala SS, Zabor EC, Sima CS, Moreira AL, Yoshizawa A, Riely GJ, Rusch VW, Adusumilli PS, Travis WD. (2012) A grading system combining architectural features and mitotic count predicts recurrence in stage I lung adenocarcinoma. *Mod Pathol*, 25(8):1117-1127.
20. Sica G, Yoshizawa A, Sima CS, Azzoli CG, Downey RJ, Rusch VW, Travis WD, Moreira AL. (2010) A grading system of lung adenocarcinomas based on histologic pattern is predictive of disease recurrence in stage I tumors. *Am J Surg Pathol*, 34(8):1155-1162.
21. Travis WD, Brambilla E, Geisinger KR. (2016) Histological grading in lung cancer: one system for all or separate systems for each histological type? *Eur Respir J*, 47(3):720-723.
22. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ Jr, Wu YL, Paz-Ares L. (2017) Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet*, 389(10066):299-311.
23. Lang-Lazdunski L. (2013) Surgery for nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir Rev*, 22(129):382-404.
24. Han H, Chen H. (2017) Selective lymph node dissection in early-stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis*, 9(7):2102-2107.
25. Shen-Tu Y, Mao F, Pan Y, Wang W, Zhang L, Zhang H, Cheng B, Guo H, Wang Z. (2017) Lymph node dissection and survival in patients with early stage nonsmall cell lung cancer: A 10-year cohort study. *Medicine (Baltimore)*, 96(43):e8356.
26. Navarria P, De Rose F, Ascolese AM. (2015) SBRT for lung oligometastases: Who is the perfect candidate? *Rep Pract Oncol Radiother*, 20(6):446-453.
27. Baker S, Dahele M, Lagerwaard FJ, Senan S. (2016) A critical review of recent developments in radiotherapy for non-small cell lung cancer. *Radiat Oncol*, 11(1):115.
28. De Ruyscher D, Lambrecht M, van Baardwijk A, Peeters S, Reymen B, Verhoeven K, Wanders R, Öllers M, van Elmpt W, van Loon J. (2017) Standard of care in

- high-dose radiotherapy for localized non-small cell lung cancer. *Acta Oncol*, 56(11):1610-1613.
29. Decker RH, Lynch TJ. (2012) Unmet challenges in the use of novel agents in locally advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 30(6):582-584.
  30. Nieder C, Tollali T, Yobuta R, Reigstad A, Flatoy LR, Pawinski A. (2017) Palliative Thoracic Radiotherapy for Lung Cancer: What Is the Impact of Total Radiation Dose on Survival? *J Clin Med Res*, 9(6):482-487.
  31. NSCLC Meta-analysis Collaborative Group. (2014) Preoperative chemotherapy for non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Lancet*, 383(9928):1561-1571.
  32. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, Escriu C, Peters S, ESMO Guidelines Committee. (2017) Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 28(suppl\_4):iv1-iv21.
  33. McElnay P, Lim E. (2014) Adjuvant or neoadjuvant chemotherapy for NSCLC. *J Thorac Dis*, 6(Suppl 2):S224-S227.
  34. Gálffy G. (2018) A metasztatikus nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) citotoxikus kemoterápiája és a fenntartó kezelés lehetőségei. *Medicina Thoracalis*, 71(5):339-345.
  35. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, Mok TS, Reck M, Van Schil PE, Hellmann MD, Peters S, ESMO Guidelines Committee. (2018) Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 29(Suppl 4):iv192-iv237.
  36. Cancer Genome Atlas Research Network. (2014) Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*, 511(7511):543-550.
  37. Ozaki T1, Nakagawara A. (2011) Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel)*, 3(1):994-1013.
  38. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. (2018) The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, 553(7689):446-454.
  39. Jänne PA, Yang JC, Kim DW, Planchard D, Ohe Y, Ramalingam SS, Ahn MJ, Kim SW, Su WC, Horn L, Haggstrom D, Felip E, Kim JH, Frewer P, Cantarini M,

- Brown KH, Dickinson PA, Ghiorghiu S, Ranson M. (2015) AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 372(18):1689-1699.
40. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, 350(21):2129-2139.
  41. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. (2004) EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 304(5676):1497-1500.
  42. Planchard D, Loriot Y, André F, Gobert A, Auger N, Lacroix L, Soria JC. (2015) EGFR-independent mechanisms of acquired resistance to AZD9291 in EGFR T790M-positive NSCLC patients. *Ann Oncol*, 26(10):2073-2078.
  43. Schrank Z, Chhabra G, Lin L, Iderzorig T, Osude C, Khan N, Kuckovic A, Singh S, Miller RJ, Puri N. (2018) Current Molecular-Targeted Therapies in NSCLC and Their Mechanism of Resistance. *Cancers (Basel)*, 10(7). pii: E224.
  44. Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, Iafrate AJ, Varella-Garcia M, Fox SB, Riely GJ, Solomon B, Ou SH, Kim DW, Salgia R, Fidias P, Engelman JA, Gandhi L, Jänne PA, Costa DB, Shapiro GI, Lorusso P, Ruffner K, Stephenson P, Tang Y, Wilner K, Clark JW, Shaw AT. (2012) Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol*, 13(10):1011-1019.
  45. Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, Kutateladze TG, Le AT, Weickhardt AJ, Kondo KL, Linderman DJ, Heasley LE, Franklin WA, Varella-Garcia M, Camidge DR. (2012) Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 18(5):1472-1482.
  46. Horn L, Pao W. (2009) EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 27(26):4232-4235.
  47. Shaw AT, Engelman JA. (2014) Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 370(26):2537-2539.

48. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, Massion PP, Siwak-Tapp C, Gonzalez A, Fang R, Mark EJ, Batten JM, Chen H, Wilner KD, Kwak EL, Clark JW, Carbone DP, Ji H, Engelman JA, Mino-Kenudson M, Pao W, Iafrate AJ. (2012) ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol*, 30(8):863-870.
49. Shaw AT, Riely GJ, Bang YJ, Kim DW, Camidge DR, Solomon BJ, Varella-Garcia M, Iafrate AJ, Shapiro GI, Usari T, Wang SC, Wilner KD, Clark JW, Ou SI. (2019) Crizotinib in ROS1-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): updated results, including overall survival, from PROFILE 1001. *Ann Oncol*, 30(7):1121-1126.
50. Planchard D, Smit EF, Groen HJM, Mazieres J, Besse B, Helland Å, Giannone V, D'Amelio AM Jr, Zhang P, Mookerjee B, Johnson BE. (2017) Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 18(10):1307-1316.
51. Fife BT, Bluestone JA. (2008) Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev*, 224:166-82.
52. Norum J, Nieder C. (2018) Tobacco smoking and cessation and PD-L1 inhibitors in non-small cell lung cancer (NSCLC): a review of the literature. *ESMO Open*, 3(6):e000406.
53. Melosky B, Juergens R, Hirsh V, McLeod D, Leighl N, Tsao MS, Card PB, Chu Q. (2019) Amplifying Outcomes: Checkpoint Inhibitor Combinations in First-Line Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncologist*, pii: theoncologist.2019-0027.
54. Rocco D, Della Gravara L, Battiloro C, Gridelli C. (2019) The role of combination chemo-immunotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, 19(7):561-568.
55. Shafique M, Tanvetyanon T. (2019) Immunotherapy alone or chemo-immunotherapy as front-line treatment for advanced non-small cell lung cancer. *Expert Opin Biol Ther*, 19(3):225-232.
56. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, Lichtor T, Decker WK, Whelan RL, Kumara HMCS, Signori E, Honoki K, Georgakilas AG, Amin A, Helderich WG, Boosani CS, Guha G, Ciriolo MR, Chen S, Mohammed SI, Azmi

- AS, Keith WN, Bilsland A, Bhakta D, Halicka D, Fujii H, Aquilano K, Ashraf SS, Newsheen S, Yang X, Choi BK, Kwon BS. (2015) Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol*, 35 Suppl:S185-S198.
57. Pardoll DM. (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 12(4):252-264.
  58. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, Chow LQ, Vokes EE, Felip E, Holgado E, Barlesi F, Kohlhäufel M, Arrieta O, Burgio MA, Fayette J, Lena H, Poddubskaya E, Gerber DE, Gettinger SN, Rudin CM, Rizvi N, Crinò L, Blumenschein GR Jr, Antonia SJ, Dorange C, Harbison CT, Graf Finckenstein F, Brahmer JR. (2015) Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 373(17):1627-1639.
  59. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, Antonia S, Pluzanski A, Vokes EE, Holgado E, Waterhouse D, Ready N, Gainor J, Arén Frontera O, Havel L, Steins M, Garassino MC, Aerts JG, Domine M, Paz-Ares L, Reck M, Baudelet C, Harbison CT, Lestini B, Spigel DR. (2015) Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 373(2):123-135.
  60. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, Gottfried M, Peled N, Tafreshi A, Cuffe S, O'Brien M, Rao S, Hotta K, Leiby MA, Lubiniecki GM, Shentu Y, Rangwala R, Brahmer JR, KEYNOTE-024 Investigators. (2016) Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 375(19):1823-1833.
  61. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, Yokoi T, Chiappori A, Lee KH, de Wit M, Cho BC, Bourhaba M, Quantin X, Tokito T, Mekhail T, Planchard D, Kim YC, Karapetis CS, Hirt S, Ostoros G, Kubota K, Gray JE, Paz-Ares L, de Castro Carpeño J, Wadsworth C, Melillo G, Jiang H, Huang Y, Dennis PA, Özgüroğlu M, PACIFIC Investigators. (2017) Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 377(20):1919-1929.
  62. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, Gadgeel SM, Hida T, Kowalski DM, Dols MC, Cortinovis DL, Leach J, Polikoff J, Barrios

- C, Kabbinavar F, Frontera OA, De Marinis F, Turna H, Lee JS, Ballinger M, Kowanetz M, He P, Chen DS, Sandler A, Gandara DR, OAK Study Group. (2017) Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet*, 389(10066):255-265.
63. Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, Nogami N, Rodríguez-Abreu D, Moro-Sibilot D, Thomas CA, Barlesi F, Finley G, Kelsch C, Lee A, Coleman S, Deng Y, Shen Y, Kowanetz M, Lopez-Chavez A, Sandler A, Reck M, IMpower150 Study Group. (2018) Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *N Engl J Med*, 378(24):2288-2301.
64. Ancevski Hunter K, Socinski MA, Villaruz LC. (2018) PD-L1 Testing in Guiding Patient Selection for PD-1/PD-L1 Inhibitor Therapy in Lung Cancer. *Mol Diagn Ther*, 22(1):1-10.
65. Yi M, Jiao D, Xu H, Liu Q, Zhao W, Han X, Wu K. (2018) Biomarkers for predicting efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors. *Mol Cancer*, 17(1):129.
66. Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD. (2017) Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward. *Nat Rev Cancer*, 17(12):725-737.
67. Miyoshi T, Umemura S, Matsumura Y, Mimaki S, Tada S, Makinoshima H, Ishii G, Udagawa H, Matsumoto S, Yoh K, Niho S, Ohmatsu H, Aokage K, Hishida T, Yoshida J, Nagai K, Goto K, Tsuboi M, Tsuchihara K. (2017) Genomic Profiling of Large-Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Lung. *Clin Cancer Res*, 23(3):757-765.
68. Simbolo M, Mafficini A, Sikora KO, Fassan M, Barbi S, Corbo V, Mastracci L, Rusev B, Grillo F, Vicentini C, Ferrara R, Pilotto S, Davini F, Pelosi G, Lawlor RT, Chilosi M, Tortora G, Bria E, Fontanini G, Volante M, Scarpa A. (2017) Lung neuroendocrine tumours: deep sequencing of the four World Health Organization histotypes reveals chromatin-remodelling genes as major players and a prognostic role for TERT, RB1, MEN1 and KMT2D. *J Pathol*, 241(4):488-500.
69. Travis WD, Rush W, Flieder DB, Falk R, Fleming MV, Gal AA, Koss MN. (1998) Survival analysis of 200 pulmonary neuroendocrine tumors with clarification of criteria for atypical carcinoid and its separation from typical carcinoid. *Am J Surg Pathol*, 22(8):934-944.

70. Hendifar AE, Marchevsky AM, Tuli R. (2017) Neuroendocrine Tumors of the Lung: Current Challenges and Advances in the Diagnosis and Management of Well-Differentiated Disease. *J Thorac Oncol*, 12(3):425-436.
71. Pesch B, Kendzia B, Gustavsson P, Jöckel KH, Johnen G, Pohlabein H, Olsson A, Ahrens W, Gross IM, Brüske I, Wichmann HE, Merletti F, Richiardi L, Simonato L, Fortes C, Siemiatycki J, Parent ME, Consonni D, Landi MT, Caporaso N, Zaridze D, Cassidy A, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, Lissowska J, Stücker I, Fabianova E, Dumitru RS, Bencko V, Foretova L, Janout V, Rudin CM, Brennan P, Boffetta P, Straif K, Brüning T. (2012) Cigarette smoking and lung cancer--relative risk estimates for the major histological types from a pooled analysis of case-control studies. *Int J Cancer*, 131(5):1210-1219.
72. Torres-Durán M, Ruano-Ravina A, Kelsey KT, Parente-Lamelas I, Provencio M, Leiro-Fernández V, Abal-Arca J, Montero-Martínez C, Vidal-Garcia I, Pena C, Castro-Añón O, Golpe-Gómez A, Martínez C, Guzmán-Taveras R, Mejuto-Martí MJ, Fernández-Villar A, Barros-Dios JM. (2016) Small cell lung cancer in never-smokers. *Eur Respir J*, 47(3):947-953.
73. Travis WD. (2012) Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Mod Pathol*, 25(Suppl 1):S18-S30.
74. Vallières E, Shepherd FA, Crowley J, Van Houtte P, Postmus PE, Carney D, Chansky K, Shaikh Z, Goldstraw P, International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee and Participating Institutions. (2009) The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals regarding the relevance of TNM in the pathologic staging of small cell lung cancer in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol*, 4(9):1049-1059.
75. Fisseler-Eckhoff A, Demes M. (2012) Neuroendocrine tumors of the lung. *Cancers (Basel)*, 4(3):777-798.
76. Ferrer L, Giaj Levra M, Brevet M, Antoine M, Mazieres J, Rossi G, Chiari R, Westeel V, Poudenx M, Letreut J, Gervais R, Osman G, Girard N, Toffart AC, Novello S, Moro-Sibilot D. (2019) A Brief Report of Transformation From NSCLC to SCLC: Molecular and Therapeutic Characteristics. *J Thorac Oncol*, 14(1):130-134.

77. Niederst MJ, Sequist LV, Poirier JT, Mermel CH, Lockerman EL, Garcia AR, Katayama R, Costa C, Ross KN, Moran T, Howe E, Fulton LE, Mulvey HE, Bernardo LA, Mohamoud F, Miyoshi N, VanderLaan PA, Costa DB, Jänne PA, Borger DR, Ramaswamy S, Shioda T, Iafrate AJ, Getz G, Rudin CM, Mino-Kenudson M, Engelman JA. (2015) RB loss in resistant EGFR mutant lung adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer. *Nat Commun*, 6:6377.
78. Gálffy G. (2018) Diagnosis and treatment of the neuroendocrine tumors of the lung. *Magy Onkol*, 62(2):113-118.
79. Schneider BJ, Saxena A, Downey RJ. (2011) Surgery for early-stage small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw*, 9(10):1132-1139.
80. Agócs L, Rényi-Vámos F. (2018) A tüdőrák sebészi kezelése. *Medicina Thoracalis*, 71(5):325-333.
81. de Hoyos A, DeCamp MM. (2014) Surgery for small cell lung cancer. *Thorac Surg Clin*, (4):399-409.
82. Schneider BJ. (2008) Management of recurrent small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw*, 6(3):323-331.
83. Alvarado-Luna G, Morales-Espinosa D. (2016) Treatment for small cell lung cancer, where are we now?-a review. *Transl Lung Cancer Res*, 5(1):26-38.
84. Slotman B, Faivre-Finn C, Kramer G, Rankin E, Snee M, Hatton M, Postmus P, Collette L, Musat E, Senan S, EORTC Radiation Oncology Group and Lung Cancer Group. (2007) Prophylactic cranial irradiation in extensive small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 357(7):664-672.
85. Yang S, Zhang Z, Wang Q. (2019) Emerging therapies for small cell lung cancer. *J Hematol Oncol*, 12(1):47.
86. Ostoros G. (2018) Új remények a kissejtes tüdőrák korszerű gyógyszeres kezelésében. *Medicina Thoracalis*, 21(4):235-240.
87. Calvo E, Moreno V, Flynn M, Holgado E, Olmedo ME, Lopez Criado MP, Kahatt C, Lopez-Vilariño JA, Siguero M, Fernandez-Teruel C, Cullell-Young M, Soto Matos-Pita A, Forster M. (2017) Antitumor activity of lurbinectedin (PM01183) and doxorubicin in relapsed small-cell lung cancer: results from a phase I study. *Ann Oncol*, 28(10):2559-2566.



88. Chen H, Dy G, Groman A, Farrell E, Miller A, Bushunow P, Adjei A. (2017) A Phase II Study of Etrinetecan Pegol (NKTR-102) in Patients with Chemotherapy-Resistant Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*, 12(11):S1800-S1801.
89. George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretić L, Kong G, Leenders F, Lu X, Fernández-Cuesta L, Bosco G, Müller C, Dahmen I, Jahchan NS, Park KS, Yang D, Karnezis AN, Vaka D, Torres A, Wang MS, Korbel JO, Menon R, Chun SM, Kim D, Wilkerson M, Hayes N, Engelmann D, Pützer B, Bos M, Michels S, Vlastic I, Seidel D, Pinther B, Schaub P, Becker C, Altmüller J, Yokota J, Kohno T, Iwakawa R, Tsuta K, Noguchi M, Muley T, Hoffmann H, Schnabel PA, Petersen I, Chen Y, Soltermann A, Tischler V, Choi CM, Kim YH, Massion PP, Zou Y, Jovanovic D, Kontic M, Wright GM, Russell PA, Solomon B, Koch I, Lindner M, Muscarella LA, la Torre A, Field JK, Jakopovic M, Knezevic J, Castañós-Vélez E, Roz L, Pastorino U, Brustugun OT, Lund-Iversen M, Thunnissen E, Köhler J, Schuler M, Botling J, Sandelin M, Sanchez-Cespedes M, Salvesen HB, Achter V, Lang U, Bogus M, Schneider PM, Zander T, Ansén S, Hallek M, Wolf J, Vingron M, Yatabe Y, Travis WD, Nürnberg P, Reinhardt C, Perner S, Heukamp L, Büttner R, Haas SA, Brambilla E, Peifer M, Sage J, Thomas RK. (2015) Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*, 524(7563):47-53.
90. Hendriks LEL, Menis J, Reck M. (2019) Prospects of targeted and immune therapies in SCLC. *Expert Rev Anticancer Ther*, 19(2):151-167.
91. Sabari JK, Lok BH, Laird JH, Poirier JT, Rudin CM. (2017) Unravelling the biology of SCLC: implications for therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 14(9):549-561.
92. Sharp A, Bhosle J, Abdelraouf F, Popat S, O'Brien M, Yap TA. (2016) Development of molecularly targeted agents and immunotherapies in small cell lung cancer. *Eur J Cancer*, 60:26-39.
93. Kalari S, Jung M, Kernstine KH, Takahashi T, Pfeifer GP. (2013) The DNA methylation landscape of small cell lung cancer suggests a differentiation defect of neuroendocrine cells. *Oncogene*, 32(30):3559-3568.
94. Saito Y, Nagae G, Motoi N, Miyauchi E, Ninomiya H, Uehara H, Mun M, Okumura S, Ohyanagi F, Nishio M, Satoh Y, Aburatani H, Ishikawa Y. (2016) Prognostic significance of CpG island methylator phenotype in surgically resected small cell lung carcinoma. *Cancer Sci* 107(3):320-325.

95. Gadgeel SM. (2018) Targeted Therapy and Immune Therapy for Small Cell Lung Cancer. *Curr Treat Options Oncol*, 19(11):53.
96. Cardnell RJ, Li L, Sen T, Bara R, Tong P, Fujimoto J, Ireland AS, Guthrie MR, Bheddah S, Banerjee U, Kalu NN, Fan YH, Dylla SJ, Johnson FM, Wistuba II, Oliver TG, Heymach JV, Glisson BS, Wang J, Byers LA. (2017) Protein expression of TTF1 and cMYC define distinct molecular subgroups of small cell lung cancer with unique vulnerabilities to aurora kinase inhibition, DLL3 targeting, and other targeted therapies. *Oncotarget*, 8(43):73419-73432.
97. Faber AC, Farago AF, Costa C, Dastur A, Gomez-Caraballo M, Robbins R, Wagner BL, Rideout WM 3rd, Jakubik CT, Ham J, Edelman EJ, Ebi H, Yeo AT, Hata AN, Song Y, Patel NU, March RJ, Tam AT, Milano RJ, Boisvert JL, Hicks MA, Elmiligy S, Malstrom SE, Rivera MN, Harada H, Windle BE, Ramaswamy S, Benes CH, Jacks T, Engelman JA. (2015) Assessment of ABT-263 activity across a cancer cell line collection leads to a potent combination therapy for small-cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(11):E1288-1296.
98. Byers LA, Wang J, Nilsson MB, Fujimoto J, Saintigny P, Yordy J, Giri U, Peyton M, Fan YH, Diao L, Masrourpour F, Shen L, Liu W, Duchemann B, Tumula P, Bhardwaj V, Welsh J, Weber S, Glisson BS, Kalhor N, Wistuba II, Girard L, Lippman SM, Mills GB, Coombes KR, Weinstein JN, Minna JD, Heymach JV. (2012) Proteomic profiling identifies dysregulated pathways in small cell lung cancer and novel therapeutic targets including PARP1. *Cancer Discov*, 2(9):798-811.
99. Singh R, Kaur B, Farmer PB. (2005) Detection of DNA damage derived from a direct acting ethylating agent present in cigarette smoke by use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chem Res Toxicol*, 18(2):249-256.
100. Owonikoko TK, Dahlberg SE, Sica GL, Wagner LI, Wade JL 3rd, Srkalovic G, Lash BW, Leach JW, Leal TB, Aggarwal C, Ramalingam SS. (2019) Randomized Phase II Trial of Cisplatin and Etoposide in Combination With Veliparib or Placebo for Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer: ECOG-ACRIN 2511 Study. *J Clin Oncol*, 37(3):222-229.
101. Pietanza MC, Waqar SN, Krug LM, Dowlati A, Hann CL, Chiappori A, Owonikoko TK, Woo KM, Cardnell RJ, Fujimoto J, Long L, Diao L, Wang J, Benschman Y,

- Hurtado B, de Groot P, Sulman EP, Wistuba II, Chen A, Fleisher M, Heymach JV, Kris MG, Rudin CM, Byers LA. (2018) Randomized, Double-Blind, Phase II Study of Temozolomide in Combination With Either Veliparib or Placebo in Patients With Relapsed-Sensitive or Refractory Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*, 36(23):2386-2394.
102. Lok BH, Gardner EE, Schneeberger VE, Ni A, Desmeules P, Rekhtman N, de Stanchina E, Teicher BA, Riaz N, Powell SN, Poirier JT, Rudin CM. (2017) PARP Inhibitor Activity Correlates with SLFN11 Expression and Demonstrates Synergy with Temozolomide in Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 23(2):523-535.
103. Lawson MH, Cummings NM, Rassl DM, Vowler SL, Wickens M, Howat WJ, Brenton JD, Murphy G, Rintoul RC. (2010) Bcl-2 and  $\beta$ 1-integrin predict survival in a tissue microarray of small cell lung cancer. *Br J Cancer*, 103(11):1710-1715.
104. Baggstrom MQ, Qi Y, Koczywas M, Argiris A, Johnson EA, Millward MJ, Murphy SC, Erlichman C, Rudin CM, Govindan R, Mayo Phase 2 Consortium, California Consortium. (2011) A phase II study of AT-101 (Gossypol) in chemotherapy-sensitive recurrent extensive-stage small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 6(10):1757-1760.
105. Langer CJ, Albert I, Ross HJ, Kovacs P, Blakely LJ, Pajkos G, Somfay A, Zatloukal P, Kazarnowicz A, Moezi MM, Schreeder MT, Schnyder J, Ao-Baslock A, Pathak AK, Berger MS, GEM017 Investigators. (2014) Randomized phase II study of carboplatin and etoposide with or without obatoclax mesylate in extensive-stage small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 85(3):420-428.
106. Melichar B, Adenis A, Lockhart AC, Bennouna J, Dees EC, Kayaleh O, Obermannova R, DeMichele A, Zatloukal P, Zhang B, Ullmann CD, Schusterbauer C. (2015) Safety and activity of alisertib, an investigational aurora kinase A inhibitor, in patients with breast cancer, small-cell lung cancer, non-small-cell lung cancer, head and neck squamous-cell carcinoma, and gastro-oesophageal adenocarcinoma: a five-arm phase 2 study. *Lancet Oncol*, 16(4):395-405.
107. Saunders LR, Bankovich AJ, Anderson WC, Aujay MA, Bheddah S, Black K, Desai R, Escarpe PA, Hampl J, Laysang A, Liu D, Lopez-Molina J, Milton M, Park A, Pysz MA, Shao H, Slingerland B, Torgov M, Williams SA, Foord O, Howard P, Jassem J, Badzio A, Czapiewski P, Harpole DH, Dowlati A, Massion PP, Travis

- WD, Pietanza MC, Poirier JT, Rudin CM, Stull RA, Dylla SJ. (2015) A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo. *Sci Transl Med*, 7(302):302ra136.
108. Morgensztern D, Besse B, Greillier L, Santana-Davila R, Ready N, Hann CL, Glisson BS, Farago AF, Dowlati A, Rudin CM, Moulec SL, Lally S, Yalamanchili S, Wolf J, Govindan R, Carbone DP. (2019) Efficacy and Safety of Rovalpituzumab Tesirine in Third-Line and Beyond Patients with DLL3-Expressing, Relapsed/Refractory Small-Cell Lung Cancer: Results From the Phase II TRINITY Study. *Clin Cancer Res*, 25(23):6958-6966.
109. Rudin CM, Pietanza MC, Bauer TM, Ready N, Morgensztern D, Glisson BS, Byers LA, Johnson ML, Burris HA 3rd, Robert F, Han TH, Bheddah S, Theiss N, Watson S, Mathur D, Vennapusa B, Zayed H, Lally S, Strickland DK, Govindan R, Dylla SJ, Peng SL, Spigel DR, SCRX16-001 investigators. (2017) Rovalpituzumab tesirine, a DLL3-targeted antibody-drug conjugate, in recurrent small-cell lung cancer: a first-in-human, first-in-class, open-label, phase 1 study. *Lancet Oncol*, 18(1):42-51.
110. Wang S, Zimmermann S, Parikh K, Mansfield AS, Adjei AA. (2019) Current Diagnosis and Management of Small-Cell Lung Cancer. *Mayo Clin Proc*, 94(8):1599-1622.
111. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, Yuan J, Wong P, Ho TS, Miller ML, Rekhtman N, Moreira AL, Ibrahim F, Bruggeman C, Gasmı B, Zappasodi R, Maeda Y, Sander C, Garon EB, Merghoub T, Wolchok JD, Schumacher TN, Chan TA1. (2015) Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*, 348(6230):124-128.
112. Schultheis AM, Scheel AH, Ozretić L, George J, Thomas RK, Hagemann T, Zander T, Wolf J, Buettner R. (2015) PD-L1 expression in small cell neuroendocrine carcinomas. *Eur J Cancer*, 51(3):421-426.
113. Chung HC, Lopez-Martin JA, Chuan-Hao Kao S, Miller WH, Ros W, Gao B, Marabelle A, Gottfried M, Zer A, Delord JP, Penel N, Jalal SI, Xu L, Zeigenfuss S, Pruitt SK, Piha-Paul SA. (2018) Phase 2 study of pembrolizumab in advanced

- small-cell lung cancer (SCLC): KEYNOTE-158. *J Clin Oncol*, 36(15\_suppl):8506-8506.
114. Reck M, Luft A, Szczesna A, Havel L, Kim SW, Akerley W, Pietanza MC, Wu YL, Zielinski C, Thomas M, Felip E, Gold K, Horn L, Aerts J, Nakagawa K, Lorigan P, Pieters A, Kong Sanchez T, Fairchild J, Spigel D. (2016) Phase III Randomized Trial of Ipilimumab Plus Etoposide and Platinum Versus Placebo Plus Etoposide and Platinum in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*, 34(31):3740-3748.
  115. Hellmann MD, Ott PA, Zugazagoitia J, Ready NE, Hann CL, De Braud FG, Antonia SJ, Ascierto PA, Moreno V, Atmaca A, Salvagni S, Taylor MH, Amin A, Camidge DR, Horn L, Calvo E, Cai W, Fairchild JP, Callahan MK, Spigel DR. (2017) Nivolumab (nivo) ± ipilimumab (ipi) in advanced small-cell lung cancer (SCLC): First report of a randomized expansion cohort from CheckMate 032. *J Clin Oncol*, 35(15\_suppl):8503-8503.
  116. Bumber Y. (2018) Tumor mutational burden (TMB) as a biomarker of response to immunotherapy in small cell lung cancer. *J Thorac Dis*, 10(8):4689-4693.
  117. El-Chemaly S, Henske EP. (2014) Towards personalised therapy for lymphangioleiomyomatosis: lessons from cancer. *Eur Respir Rev*, 23(131):30-35.
  118. Harari S, Torre O, Cassandro R, Moss J. (2015) The changing face of a rare disease: lymphangioleiomyomatosis. *Eur Respir J*, 46(5):1471-1485.
  119. Moir LM. (2016) Lymphangioleiomyomatosis: Current understanding and potential treatments. *Pharmacol Ther*, 158:114-124.
  120. El-Chemaly S, Henske EP. (2014) Towards personalised therapy for lymphangioleiomyomatosis: lessons from cancer. *Eur Respir Rev*, 23(131):30-5.
  121. Harknett EC, Chang WY, Byrnes S, Johnson J, Lazor R, Cohen MM, Gray B, Geiling S, Telford H, Tattersfield AE, Hubbard RB, Johnson SR. (2011) Use of variability in national and regional data to estimate the prevalence of lymphangioleiomyomatosis. *QJM*, 104(11):971-979.
  122. Moss J, Avila NA, Barnes PM, Litztenberger RA, Bechtel J, Brooks PG, Hedin CJ, Hunsberger S, Kristof AS. (2001) Prevalence and clinical characteristics of lymphangioleiomyomatosis (LAM) in patients with tuberous sclerosis complex. *Am J Respir Crit Care Med*, 164(4):669-671.

123. Taveira-DaSilva AM, Moss J. (2016) EPIDEMIOLOGY, PATHOGENESIS and DIAGNOSIS of LYMPHANGIOLEIOMYOMATOSIS. *Expert Opin Orphan Drugs*, 4(4):369-378.
124. Johnson SR. (2006) Lymphangiomyomatosis. *Eur Respir J*, 27(5):1056-65.
125. Matsumoto Y, Horiba K, Usuki J, Chu SC, Ferrans VJ, Moss J. (1999) Markers of cell proliferation and expression of melanosomal antigen in lymphangiomyomatosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 21(3):327-336.
126. Matsui K, Takeda K, Yu ZX, Valencia J, Travis WD, Moss J, Ferrans VJ. (2000) Downregulation of estrogen and progesterone receptors in the abnormal smooth muscle cells in pulmonary lymphangiomyomatosis following therapy. An immunohistochemical study. *Am J Respir Crit Care Med*, 161(3 Pt 1):1002-1009.
127. Kitaichi M, Nishimura K, Itoh H, Izumi T. (1995) Pulmonary lymphangiomyomatosis: a report of 46 patients including a clinicopathologic study of prognostic factors. *Am J Respir Crit Care Med*, 151(2 Pt 1):527-533.
128. Matsui K, Takeda K, Yu ZX, Travis WD, Moss J, Ferrans VJ. (2000) Role for activation of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of pulmonary lymphangiomyomatosis. *Arch Pathol Lab Med*, 124(2):267-275.
129. Smolarek TA, Wessner LL, McCormack FX, Mylet JC, Menon AG, Henske EP. (1998) Evidence that lymphangiomyomatosis is caused by TSC2 mutations: chromosome 16p13 loss of heterozygosity in angiomyolipomas and lymph nodes from women with lymphangiomyomatosis. *Am J Hum Genet*, 62(4):810-815.
130. Yu J, Astrinidis A, Henske EP. (2001) Chromosome 16 loss of heterozygosity in tuberous sclerosis and sporadic lymphangiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 164(8 Pt 1):1537-1540.
131. Harari S, Torre O, Moss J. (2011) Lymphangiomyomatosis: what do we know and what are we looking for? *Eur Respir Rev*, 20(119):34-44.
132. Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. (2003) Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol*, 13(15):1259-1268.

133. Goncharova EA, Goncharov DA, Li H, Pimtong W, Lu S, Khavin I, Krymskaya VP. (2011) mTORC2 is required for proliferation and survival of TSC2-null cells. *Mol Cell Biol*, 31(12):2484-2498.
134. Karbowiczek M, Zitserman D, Khabibullin D, Hartman T, Yu J, Morrison T, Nicolas E, Squillace R, Roegiers F, Henske EP. (2010) The evolutionarily conserved TSC/Rheb pathway activates Notch in tuberous sclerosis complex and *Drosophila* external sensory organ development. *J Clin Invest*, 120(1):93-102.
135. Lamb RF, Roy C, Diefenbach TJ, Vinters HV, Johnson MW, Jay DG, Hall A. (2000) The TSC1 tumour suppressor hamartin regulates cell adhesion through ERM proteins and the GTPase Rho. *Nat Cell Biol*, 2(5):281-287.
136. Neuman NA, Henske EP. (2011) Non-canonical functions of the tuberous sclerosis complex-Rheb signalling axis. *EMBO Mol Med*, 3(4):189-200.
137. Hayashi T, Fleming MV, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Moss J, Ferrans VJ, Travis WD. (1997) Immunohistochemical study of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in pulmonary lymphangioliomyomatosis (LAM). *Hum Pathol*, 28(9):1071-1078.
138. Lee PS, Tsang SW, Moses MA, Trayes-Gibson Z, Hsiao LL, Jensen R, Squillace R, Kwiatkowski DJ. (2010) Rapamycin-insensitive up-regulation of MMP2 and other genes in tuberous sclerosis complex 2-deficient lymphangioliomyomatosis-like cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 42(2):227-234.
139. Düvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, Triantafellow E, Ma Q, Gorski R, Cleaver S, Vander Heiden MG, MacKeigan JP, Finan PM, Clish CB, Murphy LO, Manning BD. (2010) Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*, 39(2):171-183.
140. Inoki K, Zhu T, Guan KL. (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115(5):577-590.
141. Jiang X, Kenerson H, Aicher L, Miyaoka R, Eary J, Bissler J, Yeung RS. (2008) The tuberous sclerosis complex regulates trafficking of glucose transporters and glucose uptake. *Am J Pathol*, 172(6):1748-1756.
142. Young LR, Franz DN, Nagarkatte P, Fletcher CDM, Wikenheiser-Brokamp KA, Galsky MD, Corbridge TC, Lam AP, Gelfand MJ, McCormack FX. (2009) Utility

- of [18F]2-fluoro-2-deoxyglucose-PET in sporadic and tuberous sclerosis-associated lymphangiomyomatosis. *Chest*, 136(3):926-933.
143. Medvetz D, Priolo C, Henske EP. (2015) Therapeutic targeting of cellular metabolism in cells with hyperactive mTORC1: a paradigm shift. *Mol Cancer Res*, 13(1):3-8.
  144. Adachi K, Miki Y, Saito R, Hata S, Yamauchi M, Mikami Y, Okada Y, Seyama K, Kondo T, Sasano H. (2015) Intracrine steroid production and mammalian target of rapamycin pathways in pulmonary lymphangiomyomatosis. *Hum Pathol*, 46(11):1685-1693.
  145. Usuki J, Horiba K, Chu SC, Moss J, Ferrans VJ. (1998) Immunohistochemical analysis of proteins of the Bcl-2 family in pulmonary lymphangiomyomatosis: association of Bcl-2 expression with hormone receptor status. *Arch Pathol Lab Med*, 122(10):895-902.
  146. Gu X, Yu JJ, Ilter D, Blenis N, Henske EP, Blenis J. (2013) Integration of mTOR and estrogen-ERK2 signaling in lymphangiomyomatosis pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(37):14960-14965.
  147. Yu JJ, Robb VA, Morrison TA, Ariazi EA, Karbowniczek M, Astrinidis A, Wang C, Hernandez-Cuebas L, Seeholzer LF, Nicolas E, Hensley H, Jordan VC, Walker CL, Henske EP. (2009) Estrogen promotes the survival and pulmonary metastasis of tuberin-null cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(8):2635-2640.
  148. Glassberg MK, Elliot SJ, Fritz J, Catanuto P, Potier M, Donahue R, Stetler-Stevenson W, Karl M. (2008) Activation of the estrogen receptor contributes to the progression of pulmonary lymphangiomyomatosis via matrix metalloproteinase-induced cell invasiveness. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(5):1625-1633.
  149. Eliasson AH, Phillips YY, Tenholder MF. (1989) Treatment of lymphangiomyomatosis. A meta-analysis. *Chest*, 96(6):1352-1355.
  150. Harari S, Cassandro R, Chiodini I, Taveira-DaSilva AM, Moss J. (2008) Effect of a gonadotrophin-releasing hormone analogue on lung function in lymphangiomyomatosis. *Chest*, 133(2):448-454.
  151. Taylor JR, Ryu J, Colby TV, Raffin TA. (1990) Lymphangiomyomatosis. Clinical course in 32 patients. *N Engl J Med*, 323(18):1254-1260.



152. Lu C, Lee HS, Pappas GP, Dilling DF, Burger CD, Shifren A, Veeraraghavan S, Chapman JT, Parambil J, Ruoss SJ, Young LR, Hammes SR, Koprass EJ, Roads T, Krischer JP, McCormack FX, Trial of an Aromatase Inhibitor in Lymphangiomyomatosis Group. (2017) A Phase II Clinical Trial of an Aromatase Inhibitor for Postmenopausal Women with Lymphangiomyomatosis. *Ann Am Thorac Soc*, 14(6):919-928.
153. McCormack FX, Gupta N, Finlay GR, Young LR, Taveira-DaSilva AM, Glasgow CG, Steagall WK, Johnson SR, Sahn SA, Ryu JH, Strange C, Seyama K, Sullivan EJ, Kotloff RM, Downey GP, Chapman JT, Han MK, D'Armiento JM, Inoue Y, Henske EP, Bissler JJ, Colby TV, Kinder BW, Wikenheiser-Brokamp KA, Brown KK, Cordier JF, Meyer C, Cottin V, Brozek JL, Smith K, Wilson KC, Moss J, ATS/JRS Committee on Lymphangiomyomatosis. (2016) Official American Thoracic Society/Japanese Respiratory Society Clinical Practice Guidelines: Lymphangiomyomatosis Diagnosis and Management. *Am J Respir Crit Care Med*, 194(6):748-761.
154. McCormack FX, Inoue Y, Moss J, Singer LG, Strange C, Nakata K, Barker AF, Chapman JT, Brantly ML, Stocks JM, Brown KK, Lynch JP 3rd, Goldberg HJ, Young LR, Kinder BW, Downey GP, Sullivan EJ, Colby TV, McKay RT, Cohen MM, Korbee L, Taveira-DaSilva AM, Lee HS, Krischer JP, Trapnell BC, National Institutes of Health Rare Lung Diseases Consortium, MILES Trial Group. (2011) Efficacy and safety of sirolimus in lymphangiomyomatosis. *N Engl J Med*, 364(17):1595-1606.
155. Yao J, Taveira-DaSilva AM, Jones AM, Julien-Williams P, Stylianou M, Moss J. (2014) Sustained effects of sirolimus on lung function and cystic lung lesions in lymphangiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 190(11):1273-1282.
156. Xu KF, Tian X, Yang Y, Zhang H. (2018) Rapamycin for lymphangiomyomatosis: optimal timing and optimal dosage. *Thorax*, 73(4):308-310.
157. Johnson SR, Cordier JF, Lazor R, Cottin V, Costabel U, Harari S, Reynaud-Gaubert M, Boehler A, Brauner M, Popper H, Bonetti F, Kingswood C, Review Panel of the ERS LAM Task Force. (2010) European Respiratory Society guidelines for the

- diagnosis and management of lymphangiomyomatosis. *Eur Respir J*, 35(1):14-26.
158. Ussavarungsi K, Hu X, Scott JP, Erasmus DB, Mallea JM, Alvarez F, Lee AS, Keller CA, Ryu JH, Burger CD. (2015) Mayo clinic experience of lung transplantation in pulmonary lymphangiomyomatosis. *Respir Med*, 109(10):1354-1359.
  159. El-Chemaly S, Goldberg HJ, Glanville AR. (2014) Should mammalian target of rapamycin inhibitors be stopped in women with lymphangiomyomatosis awaiting lung transplantation? *Expert Rev Respir Med*, 8(6):657-660.
  160. Xu KF, Tian X, Ryu JH. (2018) Recent advances in the management of lymphangiomyomatosis. *F1000Res*, 2018;7. pii: F1000 Faculty Rev-758.
  161. Bittmann I, Rolf B, Amann G, Löhns U. (2003) Recurrence of lymphangiomyomatosis after single lung transplantation: new insights into pathogenesis. *Hum Pathol*, 34(1):95-98.
  162. Karbowiczek M, Astrinidis A, Balsara BR, Testa JR, Lium JH, Colby TV, McCormack FX, Henske EP. (2003) Recurrent lymphangiomyomatosis after transplantation: genetic analyses reveal a metastatic mechanism. *Am J Respir Crit Care Med*, 167(7):976-982.
  163. Cai X, Pacheco-Rodriguez G, Fan QY, Haughey M, Samsel L, El-Chemaly S, Wu HP, McCoy JP, Steagall WK, Lin JP, Darling TN, Moss J. (2010) Phenotypic characterization of disseminated cells with TSC2 loss of heterozygosity in patients with lymphangiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 182(11):1410-1418.
  164. Crooks DM, Pacheco-Rodriguez G, DeCastro RM, McCoy JP Jr, Wang JA, Kumaki F, Darling T, Moss J. (2004) Molecular and genetic analysis of disseminated neoplastic cells in lymphangiomyomatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(50):17462-17467.
  165. Mitani K, Kumasaka T, Takemura H, Hayashi T, Gunji Y, Kunogi M, Akiyoshi T, Takahashi K, Suda K, Seyama K. (2009) Cytologic, immunocytochemical and ultrastructural characterization of lymphangiomyomatosis cell clusters in chylous effusions of patients with lymphangiomyomatosis. *Acta Cytol*, 53(4):402-409.

166. Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*, 28(10):721-726.
167. Eng CP, Sehgal SN, Vézina C. (1984) Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *J Antibiot (Tokyo)*, 37(10):1231-1237.
168. Martel RR, Klicius J, Galet S. (1977) Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol*, 55(1):48-51.
169. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. (1994) RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*, 78(1):35-43.
170. Sabers CJ, Martin MM, Brunn GJ, Williams JM, Dumont FJ, Wiederrecht G, Abraham RT. (1995) Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem*, 270(2):815-822.
171. Saxton RA, Sabatini DM. (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168(6):960-976.
172. Shimobayashi M, Hall MN. (2014) Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(3):155-162.
173. Tian T, Li X, Zhang J. (2019) mTOR Signaling in Cancer and mTOR Inhibitors in Solid Tumor Targeting Therapy. *Int J Mol Sci*, 20(3). pii: E755.
174. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. (2017) The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*, 170(4):605-635.
175. Gkoutakos A, Pilotto S, Mafficini A, Vicentini C, Simbolo M, Milella M, Tortora G, Scarpa A, Bria E, Corbo V. (2018) Unmasking the impact of Rictor in cancer: novel insights of mTORC2 complex. *Carcinogenesis*, 39(8):971-980.
176. Yip CK, Murata K, Walz T, Sabatini DM, Kang SA. (2010) Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Mol Cell*, 38(5):768-774.
177. Shaw RJ. (2009) LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol (Oxf)*, 196(1):65-80.
178. Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. (2008) Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol*, 10(8):935-945.

179. Mossmann D, Park S, Hall MN. (2018) mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer. *Nat Rev Cancer*, 18(12):744-757.
180. Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. (2002) Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev*, 16(12):1472-1487.
181. Ben-Sahra I, Howell JJ, Asara JM, Manning BD. (2013) Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science*, 339(6125):1323-1328.
182. Ben-Sahra I, Hoxhaj G, Ricoult SJH, Asara JM, Manning BD. (2016) mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science*, 351(6274):728-733.
183. Peterson TR, Sengupta SS, Harris TE, Carmack AE, Kang SA, Balderas E, Guertin DA, Madden KL, Carpenter AE, Finck BN, Sabatini DM. (2011) mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*, 146(3):408-20.
184. Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leever S, Griffiths JR, Chung YL, Schulze A. (2008) SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab*, 8(3):224-236.
185. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13(2):132-141.
186. Martina JA, Chen Y, Gucek M, Puertollano R. (2012) mTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy*, 8(6):903-914.
187. Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P. (2007) mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 $\alpha$  transcriptional complex. *Nature*, 450(7170):736-740.
188. Cam H, Easton JB, High A, Houghton PJ. (2010) mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1 $\alpha$ . *Mol Cell*, 40(4):509-520.
189. Dodd KM, Yang J, Shen MH, Sampson JR, Tee AR. (2015) mTORC1 drives HIF-1 $\alpha$  and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3. *Oncogene*, 34(17):2239-2250.

190. Tsang CK, Chen M, Cheng X, Qi Y, Chen Y, Das I, Li X, Vallat B, Fu LW, Qian CN, Wang HY, White E, Burley SK, Zheng XFS. (2018) SOD1 Phosphorylation by mTORC1 Couples Nutrient Sensing and Redox Regulation. *Mol Cell*, 70(3):502-515.e8.
191. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307(5712):1098-1101.
192. Kazyken D, Magnuson B, Bodur C, Acosta-Jaquez HA, Zhang D, Tong X, Barnes TM, Steinl GK, Patterson NE, Altheim CH, Sharma N, Inoki K, Cartee GD, Bridges D, Yin L, Riddle SM, Fingar DC. (2019) AMPK directly activates mTORC2 to promote cell survival during acute energetic stress. *Sci Signal*, 12(585). pii: eaav3249.
193. Luo Y, Xu W, Li G, Cui W. (2018) Weighing In on mTOR Complex 2 Signaling: The Expanding Role in Cell Metabolism. *Oxid Med Cell Longev*, 2018:7838647.
194. Chen CH, Shaikenov T, Peterson TR, Aimbetov R, Bissenbaev AK, Lee SW, Wu J, Lin HK, Sarbassov dos D. (2011) ER stress inhibits mTORC2 and Akt signaling through GSK-3 $\beta$ -mediated phosphorylation of rictor. *Sci Signal*, 4(161):ra10.
195. Dibble CC, Asara JM, Manning BD. (2009) Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Mol Cell Biol*, 29(21):5657-5670.
196. Koo J, Wu X, Mao Z, Khuri FR, Sun SY. (2015) Rictor Undergoes Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3)-dependent, FBXW7-mediated Ubiquitination and Proteasomal Degradation. *J Biol Chem*, 290(22):14120-14129.
197. Laplante M, Sabatini DM. (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2):274-293.
198. Zinzalla V, Stracka D, Oppliger W, Hall MN. (2011) Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell*, 144(5):757-768.
199. Engelman JA. (2009) Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer*, 9(8):550-562.
200. Fumarola C, Bonelli MA, Petronini PG, Alfieri RR. (2014) Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer. *Biochem Pharmacol*, 90(3):197-207.

201. Yehia L, Ngeow J, Eng C. (2019) PTEN-opathies: from biological insights to evidence-based precision medicine. *J Clin Invest*, 129(2):452-464.
202. Shorning BY, Griffiths D, Clarke AR. (2011) Lkb1 and Pten synergise to suppress mTOR-mediated tumorigenesis and epithelial-mesenchymal transition in the mouse bladder. *PLoS One*, 6(1):e16209.
203. Harris TK (2003) PDK1 and PKB/Akt: ideal targets for development of new strategies to structure-based drug design. *IUBMB Life*, 55(3):117-126.
204. Hart JR, Vogt PK. (2011) Phosphorylation of AKT: a mutational analysis. *Oncotarget*, 2(6):467-476.
205. Brinkhuizen T, Weijzen CA, Eben J, Thissen MR, van Marion AM, Lohman BG, Winnepenninckx VJ, Nelemans PJ, van Steensel MA. (2014) Immunohistochemical analysis of the mechanistic target of rapamycin and hypoxia signalling pathways in basal cell carcinoma and trichoepithelioma. *PLoS One*, 9(9):e106427.
206. Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, Witters LA, Ellisen LW, Kaelin WG Jr. (2004) Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev*, 18(23):2893-2904.
207. Kim J, Guan KL. (2019) mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth. *Nat Cell Biol*, 21(1):63-71.
208. Bar-Peled L, Chantranupong L, Cherniack AD, Chen WW, Ottina KA, Grabiner BC, Spear ED, Carter SL, Meyerson M, Sabatini DM. (2013) A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science*, 340(6136):1100-1106.
209. Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM. (2008) The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*, 320(5882):1496-1501.
210. Buller CL, Loberg RD, Fan MH, Zhu Q, Park JL, Vesely E, Inoki K, Guan KL, Brosius FC 3rd. (2008) A GSK-3/TSC2/mTOR pathway regulates glucose uptake and GLUT1 glucose transporter expression. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295(3):C836-C843.

211. Masui K, Tanaka K, Akhavan D, Babic I, Gini B, Matsutani T, Iwanami A, Liu F, Villa GR, Gu Y, Campos C, Zhu S, Yang H, Yong WH, Cloughesy TF, Mellinghoff IK, Cavenee WK, Shaw RJ, Mischel PS. (2013) mTOR complex 2 controls glycolytic metabolism in glioblastoma through FoxO acetylation and upregulation of c-Myc. *Cell Metab*, 18(5):726-739.
212. Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pagés M, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. (2017) Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol*, 14(1):11-31.
213. Faubert B, Li KY, Cai L, Hensley CT, Kim J, Zacharias LG, Yang C, Do QN, Doucette S, Burguete D, Li H, Huet G, Yuan Q, Wigal T, Butt Y, Ni M, Torrealba J, Oliver D, Lenkinski RE, Malloy CR, Wachsmann JW, Young JD, Kernstine K, DeBerardinis RJ. (2017) Lactate Metabolism in Human Lung Tumors. *Cell*, 171(2):358-371.e9.
214. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930):1029-1033.
215. Allen E, Miéville P, Warren CM, Saghafinia S, Li L, Peng MW, Hanahan D. (2016) Metabolic Symbiosis Enables Adaptive Resistance to Anti-angiogenic Therapy that Is Dependent on mTOR Signaling. *Cell Rep*, 15(6):1144-1160.
216. Yang L, Venneti S, Nagrath D. (2017) Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annu Rev Biomed Eng*, 19:163-194.
217. Csibi A, Fendt SM, Li C, Pouligiannis G, Choo AY, Chapski DJ, Jeong SM, Dempsey JM, Parkhitko A, Morrison T, Henske EP, Haigis MC, Cantley LC, Stephanopoulos G, Yu J, Blenis J. (2013) The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4. *Cell*, 153(4):840-854.
218. Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, Lee YS, Kita K, Ochi T, Zeller KI, De Marzo AM, Van Eyk JE, Mendell JT, Dang CV. (2009) c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*, 458(7239):762-765.
219. van der Vos KE, Eliasson P, Proikas-Cezanne T, Vervoort SJ, van Boxtel R, Putker M, van Zutphen IJ, Mauthe M, Zellmer S, Pals C, Verhagen LP, Groot Koerkamp MJ, Braat AK, Dansen TB, Holstege FC, Gebhardt R, Burgering BM, Coffey PJ.

- (2012) Modulation of glutamine metabolism by the PI(3)K-PKB-FOXO network regulates autophagy. *Nat Cell Biol*, 14(8):829-837.
220. Hoerner CR, Chen VJ, Fan AC. (2019) The 'Achilles Heel' of Metabolism in Renal Cell Carcinoma: Glutaminase Inhibition as a Rational Treatment Strategy. *Kidney Cancer*, 3(1):15-29.
221. Patra KC, Hay N. (2014) The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci*, 39(8):347-354.
222. Hagiwara A, Cornu M, Cybulski N, Polak P, Betz C, Trapani F, Terracciano L, Heim MH, Rüegg MA, Hall MN. (2012) Hepatic mTORC2 activates glycolysis and lipogenesis through Akt, glucokinase, and SREBP1c. *Cell Metab*, 15(5):725-738.
223. Ricoult SJ, Yecies JL, Ben-Sahra I, Manning BD. (2016) Oncogenic PI3K and K-Ras stimulate de novo lipid synthesis through mTORC1 and SREBP. *Oncogene*, 35(10):1250-1260.
224. Yecies JL, Zhang HH, Menon S, Liu S, Yecies D, Lipovsky AI, Gorgun C, Kwiatkowski DJ, Hotamisligil GS, Lee CH, Manning BD. (2011) Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab*, 14(1):21-32.
225. Dang CV. (2012) MYC on the path to cancer. *Cell*, 149(1):22-35.
226. Stine ZE, Walton ZE, Altman BJ, Hsieh AL, Dang CV. (2015) MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer Discov*, 5(10):1024-1039.
227. Falchook G, Patel M, Infante J, Arkenau HT, Dean E, Brenner A, Borazanci E, Lopez J, Moore K, Schmid P, Frankel A, Jones S, McCulloch W, Kemble G, Burris H. (2017) Abstract CT153: First in human study of the first-in-class fatty acid synthase (FASN) inhibitor TVB-2640. *Cancer Res*, 77(Suppl 13):CT153-CT153.
228. Konkel B, Caflisch LD, Diaz Duque AE, Michalek J, Liu Q, Brenner AJ. (2019) Prospective phase II trial in patients with first relapse of high-grade astrocytoma using TVB-2640 in combination with bevacizumab versus bevacizumab alone. *J Clin Oncol*, 37(15\_suppl):2064-2064.
229. Chen R, Xu M, Nagati J, Garcia JA. (2017) Coordinate regulation of stress signaling and epigenetic events by Acss2 and HIF-2 in cancer cells. *PLoS One*, 12(12):e0190241.



230. Cheng C, Geng F, Cheng X, Guo D. (2018) Lipid metabolism reprogramming and its potential targets in cancer. *Cancer Commun (Lond)*, 38(1):27.
231. Comerford SA, Huang Z, Du X, Wang Y, Cai L, Witkiewicz AK, Walters H, Tantawy MN, Fu A, Manning HC, Horton JD, Hammer RE, McKnight SL, Tu BP. (2014) Acetate dependence of tumors. *Cell*, 159(7):1591-1602.
232. Li X, Yu W, Qian X, Xia Y, Zheng Y, Lee JH, Li W, Lyu J, Rao G, Zhang X, Qian CN, Rozen SG, Jiang T, Lu Z. (2017) Nucleus-Translocated ACSS2 Promotes Gene Transcription for Lysosomal Biogenesis and Autophagy. *Mol Cell*, 66(5):684-697.e9.
233. Zlotorynski E. (2017) Gene expression: ACSS2 boosts local histone acetylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18(7):405.
234. Ma Y, Temkin SM, Hawkrige AM, Guo C, Wang W, Wang XY, Fang X. (2018) Fatty acid oxidation: An emerging facet of metabolic transformation in cancer. *Cancer Lett*, 435:92-100.
235. Cheng H, Zou Y, Ross JS, Wang K, Liu X, Halmos B, Ali SM, Liu H, Verma A, Montagna C, Chachoua A, Goel S, Schwartz EL, Zhu C, Shan J, Yu Y, Gritsman K, Yelensky R, Lipson D, Otto G, Hawryluk M, Stephens PJ, Miller VA, Piperdi B, Perez-Soler R. (2015) RICTOR Amplification Defines a Novel Subset of Patients with Lung Cancer Who May Benefit from Treatment with mTORC1/2 Inhibitors. *Cancer Discov*, 5(12):1262-1270.
236. Janku F, Yap TA, Meric-Bernstam F. (2018) Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? *Nat Rev Clin Oncol* 15(5):273-291.
237. Conde E, Angulo B, Tang M, Morente M, Torres-Lanzas J, Lopez-Encuentra A, Lopez-Rios F, Sanchez-Cespedes M. (2006) Molecular context of the EGFR mutations: evidence for the activation of mTOR/S6K signaling. *Clin Cancer Res*, 12(3 Pt 1):710-717.
238. Papadimitrakopoulou V. (2012) Development of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors and their application in personalized therapy for non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 7(8):1315-1326.
239. Dobashi Y, Watanabe Y, Miwa C, Suzuki S, Koyama S. (2011) Mammalian target of rapamycin: a central node of complex signaling cascades. *Int J Clin Exp Pathol*, 4(5):476-95.

240. Chen B, Tan Z, Gao J, Wu W, Liu L, Jin W, Cao Y, Zhao S, Zhang W, Qiu Z, Liu D, Mo X, Li W. (2015) Hyperphosphorylation of ribosomal protein S6 predicts unfavorable clinical survival in non-small cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 34:126.
241. Seki N, Takasu T, Mandai K, Nakata M, Saeki H, Heike Y, Takata I, Segawa Y, Hanafusa T, Eguchi K. (2002) Expression of eukaryotic initiation factor 4E in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the human peripheral lung. *Clin Cancer Res*, 8(10):3046-3053.
242. Yoshizawa A, Fukuoka J, Shimizu S, Shilo K, Franks TJ, Hewitt SM, Fujii T, Cordon-Cardo C, Jen J, Travis WD. (2010) Overexpression of phospho-eIF4E is associated with survival through AKT pathway in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 16(1):240-248.
243. Ekman S, Wynes MW, Hirsch FR. (2012) The mTOR pathway in lung cancer and implications for therapy and biomarker analysis. *J Thorac Oncol*, 7(6):947-953.
244. Facchinetti F, Bluthgen MV, Tergemina-Clain G, Faivre L, Pignon JP, Planchard D, Remon J, Soria JC, Lacroix L, Besse B. (2017) LKB1/STK11 mutations in non-small cell lung cancer patients: Descriptive analysis and prognostic value. *Lung Cancer*, 112:62-68.
245. Spoerke JM, O'Brien C, Huw L, Koeppen H, Fridlyand J, Brachmann RK, Haverty PM, Pandita A, Mohan S, Sampath D, Friedman LS, Ross L, Hampton GM, Amler LC, Shames DS, Lackner MR. (2012) Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway alterations are associated with histologic subtypes and are predictive of sensitivity to PI3K inhibitors in lung cancer preclinical models. *Clin Cancer Res*, 18(24):6771-6783.
246. Imielinski M, Berger AH, Hammerman PS, Hernandez B, Pugh TJ, Hodis E, Cho J, Suh J, Capelletti M, Sivachenko A, Sougnez C, Auclair D, Lawrence MS, Stojanov P, Cibulskis K, Choi K, de Waal L, Sharifnia T, Brooks A, Greulich H, Banerji S, Zander T, Seidel D, Leenders F, Ansén S, Ludwig C, Engel-Riedel W, Stoelben E, Wolf J, Goparju C, Thompson K, Winckler W, Kwiatkowski D, Johnson BE, Jänne PA, Miller VA, Pao W, Travis WD, Pass HI, Gabriel SB, Lander ES, Thomas RK, Garraway LA, Getz G, Meyerson M. (2012) Mapping the

- hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell*, 150(6):1107-1120.
247. Vasan N, Boyer JL, Herbst RS. (2014) A RAS renaissance: emerging targeted therapies for KRAS-mutated non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 20(15):3921-3930.
248. Umemura S, Mimaki S, Makinoshima H, Tada S, Ishii G, Ohmatsu H, Niho S, Yoh K, Matsumoto S, Takahashi A, Morise M, Nakamura Y, Ochiai A, Nagai K, Iwakawa R, Kohno T, Yokota J, Ohe Y, Esumi H, Tsuchihara K, Goto K. (2014) Therapeutic priority of the PI3K/AKT/mTOR pathway in small cell lung cancers as revealed by a comprehensive genomic analysis. *J Thorac Oncol*, 9(9):1324-1331.
249. Ross JS, Wang K, Elkadi OR, Tarasen A, Foulke L, Sheehan CE, Otto GA, Palmer G, Yelensky R, Lipson D, Chmielecki J, Ali SM, Elvin J, Morosini D, Miller VA, Stephens PJ. (2014) Next-generation sequencing reveals frequent consistent genomic alterations in small cell undifferentiated lung cancer. *J Clin Pathol*, 67(9):772-776.
250. Sakre N, Wildey G, Behtaj M, Kresak A, Yang M, Fu P, Dowlati A. (2017) RICTOR amplification identifies a subgroup in small cell lung cancer and predicts response to drugs targeting mTOR. *Oncotarget*, 8(4):5992-6002.
251. Schmid K, Bago-Horvath Z, Berger W, Haitel A, Cejka D, Werzowa J, Filipits M, Herberger B, Hayden H, Sieghart W. (2010) Dual inhibition of EGFR and mTOR pathways in small cell lung cancer. *Br J Cancer*, 103(5):622-628.
252. Rudin CM, Durinck S, Stawiski EW, Poirier JT, Modrusan Z, Shames DS, Bergbower EA, Guan Y, Shin J, Guillory J, Rivers CS, Foo CK, Bhatt D, Stinson J, Gnad F, Haverty PM, Gentleman R, Chaudhuri S, Janakiraman V, Jaiswal BS, Parikh C, Yuan W, Zhang Z, Koeppen H, Wu TD, Stern HM, Yauch RL, Huffman KE, Paskulin DD, Illei PB, Varella-Garcia M, Gazdar AF, de Sauvage FJ, Bourgon R, Minna JD, Brock MV, Seshagiri S. (2012) Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. *Nat Genet*, 44(10):1111-1116.
253. Hu J, Wang Y, Zhang Y, Yu Y, Chen H, Liu K, Yao M, Wang K, Gu W, Shou T. (2019) Comprehensive genomic profiling of small cell lung cancer in Chinese

- patients and the implications for therapeutic potential. *Cancer Med*, 8(9):4338-4347.
254. Glasgow CG, Steagall WK, Taveira-Dasilva A, Pacheco-Rodriguez G, Cai X, El-Chemaly S, Moses M, Darling T, Moss J. (2010) Lymphangiomyomatosis (LAM): molecular insights lead to targeted therapies. *Respir Med*, 104(Suppl 1):S45-S58.
  255. Henske EP, McCormack FX. (2012) Lymphangiomyomatosis - a wolf in sheep's clothing. *J Clin Invest*, 122(11):3807-3816.
  256. Badri KR, Gao L, Hyjek E, Schuger N, Schuger L, Qin W, Chekaluk Y, Kwiatkowski DJ, Zhe X. (2013) Exonic mutations of TSC2/TSC1 are common but not seen in all sporadic pulmonary lymphangiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 187(6):663-665.
  257. Carsillo T, Astrinidis A, Henske EP. (2000) Mutations in the tuberous sclerosis complex gene TSC2 are a cause of sporadic pulmonary lymphangiomyomatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(11):6085-6090.
  258. Sato T, Seyama K, Fujii H, Maruyama H, Setoguchi Y, Iwakami S, Fukuchi Y, Hino O. (2002) Mutation analysis of the TSC1 and TSC2 genes in Japanese patients with pulmonary lymphangiomyomatosis. *J Hum Genet*, 47(1):20-28.
  259. Hayashi T, Kumasaka T, Mitani K, Okada Y, Kondo T, Date H, Chen F, Oto T, Miyoshi S, Shiraishi T, Iwasaki A, Hara K, Saito T, Ando K, Kobayashi E, Gunji-Niitsu Y, Kunogi M, Takahashi K1, Yao T, Seyama K.(2016) Bronchial involvement in advanced stage lymphangiomyomatosis: histopathologic and molecular analyses. *Hum Pathol*, 50:34-42.
  260. Zheng Y, Jiang Y. (2015) mTOR Inhibitors at a Glance. *Mol Cell Pharmacol*, 7(2):15-20.
  261. Soria JC, Shepherd FA, Douillard JY, Wolf J, Giaccone G, Crino L, Cappuzzo F, Sharma S, Gross SH, Dimitrijevic S, Di Scala L, Gardner H, Nogova L, Papadimitrakopoulou V. (2009) Efficacy of everolimus (RAD001) in patients with advanced NSCLC previously treated with chemotherapy alone or with chemotherapy and EGFR inhibitors. *Ann Oncol*, 20(10):1674-1681.
  262. Fazio N, Granberg D, Grossman A, Saletan S, Klimovsky J, Panneerselvam A, Wolin EM. (2013) Everolimus plus octreotide long-acting repeatable in patients

- with advanced lung neuroendocrine tumors: analysis of the phase 3, randomized, placebo-controlled RADIANT-2 study. *Chest*, 143(4):955-962.
263. Pavel ME, Baudin E, Öberg KE, Hainsworth JD, Voi M, Rouyrre N, Peeters M, Gross DJ, Yao JC. (2017) Efficacy of everolimus plus octreotide LAR in patients with advanced neuroendocrine tumor and carcinoid syndrome: final overall survival from the randomized, placebo-controlled phase 3 RADIANT-2 study. *Ann Oncol*, 28(7):1569-1575.
264. Ferolla P, Brizzi MP, Meyer T, Mansoor W, Mazieres J, Do Cao C, Léna H, Berruti A, Damiano V, Buikhuisen W, Grønbæk H, Lombard-Bohas C, Grohé , Minotti V1, Tiseo M, De Castro J, Reed N, Gislimberti G, Singh N, Stankovic M, Öberg K, Baudin E. (2017) Efficacy and safety of long-acting pasireotide or everolimus alone or in combination in patients with advanced carcinoids of the lung and thymus (LUNA): an open-label, multicentre, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 18(12):1652-1664.
265. Pandya KJ, Dahlberg S, Hidalgo M, Cohen RB, Lee MW, Schiller JH, Johnson DH, Eastern Cooperative Oncology Group (E1500). (2007) A randomized, phase II trial of two dose levels of temsirolimus (CCI-779) in patients with extensive-stage small-cell lung cancer who have responding or stable disease after induction chemotherapy: a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group (E1500). *J Thorac Oncol*, 2(11):1036-1041.
266. Tarhini A, Kotsakis A, Gooding W, Shuai Y, Petro D, Friedland D, Belani CP, Dacic S, Argiris A. (2010) Phase II study of everolimus (RAD001) in previously treated small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 16(23):5900-5907.
267. Ando K, Kurihara M, Kataoka H, Ueyama M, Togo S, Sato T, Doi T, Iwakami S, Takahashi K, Seyama K, Mikami M. (2013) Efficacy and safety of low-dose sirolimus for treatment of lymphangioleiomyomatosis. *Respir Investig*, 51(3):175-183.
268. Goldberg HJ, Harari S, Cottin V, Rosas IO, Peters E, Biswal S, Cheng Y, Khindri S, Kovarik JM, Ma S, McCormack FX, Henske EP. (2015) Everolimus for the treatment of lymphangioleiomyomatosis: a phase II study. *Eur Respir J*, 46(3):783-794.

269. Tang Y, El-Chemaly S, Taveira-Dasilva A, Goldberg HJ, Bagwe S, Rosas IO, Moss J, Priolo C, Henske EP. (2019) Metabolic Changes in Patients With Lymphangioliomyomatosis Treated With Sirolimus and Hydroxychloroquine. *Chest*, 156(6):1137-1148.
270. Yoon HY, Hwang JJ, Kim DS, Song JW. (2018) Efficacy and safety of low-dose Sirolimus in Lymphangioliomyomatosis. *Orphanet J Rare Dis*, 13(1):204.
271. Basu B, Krebs MG, Sundar R, Wilson RH, Spicer J, Jones R, Brada M, Talbot DC, Steele N, Ingles Garces AH, Brugger W, Harrington EA, Evans J, Hall E, Tovey H, de Oliveira FM, Carreira S, Swales K, Ruddle R, Raynaud FI, Purchase B, Dawes JC, Parmar M, Turner AJ, Tunariu N, Banerjee S, de Bono JS, Banerji U. (2018) Vistusertib (dual m-TORC1/2 inhibitor) in combination with paclitaxel in patients with high-grade serous ovarian and squamous non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*, 29(9):1918-1925.
272. Moore KN, Bauer TM, Falchook GS, Chowdhury S, Patel C, Neuwirth R, Enke A, Zohren F, Patel MR. (2018) Phase I study of the investigational oral mTORC1/2 inhibitor sapanisertib (TAK-228): tolerability and food effects of a milled formulation in patients with advanced solid tumours. *ESMO Open*, 3(2):e000291.
273. Jones AT, Yang J, Narov K, Henske EP, Sampson JR, Shen MH. (2019) Allosteric and ATP-Competitive Inhibitors of mTOR Effectively Suppress Tumor Progression-Associated Epithelial-Mesenchymal Transition in the Kidneys of *Tsc2*<sup>+/-</sup> Mice. *Neoplasia*, 21(8):731-739.
274. Langer CJ, Redman MW, Wade JL 3rd, Aggarwal C, Bradley JD, Crawford J, Stella PJ, Knapp MH, Miao J, Minichiello K, Herbst RS, Kelly K, Gandara DR, Papadimitrakopoulou VA. (2019) SWOG S1400B (NCT02785913), a Phase II Study of GDC-0032 (Taselisib) for Previously Treated PI3K-Positive Patients with Stage IV Squamous Cell Lung Cancer (Lung-MAP Sub-Study). *J Thorac Oncol*, 14(10):1839-1846.
275. Adjei AA, Bennouna J, Leighl NB, Felip E, Cortinovis DL, Alt J, Schaefer ES, Thomas M, Chouaid C, Morabito A, De Castro J, Grossi F, Paz-Ares L, De Pas TM, Maier J, Chakravartty A, Chol M, Aimone P, Planchard D. (2016) Safety and efficacy of buparlisib (BKM120) and chemotherapy in advanced, squamous non-

- small cell lung cancer (sqNSCLC): Results from the phase Ib/II BASALT-2 and BASALT-3 studies. *J Clin Oncol*, 34(15\_suppl):e20522-e20522.
276. Vansteenkiste JF, Canon JL, De Braud F, Grossi F, De Pas T, Gray JE, Su WC, Felip E, Yoshioka H, Gridelli C, Dy GK, Thongprasert S, Reck M, Aimone P, Vidam GA, Roussou P, Wang YA, Di Tomaso E, Soria JC. (2015) Safety and Efficacy of Buparlisib (BKM120) in Patients with PI3K Pathway-Activated Non-Small Cell Lung Cancer: Results from the Phase II BASALT-1 Study. *J Thorac Oncol*, 10(9):1319-1327.
  277. David O, Jett J, LeBeau H, Dy G, Hughes J, Friedman M, Brody AR. (2004) Phospho-Akt overexpression in non-small cell lung cancer confers significant stage-independent survival disadvantage. *Clin Cancer Res*, 10(20):6865-6871.
  278. Oh MH, Lee HJ, Yoo SB, Xu X, Choi JS, Kim YH, Lee SY, Lee CT, Jheon S, Chung JH. (2012) Clinicopathological correlations of mTOR and pAkt expression in non-small cell lung cancer. *Virchows Arch*, 460(6):601-609.
  279. Yip PY, Cooper WA, Kohonen-Corish MR, Lin BP, McCaughan BC, Boyer MJ, Kench JG, Horvath LG. (2014) Phosphorylated Akt expression is a prognostic marker in early-stage non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol*, 67(4):333-340.
  280. Jacobsen K, Bertran-Alamillo J, Molina MA, Teixidó C, Karachaliou N, Pedersen MH, Castellví J, Garzón M, Codony-Servat C, Codony-Servat J, Giménez-Capitán A, Drozdowskyj A, Viteri S, Larsen MR, Lassen U, Felip E, Bivona TG, Ditzel HJ, Rosell R2. (2017) Convergent Akt activation drives acquired EGFR inhibitor resistance in lung cancer. *Nat Commun*, 4;8(1):410.
  281. Puglisi M, Thavasu P, Stewart A, de Bono JS, O'Brien ME, Popat S, Bhosle J, Banerji U. (2014) AKT inhibition synergistically enhances growth-inhibitory effects of gefitinib and increases apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer*, 85(2):141-146.
  282. Lara PN Jr, Longmate J, Mack PC, Kelly K, Socinski MA, Salgia R, Gitlitz B, Li T, Koczywas M, Reckamp KL, Gandara DR. (2015) Phase II Study of the AKT Inhibitor MK-2206 plus Erlotinib in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Who Previously Progressed on Erlotinib. *Clin Cancer Res*, 21(19):4321-4326.

283. Owonikoko TK, Khuri FR. (2013) Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway: biomarkers of success and tribulation. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. doi: 10.1200/EdBook\_AM.2013.33.e395.
284. Gonzalez-Angulo AM, Blumenschein GR Jr. (2013) Defining biomarkers to predict sensitivity to PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in breast cancer. *Cancer Treat Rev*, 39(4):313-320.
285. Serra V, Markman B, Scaltriti M, Eichhorn PJ, Valero V, Guzman M, Botero ML, Llonch E, Atzori F, Di Cosimo S, Maira M, Garcia-Echeverria C, Parra JL, Arribas J, Baselga J. (2008) NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Res*, 68(19):8022-8030.
286. Yang J, Nie J, Ma X, Wei Y, Peng Y, Wei X. (2019) Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer*, 18(1):26.
287. Lim SM, Park HS, Kim S, Kim S, Ali SM, Greenbowe JR, Yang IS, Kwon NJ, Lee JL, Ryu MH, Ahn JH, Lee J, Lee MG, Kim HS, Kim H, Kim HR, Moon YW, Chung HC, Kim JH, Kang YK, Cho BC. (2016) Next-generation sequencing reveals somatic mutations that confer exceptional response to everolimus. *Oncotarget*, 7(9):10547-10556.
288. Hyman DM, Smyth LM, Donoghue MTA, Westin SN, Bedard PL, Dean EJ, Bando H, El-Khoueiry AB, Pérez-Fidalgo JA, Mita A, Schellens JHM, Chang MT, Reichel JB, Bouvier N, Selcuklu SD, Soumerai TE, Torrisi J, Erinjeri JP, Ambrose H, Barrett JC, Dougherty B, Foxley A, Lindemann JPO, McEwen R, Pass M, Schiavon G, Berger MF, Chandarlapaty S, Solit DB, Banerji U, Baselga J, Taylor BS. (2017) AKT Inhibition in Solid Tumors With AKT1 Mutations. *J Clin Oncol*, 35(20):2251-2259.
289. Gkoutakos A, Pilotto S, Simbolo M, Vicentini C, Mafficini A, del Curatolo A, Scarpa A, Tortora G, Corbo V, Bria E. (2018) Potential role of RICTOR copy number gain (CNG) as a key biomarker of mTOR activity: A comprehensive preclinical analysis in Squamous Cell Lung Cancer. *Ann Oncol*, 29(suppl\_8):viii649-viii669.



290. O'Reilly T, McSheehy PM. (2010) Biomarker Development for the Clinical Activity of the mTOR Inhibitor Everolimus (RAD001): Processes, Limitations, and Further Proposals. *Transl Oncol*, 3(2):65-79.
291. Kwei KA1, Baker JB, Pelham RJ. (2012) Modulators of sensitivity and resistance to inhibition of PI3K identified in a pharmacogenomic screen of the NCI-60 human tumor cell line collection. *PLoS One*, 7(9):e46518.
292. Lin J, Sampath D, Nannini MA, Lee BB, Degtyarev M, Oeh J, Savage H, Guan Z, Hong R, Kassees R, Lee LB, Risom T, Gross S, Liederer BM, Koeppen H, Skelton NJ, Wallin JJ, Belvin M, Punnoose E, Friedman LS, Lin K. (2013) Targeting activated Akt with GDC-0068, a novel selective Akt inhibitor that is efficacious in multiple tumor models. *Clin Cancer Res*, 19(7):1760-1772.
293. Kahn J, Hayman TJ, Jamal M, Rath BH, Kramp T, Camphausen K, Tofilon PJ. (2014) The mTORC1/mTORC2 inhibitor AZD2014 enhances the radiosensitivity of glioblastoma stem-like cells. *Neuro Oncol*, 16(1):29-37.
294. Liang Y, Yu D, Perez-Soler R, Klostergaard J, Zou Y. (2017) TRIB2 contributes to cisplatin resistance in small cell lung cancer. *Oncotarget*, 8(65):109596-109608.
295. Lin J, Sampath D, Nannini MA, Lee BB, Degtyarev M, Oeh J, Savage H, Guan Z, Hong R, Kassees R, Lee LB, Risom T, Gross S, Liederer BM, Koeppen H, Skelton NJ, Wallin JJ, Belvin M, Punnoose E, Friedman LS, Lin K. (2013) Targeting activated Akt with GDC-0068, a novel selective Akt inhibitor that is efficacious in multiple tumor models. *Clin Cancer Res*, 19(7):1760-1772.
296. Owen S, Souhami L. (2014) The management of brain metastases in non-small cell lung cancer. *Front Oncol*, 4:248.
297. Preusser M, Capper D, Ilhan-Mutlu A, Berghoff AS, Birner P, Bartsch R, Marosi C, Zielinski C, Mehta MP, Winkler F, Wick W, von Deimling A. (2012) Brain metastases: pathobiology and emerging targeted therapies. *Acta Neuropathol*, 123(2):205-222.
298. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. (2013) Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*, 63(1):11-30.
299. Dobashi Y, Suzuki S, Kimura M, Matsubara H, Tsubochi H, Imoto I, Ooi A. (2011) Paradigm of kinase-driven pathway downstream of epidermal growth factor receptor/Akt in human lung carcinomas. *Hum Pathol*, 42(2):214-226.

300. Liu D, Huang Y, Chen B, Zeng J, Guo N, Zhang S, Liu L, Xu H, Mo X, Li W. (2011) Activation of mammalian target of rapamycin pathway confers adverse outcome in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*, 117(16):3763-3773.
301. Shin E, Choi CM, Kim HR, Jang SJ, Park YS. (2015) Immunohistochemical characterization of the mTOR pathway in stage-I non-small-cell lung carcinoma. *Lung Cancer*, 89(1):13-18.
302. Trigka EA, Levidou G, Saetta AA, Chatziandreou I, Tomos P, Thalassinou N, Anastasiou N, Spartalis E, Kavantzias N, Patsouris E, Korkolopoulou P. (2013) A detailed immunohistochemical analysis of the PI3K/AKT/mTOR pathway in lung cancer: correlation with PIK3CA, AKT1, K-RAS or PTEN mutational status and clinicopathological features. *Oncol Rep*, 30(2):623-636.
303. Gulhati P, Bowen KA, Liu J, Stevens PD, Rychahou PG, Chen M, Lee EY, Weiss HL, O'Connor KL, Gao T, Evers BM. (2011) mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer Res*, 71(9):3246-3256.
304. Kwasnicki A, Jeevan D, Braun A, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. (2015) Involvement of mTOR signaling pathways in regulating growth and dissemination of metastatic brain tumors via EMT. *Anticancer Res*, 35(2):689-696.
305. Li Q, Yang J, Yu Q, Wu H, Liu B, Xiong H, Hu G, Zhao J, Yuan X, Liao Z. (2013) Associations between single-nucleotide polymorphisms in the PI3K-PTEN-AKT-mTOR pathway and increased risk of brain metastasis in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 19(22):6252-6260.
306. Zhao N, Wilkerson MD, Shah U, Yin X, Wang A, Hayward MC, Roberts P, Lee CB, Parsons AM, Thorne LB, Haithcock BE, Grilley-Olson JE, Stinchcombe TE, Funkhouser WK, Wong KK, Sharpless NE, Hayes DN. (2014) Alterations of LKB1 and KRAS and risk of brain metastasis: comprehensive characterization by mutation analysis, copy number, and gene expression in non-small-cell lung carcinoma. *Lung Cancer*, 86(2):255-261.
307. Paik PK, Shen R, Won H, Rekhtman N, Wang L, Sima CS, Arora A, Seshan V, Ladanyi M, Berger MF, Kris MG. (2015) Next-Generation Sequencing of Stage IV Squamous Cell Lung Cancers Reveals an Association of PI3K Aberrations and

- Evidence of Clonal Heterogeneity in Patients with Brain Metastases. *Cancer Discov*, 5(6):610-621.
308. Zhang F, Zhang X, Li M, Chen P, Zhang B, Guo H, Cao W, Wei X, Cao X, Hao X, Zhang N. (2010) mTOR complex component Rictor interacts with PKCzeta and regulates cancer cell metastasis. *Cancer Res*, 70(22):9360-9370.
  309. Schmidt KM, Dietrich P, Hackl C, Guenzle J, Bronsert P, Wagner C, Fichtner-Feigl S, Schlitt HJ, Geissler EK, Hellerbrand C, Lang SA. (2018) Inhibition of mTORC2/RICTOR Impairs Melanoma Hepatic Metastasis. *Neoplasia*, 20(12):1198-1208.
  310. J Jin Y, Yuan Y, Yi M, Han H, Liu B, Li Q. (2019) Phosphorylated-Akt overexpression is associated with a higher risk of brain metastasis in patients with non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Rep*, 18:100625.
  311. Gridelli C, Maione P, Rossi A. (2008) The potential role of mTOR inhibitors in non-small cell lung cancer. *Oncologist*, 13(2):139-147.
  312. Zhang Q, Zhang Y, Chen Y, Qian J, Zhang X, Yu K. (2019) A Novel mTORC1/2 Inhibitor (MTI-31) Inhibits Tumor Growth, Epithelial-Mesenchymal Transition, Metastases, and Improves Antitumor Immunity in Preclinical Models of Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 25(12):3630-3642.
  313. Lin F, Buil L, Sherris D, Beijnen JH, van Tellingen O. (2013) Dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor Palomid 529 penetrates the blood-brain barrier without restriction by ABCB1 and ABCG2. *Int J Cancer*, 133(5):1222-1233.
  314. O'Reilly T, McSheehy PM, Kawai R, Kretz O, McMahon L, Brueggen J, Bruelisauer A, Gschwind HP, Allegrini PR, Lane HA. (2010) Comparative pharmacokinetics of RAD001 (everolimus) in normal and tumor-bearing rodents. *Cancer Chemother Pharmacol*, 65(4):625-639.
  315. Govindan R, Page N, Morgensztern D, Read W, Tierney R, Vlahiotis A, Spitznagel EL, Piccirillo J. (2006) Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. *J Clin Oncol*, 24(28):4539-4544.
  316. Waqar SN, Morgensztern D. (2017) Treatment advances in small cell lung cancer (SCLC). *Pharmacol Ther*, 180:16-23.

317. Dabir S , Wildey G, McColl K, Fu P, Feng Y, Dowlati A. (2015) Identification of RICTOR amplification as a recurrent and potentially actionable alteration in small cell lung cancer patients. *J Clin Oncol*, 33(15\_suppl):7576-7576.
318. Kim ST, Kim SY, Klempner SJ, Yoon J, Kim N, Ahn S, Bang H, Kim KM, Park W, Park SH, Park JO, Park YS, Lim HY, Lee SH, Park K, Kang WK, Lee J. (2017) Rapamycin-insensitive companion of mTOR (RICTOR) amplification defines a subset of advanced gastric cancer and is sensitive to AZD2014-mediated mTORC1/2 inhibition. *Ann Oncol*, 28(3):547-554.
319. Carracedo A, Pandolfi PP. (2008) The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene*, 27(41):5527-5541.
320. Guan B, Wu K, Zeng J, Xu S, Mu L, Gao Y, Wang K, Ma Z, Tian J, Shi Q, Guo P, Wang X, He D, Du Y. (2017) Tumor-suppressive microRNA-218 inhibits tumor angiogenesis via targeting the mTOR component RICTOR in prostate cancer. *Oncotarget*, 8(5):8162-8172.
321. Meric-Bernstam F, Akcakanat A, Chen H, Do KA, Sangai T, Adkins F, Gonzalez-Angulo AM, Rashid A, Crosby K, Dong M, Phan AT, Wolff RA, Gupta S, Mills GB, Yao J. (2012) PIK3CA/PTEN mutations and Akt activation as markers of sensitivity to allosteric mTOR inhibitors. *Clin Cancer Res*, 18(6):1777-1789.
322. Micevic G, Muthusamy V, Damsky W, Theodosakis N, Liu X, Meeth K, Wingrove E, Santhanakrishnan M, Bosenberg M. (2016) DNMT3b Modulates Melanoma Growth by Controlling Levels of mTORC2 Component RICTOR. *Cell Rep*, 14(9):2180-2192.
323. Uesugi A, Kozaki K, Tsuruta T, Furuta M, Morita K, Imoto I, Omura K, Inazawa J. (2011) The tumor suppressive microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT phosphorylation in oral cancer. *Cancer Res*, 71(17):5765-5778.
324. Bian Y, Wang Z, Xu J, Zhao W, Cao H, Zhang Z. (2015) Elevated Rictor expression is associated with tumor progression and poor prognosis in patients with gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 464(2):534-540.
325. Jiang WJ, Feng RX, Liu JT, Fan LL, Wang H, Sun GP. (2017) RICTOR expression in esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Med Oncol*, 34(3):32.

326. Morrison Joly M, Hicks DJ, Jones B, Sanchez V, Estrada MV, Young C, Williams M, Rexer BN, Sarbassov dos D, Muller WJ, Brantley-Sieders D, Cook RS. (2016) Rictor/mTORC2 Drives Progression and Therapeutic Resistance of HER2-Amplified Breast Cancers. *Cancer Res*, 76(16):4752-4764.
327. Sticz T, Molnár A, Márk Á, Hajdu M, Nagy N, Végső G, Micsik T, Kopper L, Sebestyén A. (2017) mTOR activity and its prognostic significance in human colorectal carcinoma depending on C1 and C2 complex-related protein expression. *J Clin Pathol*, 70(5):410-416.
328. Wen SY, Li CH, Zhang YL, Bian YH, Ma L, Ge QL, Teng YC, Zhang ZG. (2014) Rictor is an independent prognostic factor for endometrial carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(5):2068-2078.
329. Yuan TL, Cantley LC. (2008) PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 27(41):5497-5510.
330. Toker A. (2019) Double trouble for cancer gene. *Science*, 366(6466):685-686.
331. Murugan AK. (2019) mTOR: Role in cancer, metastasis and drug resistance. *Semin Cancer Biol*, 59:92-111.
332. DeBerardinis RJ, Chandel NS. (2016) Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*, 2(5):e1600200.
333. Steagall WK, Pacheco-Rodriguez G, Darling TN, Torre O, Harari S, Moss J. (2018) The Lymphangioliomyomatosis Lung Cell and Its Human Cell Models. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 58(6):678-683.
334. Li J, Csibi A, Yang S, Hoffman GR, Li C, Zhang E, Yu JJ, Blenis J. (2015) Synthetic lethality of combined glutaminase and Hsp90 inhibition in mTORC1-driven tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(1):E21-E29.
335. Li J, Shin S, Sun Y, Yoon SO, Li C, Zhang E, Yu J, Zhang J, Blenis J. (2016) mTORC1-Driven Tumor Cells Are Highly Sensitive to Therapeutic Targeting by Antagonists of Oxidative Stress. *Cancer Res*, 76(16):4816-4827.
336. Rahman MT, Nakayama K, Ishikawa M, Rahman M, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Iida K, Miyazaki K. (2013) Fatty acid synthase is a potential therapeutic target in estrogen receptor-/progesterone receptor-positive endometrioid endometrial cancer. *Oncology*, 84(3):166-173.

337. Zhou Z, Zhou J, Du Y. (2012) Estrogen receptor alpha interacts with mitochondrial protein HADHB and affects beta-oxidation activity. *Mol Cell Proteomics*, 11(7):M111.011056.
338. Verwer EE, Kavanagh TR, Mischler WJ, Feng Y, Takahashi K, Wang S, Shoup TM, Neelamegam R, Yang J, Guehl NJ, Ran C, Massefski W, Cui Y, El-Chemaly S, Sadow PM, Oldham WM, Kijewski MF, El Fakhri G, Normandin MD, Priolo C. (2018) [18F]Fluorocholine and [18F]Fluoroacetate PET as Imaging Biomarkers to Assess Phosphatidylcholine and Mitochondrial Metabolism in Preclinical Models of TSC and LAM. *Clin Cancer Res*, 24(23):5925-5938.
339. Beloribi-Djefafliia S, Vasseur S, Guillaumond F. (2016) Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis*, 5:e189.
340. Bee J, Fuller S, Miller , Johnson SR. (2018) Lung function response and side effects to rapamycin for lymphangioleiomyomatosis: a prospective national cohort study. *Thorax*, 73(4):369-375.
341. Takada T, Mikami A, Kitamura N, Seyama K, Inoue Y, Nagai K, Suzuki M, Moriyama H, Akasaka K, Tazawa R, Hirai T, Mishima M, Hayashida M, Hirose M, Sugimoto C, Arai T, Hattori N, Watanabe K, Tamada T, Yoshizawa H, Akazawa K, Tanaka T, Yagi K, Young LR, McCormack FX, Nakata K. (2016) Efficacy and Safety of Long-Term Sirolimus Therapy for Asian Patients with Lymphangioleiomyomatosis. *Ann Am Thorac Soc*, 13(11):1912-1922.

## 10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények:

- 1.) **Krencz I**, Sebestyén A, Fábíán K, Márk Á, Moldvay J, Khor A, Kopper L, Pápay J. (2017) Expression of mTORC1/2-related proteins in primary and brain metastatic lung adenocarcinoma. *Hum Pathol*, 62:66-73. **IF: 3,125**
- 2.) **Krencz I \***, Sebestyén A \*, Papay J, Jeney A, Hujber Z, Burger CD, Keller CA, Khor A. (2018) In situ analysis of mTORC1/2 and cellular metabolism related proteins in human lymphangioleiomyomatosis. *Hum Pathol*, 79:199-207. (\* megosztott első szerzős közlemény) **IF: 2,740**
- 3.) **Krencz I**, Sebestyén A, Papay J, Lou Y, Lutz GF, Majewicz TL, Khor A. (2019) Correlation between immunohistochemistry and RICTOR fluorescence in situ hybridization amplification in small cell lung carcinoma. *Hum Pathol*, 93:74-80. **IF: 2,740**
- 4.) **Krencz I**, Sebestyén A, Khor A. (2020) mTOR in lung neoplasms. *Pathol Oncol Res*, doi: 10.1007/s12253-020-00796-1. [Epub ahead of print] **IF: 2,433**

### A disszertációtól független saját közlemények:

- 1.) Hujber Z, Petővári G, Szoboszlai N, Dankó T, Nagy N, Kriston C, **Krencz I**, Paku S, Ozohanics O, Drahos L, Jeney A, Sebestyén A. (2017) Rapamycin (mTORC1 inhibitor) reduces the production of lactate and 2- hydroxyglutarate oncometabolites in IDH1 mutant fibrosarcoma cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 36(1):74. **IF: 6,217**
- 2.) Hujber Z, Horváth G, Petővári G, **Krencz I**, Dankó T, Mészáros K, Rajnai H, Szoboszlai N, Leenders WPJ, Jeney A, Tretter L, Sebestyén A. (2018) GABA, glutamine, glutamate oxidation and succinic semialdehyde dehydrogenase expression in human gliomas. *J Exp Clin Cancer Res*, 37(1):271. **IF: 5,646**
- 3.) Petővári G, Hujber Z, **Krencz I**, Dankó T, Nagy N, Tóth F, Raffay R, Mészáros K, Rajnai H, Vetlényi E, Takács-Vellai K, Jeney A, Sebestyén A. (2018) Targeting cellular metabolism using rapamycin and/or doxycycline enhances anti-tumour effects in human glioma cells. *Cancer Cell Int*, 18:211. **IF: 3,439**

- 4.) Petővári G, Dankó T, **Krencz I**, Hujber Z, Rajnai H, Vetlényi E, Raffay R, Pápay J, Jeney A, Sebestyén A. (2019) Inhibition of metabolic shift can decrease therapy resistance in human high-grade glioma cells. *Pathol Oncol Res*, doi: 10.1007/s12253-019-00677-2. [Epub ahead of print] **IF: 2,433**



## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik PhD munkámhoz segítséget nyújtottak és támogattak:

Témavezetőmnek, Dr. Pápay Juditnak, aki diákkörös éveim óta koordinálja tudományos tevékenységemet, bármikor fordulhattam hozzá kérdéseimmel, mindvégig támogatott szakmai munkámban.

Külön köszönettel tartozom Dr. Sebestyén Annának, aki munkacsoportjában bizalommal fogadott, munkámat konzulensként segítette, megosztotta velem tudását és tapasztalatait, valamint példát mutatott a kutatói szemlélet és gondolkodás terén.

Köszönöm Dr. Khoór Andrásnak a pótolhatatlan segítséget és támogatást, építő szakmai tanácsaira és véleményére mindig számíthattam. Külön köszönöm, hogy külföldi tanulmányutamat lehetővé tette, ami nagyban segítette szakmai fejlődésemet.

Köszönettel tartozom Matolcsy András professzor úrnak és a Doktori Iskola vezetőségének, hogy PhD-munkámat az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben, a Patológiai tudományok Doktori Iskola Onkológia programjában végezhettem.

Szeretnék köszönetet mondani a Tumorbiológia Labor volt és jelenlegi munkatársainak, kiemelten Dankó Titanillának, Dr. Felkai Lucának, Dr. Hujber Zoltánnak, Dr. Hajdu Melindának, Dr. Márk Ágnesnek, Moldvai Dorottyának, Dr. Nagy Noéminek, Petővári Gábornak, Raffay Reginának, Sztankovics Dánielnek és Dr. Vetlényi Enikőnek a baráti légkör és motiváló szakmai környezet kialakításáért. Szerencsés vagyok, hogy egy ilyen jó hangulatú, összetartó közösségben dolgozhattam.

Köszönöm Tracy Majewicz-nek a FISH vizsgálatokban nyújtott segítséget, szakértelme és precizitása példaértékű számomra.

Köszönettel tartozom Dr. Moldvay Juditnak és Dr. Fábián Katalinnak, akik az általuk összegyűjtött adenocarcinoma mintákat és klinikai adatokat megosztották velünk.

Köszönöm Dr. Döme Balázsnak, hogy a kissejtes tüdőrák sejtvonalakat rendelkezésünkre bocsátotta, Bárány Nándornak pedig köszönettel tartozom a sejtek tenyésztésével kapcsolatos hasznos tanácsaiért.

Köszönöm Dr. Krenács Tibornak, hogy lehetőséget biztosított a szöveti multiblokkok elkészítésére és hogy dolgozatom házi bírálatát elvállalva hasznos javaslataival segítette munkámat.

Köszönöm továbbá az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet munkatársainak, kollégáimnak a sok segítséget és támogatást.

Köszönettel tartozom az Emberi Erőforrások Minisztériumának, a Magyar Tüdőgyógyász Társaságnak és a Tempus Közalapítványnak, hogy pályázataik révén tudományos munkámat és a külföldi tanulmányutakat támogatták.

Köszönöm férjemnek, Dr. Taglia-Lázár Devidnek, hogy türelemmel támogatta és segítette munkámat. Köszönöm szüleimnek, hogy mindvégig támogattak céljaim elérésében.