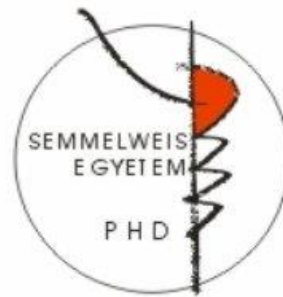


BRAF-mutáns szolid tumorok célzott terápia érzékenységét meghatározó molekuláris faktorok vizsgálata

Doktori értekezés

Molnár Eszter

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Hegedűs Balázs, PhD, tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók: Matkovicsné Dr. Varga Andrea, PhD,
tudományos főmunkatárs

Dr. Lippai Mónika, PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Wikonkál Norbert, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kóhidai László, PhD, egyetemi docens

Dr. Vellainé Takács Krisztina, PhD,
egyetemi docens

Budapest
2018

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK.....	5
1. BEVEZETŐ	7
1.1 A BRAF mutáció szolid daganatokban	8
1.1.1 A BRAF pontmutációk típusai	9
1.1.2 A V600 és nem-V600 BRAF mutáció előfordulási gyakorisága különböző szolid daganatokban	12
1.2 A V600 BRAF mutáns szolid tumorok célzott terápiája.....	14
1.2.1 Mellékhatások.....	17
1.2.2 A BRAF V600 inhibitorok elleni rezisztencia melanómában	18
1.2.2.1 RAS és NF1	20
1.2.2.2 MEK1 és aktivátorai.....	20
1.2.2.3 RAF amplifikáció és splice variánsok	21
1.2.2.4 Tirozin kináz receptorok (RTK).....	21
1.2.2.5 PI3K/AKT és PTEN	22
1.2.2.6 p53	23
1.2.2.7 TERT	23
1.2.2.8 Ciklin D1/CDK4/6/CDKN2A	24
1.2.2.9 RAC1	24
1.2.2.10 MITF.....	25
1.3 A melanóma immun checkpoint fehérvérjék gátlásán alapuló terápiája	25
1.4 A BRAF-gátló rezisztencia hatása a melanóma sejtek fenotípusára	26
1.5 A nem-V600 BRAF mutáns szolid tumorok célzott terápiája.....	28
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	30
3. MÓDSZEREK.....	31
3.1. Sejtvonalak	31
3.2 Gátlószerek	34
3.3 Életképességi tesztek	35
3.3.1 SRB esszé	35
3.3.2 Klonogenitási esszé	36
3.3.3 Kombinációs index (CI) számítása.....	36
3.4 Videomikroszkópos mérések.....	37

3.5 TUNEL esszé.....	37
3.6 Immunblot	37
3.7 Sejtciklus vizsgálatok	38
3.8 Kvantitatív PCR.....	38
3.9 In vivo kísérletek	41
3.10 Statisztika.....	41
4. EREDMÉNYEK.....	42
4.1 A zoledronsav hatása a V600E BRAF mutáns melanóma sejtek életképességére és apoptózis indukciójára PTEN fehérje expressziós szintjének függvényében	42
4.1.1 A vizsgált melanóma sejtek PTEN státuszának meghatározása.....	42
4.1.2 A vemurafenib és zoledronsav kezelés hatása az életképességre.....	42
4.1.3 A zoledronsav apoptózis indukáló hatásának vizsgálata.....	45
4.2 A hosszú távú vemurafenib kezelés hatásának feltérképezése V600E BRAF mutáns melanóma sejtvonal párokon	46
4.2.1 A sejtvonal párok vemurafenib IC50 értékének meghatározása	46
4.2.2 A sejtvonal párok proliferációs képességének vizsgálata.....	47
4.2.3 A sejtvonal párok migrációs képességének vizsgálata	48
4.2.4 A hosszú távú vemurafenib kezelés hatására bekövetkező molekuláris változások feltérképezése	49
4.2.5 A jelátviteli útvonalak aktiválódása a sejtvonalpárokbán	52
4.2.6 EGFR és PI3K/mTOR inhibitorok hatásának vizsgálata a sejtek életképességére	56
4.2.7 A sejtvonal párok zoledronsav érzékenységének vizsgálata PTEN expressziós státuszuk függvényében.....	59
4.3 Nem-V600 BRAF mutációt hordozó szolid tumoros sejtvonalak pan-RAF és MEK kombinált gátlásra adott válasza.....	60
4.3.1 Életképességi vizsgálatok és a kombinációs index meghatározása a pan-RAF és MEK gátlószerekkel.....	61
4.3.2. A kezelések hatása a sejtciklus eloszlásra	64
4.3.3 A kombinációs kezelés jelátvitelre gyakorolt hatásának vizsgálata.....	65
4.3.4 A kombinációs kezelés hatása a sejtek migrációs képességére.....	67
4.3.5. Apoptózis indukció a kombinációs kezeléseknél	68

4.3.6. A kombinációs kezelés hatása MDAMB231 xenograftokon	70
5. MEGBESZÉLÉS	72
5.1 A PTEN tumorszupresszor hatása a V600E BRAF mutáns melanóma sejtek terápiás érzékenységére	72
5.2 Az EGFR fehérje szerepe a vemurafenib-rezisztens BRAF mutáns melanóma sejtekben	73
5.3 A mutáns BRAF gátlásának hatása melanóma sejtek immun checkpoint fehérjéinek kifejeződésére	75
5.4 A vemurafenib rezisztencia kialakulása során bekövetkező fenotípusváltás molekuláris háttere melanómában	75
5.5 A nem-V600 BRAF mutáns tumorsejtek célzott terápiájának új lehetőségei	77
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	80
7. ÖSSZEFOGLALÁS	81
8. SUMMARY	82
9. IRODALOMJEGYZÉK	83
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	110
10.1 Disszertációhoz kapcsolódó publikációk:	110
10.2 Disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk:.....	110
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	112

RÖVIDÍTÉSEK

RÖVIDÍTÉS	ANGOL KIFEJEZÉS	MAGYAR KIFEJEZÉS
AKT	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	RAC-alfa szerin/treonin-protein kináz
ANOVA	Analysis of variance	Variancia analízis
ARAF	Serine/threonine-protein kinase A-RAF	Szerin/treonin protein kináz A-RAF
ATCC	American type culture collection	Amerikai sejtbank
BRAF	V-raf (viral rapidly accelerated fibrosarcoma) murine sarcoma viral oncogene homolog B1	v-raf murin szarkóma virális onkogén homológ B1
COT	Cancer Osaka thyroid oncogene	Osaka pajzsmirigy onkogén
CRAF	RAF proto-oncogen eserine/threonine-protein kinase	RAF proto-onkogén szerin/treonin protein kináz
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	Dulbecco módosította Eagle médium
DMSO	Dimethylsulfoxide	Dimetil-szulfoxid
DTIC	decarbazin	dekarbazin
EGF / EGFR	Epidermal growth factor / epidermal growth factor receptor	Epidermális növekedési faktor / receptor
EMT	Epithelial mesenchymal transition	Epiteliális mezenhimális átmenet
ERK	Extracellular signal pathway regulated kinase	Extracelluláris szignál útvonal által szabályozott kináz
FBS	Fetal bovine serum	Fötális borjú savó
FDA	Food and Drug Administration	Amerikai Élelmiszer és Gyógyszer Ügynökség
IC50	Half maximal inhibitory concentration	50 %-os gátlási koncentráció
IGFR	Insulin-like growth factor 1 receptor	Inzulin-szerű növekedési faktor receptor
KRAS	Kirsten rat sarcoma oncogene homolog	Kirsten patkány szarkóma onkogén homológ
MAP	Mitogen-activated protein kinase	Mitogén aktivált protein kináz
MDM2	Mouse double minute 2 homolog	Egér double minute 2 homológ

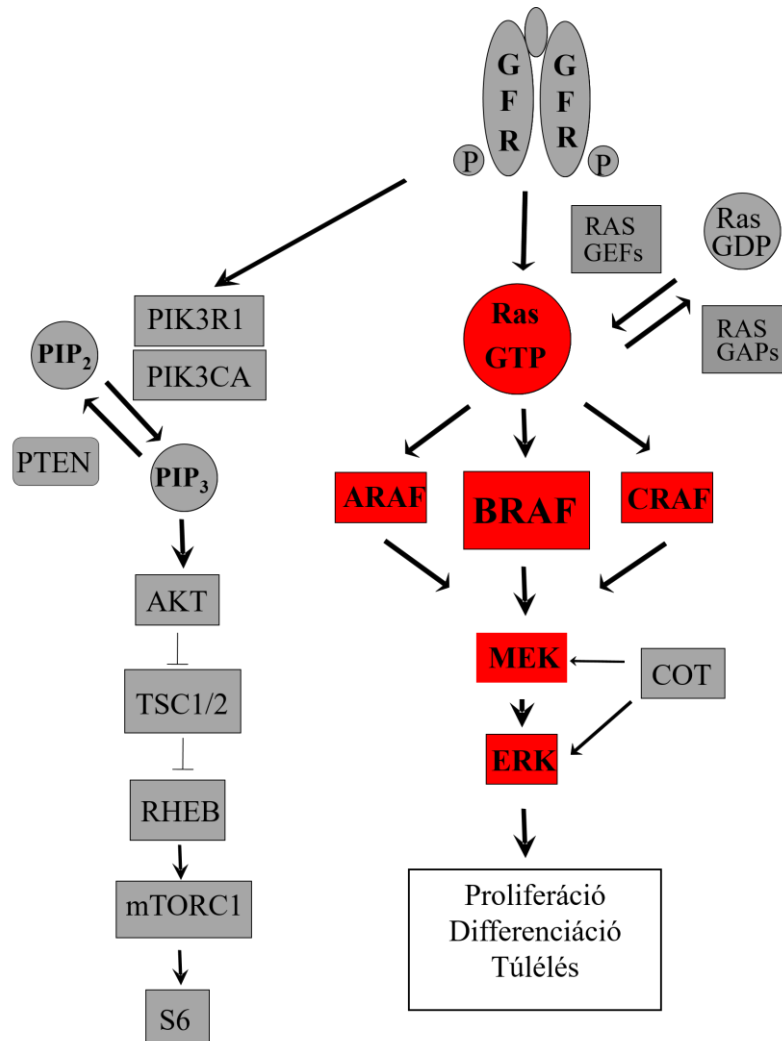
MEK	Mitogen-activated protein kinasekinase	Mitogén aktivált protein kináz-kináz
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor	Mikrophthalmia-asszociált transzkripció faktor
NF1	Neurofibromin-1	Neurofibromin-1
NRAS	Oncogen/protein; neuroblastoma v-ras (viralratsarcoma) oncogene homolog	neuroblasztóma v-ras onkogén homolog
NSG	NOD scid gamma (mice)	NOD scid gamma egér
p53	Tumor protein p53	Tumor protein 53
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	Poliakrilamid gélelektroforézis
pan-RAF	pan-serine/threonine-protein kinase RAF	pán-szerin/treonin protein kináz A-RAF
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase	PoliADP-ribóz-polimeráz
PBS	Phosphate-buffered saline	Foszfát pufferes sóoldat
PCR	Polymerase chain reaction	Polimeráz-lánreakció
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor	Vérlemezke-eredetű növekedési faktor receptor
PFA	Buffered formalin	Pufferelt formalin
PI3K	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate	Foszfatidil-inozitol- 3,4,5 - trifoszfát
PTEN	Phosphatase and tensin homolog	Foszfátáz és tenzin homolog
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR	Kvantitatív valós idejű PCR
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	Ras-függő botulin toxin szubsztrát 1
RTK	Receptor tyrosine kinase	Tirozin-kináz receptor
S6	Ribosomal protein S6	Riboszómális protein S6
SCC	Squamous cell carcinoma	Laphám karcinóma
SDS	Sodiumdodecylsulfate	Nátrium-dodecil-szulfát
SRB	Sulforodamine-B	Szulforodamin-B
TCA	Trichloroacetic acid	Triklórecetsav
TERT	Telomerase reverse transcriptase	Telomeráz reverz transzkriptáz
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferased UTP nick end labeling (assay)	Terminális deoxinukleotidil-transzferáz dUTP vég jelölés
WISTAR	Wistar collection	Wistar sejtbank
ZA	Zoledronic acid	Zoledronsav

1. BEVEZETŐ

A BRAF mutáns szolid daganatok kezelése még számos kihívást tartogat a kutatók és klinikusok számára. Bár már léteznek célzott terápiás lehetőségek a V600 BRAF mutációt hordozó betegek kezelésére, e gátlószerekkel szembeni rezisztencia gyakori jelenség, így a betegek teljes túlélésének jelentős meghosszabbítása számos beteg esetében nem érhető el. Továbbá, a nem-V600 BRAF mutációt hordozó betegek kezelésére jelenleg nem létezik a klinikumban célzott terápiás megközelítés. PhD munkám során a BRAF mutáns szolid tumorok célzott terápia érzékenységét meghatározó molekuláris faktorokat tanulmányoztam. Dolgozatomban három vizsgálat eredményeit dolgozom fel részletesen: elsőként a V600 BRAF mutáció mellett PTEN mutációt hordozó melanómák egy lehetséges, preniláció-gátláson alapuló terápiás lehetőségét mutatom be (Garay és mtsai 2015). Majd a vemurafenibre (specifikus V600 BRAF mutációt célzó inhibitor) érzékeny illetve rezisztens melanóma sejtvonal párokon a rezisztencia kialakulása során fellépő molekuláris és fenotípusos változásokat valamint a BRAF-gátló elleni rezisztencia lehetséges terápiás megoldásait térképezem fel. Végül nem-V600 BRAF mutációt hordozó szolid tumorok - mely daganatok kezelésére jelenleg nem létezik célzott terápia - preklinikai modelljein a pan-RAF és a MEK kombinált gátlásának tumor ellenes hatását vizsgáló kísérleteink eredményeit ismertetem (Molnar és mtsai 2018). Összeségében eredményeink hozzájárulhatnak a BRAF mutáns szolid tumoros betegek terápiájának optimalizálásához.

1.1 A BRAF mutáció szolid daganatokban

A RAF család tagjai közé tartozó ARAF, BRAF és CRAF homo vagy heterodimerként működő szerin/threonin kinázok melyek a RAS/RAF/MEK/ERK jelátviteli pálya (1. ábra) fontos elemei (Kim és mtsai 2016). Extracelluláris mitogén szignál jelenléte nélkül a RAF proteinek a citoplazmában helyezkednek el, multi-protein komplexben más fehérjékkel. Aktiváló szignál jelenlétében a RAS-GTP a plazmamembránhoz toborozza a RAF fehérjét, így elősegítve a RAF-kináz domén aktivációs helyeinek foszforilálódását (Freeman és mtsai 2013, Kim és mtsai 2016), amelyek így homo vagy heterodimert képeznek és aktiválják a downstream elhelyezkedő elemeket a jelpályán (Kim és mtsai 2016) (1. ábra). A dimerizáció normál jelátvitel esetén leggyakrabban a BRAF+CRAF hetero vagy BRAF homodimerizációját jelenti (Freeman és mtsai 2013). Míg az ARAF és CRAF fehérjékben mutációk ritkán jelennek meg (Rebocho és mtsai 2013), a BRAF mutációja az összes humán rákos megbetegedés mintegy 7-15%-ban van jelen (Garnett és mtsai 2005, Turski és mtsai 2016). A BRAF mutáció típusa szerint lehet aminosavcserével járó pontmutáció, más génekkel való fúzió (pl.: KIAA1549, FAM131B) vagy amplifikáció (Turski és mtsai 2016). Dolgozatomban, a továbbiakban kizárólag a BRAF pontmutációkat tárgyalom. A BRAF aminosav cserélődéssel járó mutációja számos daganattípusban előfordul. A szolid daganatok közül többek között melanóma (40-60%), pajzsmirigy (30-80%), kolorektális (5-15 %), ovárium (10-60%) tüdő adenokarcinóma (2-3%) és emlő (1-2%) daganatokban gyakori (Santarpia és mtsai 2012, Samatar és mtsai 2014, Turski és mtsai 2016).



1. ábra A növekedési faktor receptor jelátviteli pálya. Piros színnel a RAS/RAF/MEK/ERK jelpálya fontosabb elemei vannak jelölve, melyek a sejtek osztódásának, túlélésének és differenciálódásának szabályozásában játszanak szerepet (Timar és mtsai 2010).

1.1.1 A BRAF pontmutációk típusai

A BRAF gén összesen 18 exonból áll (2. ábra). Az előforduló mutációk többsége a 11. és a 15. exonon található (de Langen és mtsai 2017). Mind a 11. és 15. exon a kináz doménen belül található, így az itt elhelyezkedő aminosavak cseréi a BRAF kináz aktivitását jelentősen befolyásolhatják (Wellbrock és mtsai 2004, de Langen és mtsai 2017).

	1-10	11	12-14	15	16-18
N	R462I	G466A,E,R,V		N581S	L597Q,R,S,V S602D,A
	I463S	G469, A, E		E586K	A598V W604
	G464E,R,V	Y472C		D594A,G,V	T599E,I,A G606
	S465	K483M		F595L	V600 D,E,K,R
				G596R	K601E

2. ábra A BRAF gén exonjainak sematikus ábrája. A BRAF mutációk főleg a kináz doménhez tartozó 11. és 15. exonokon találhatóak (Zheng és mtsai 2015, de Langen és mtsai 2017).

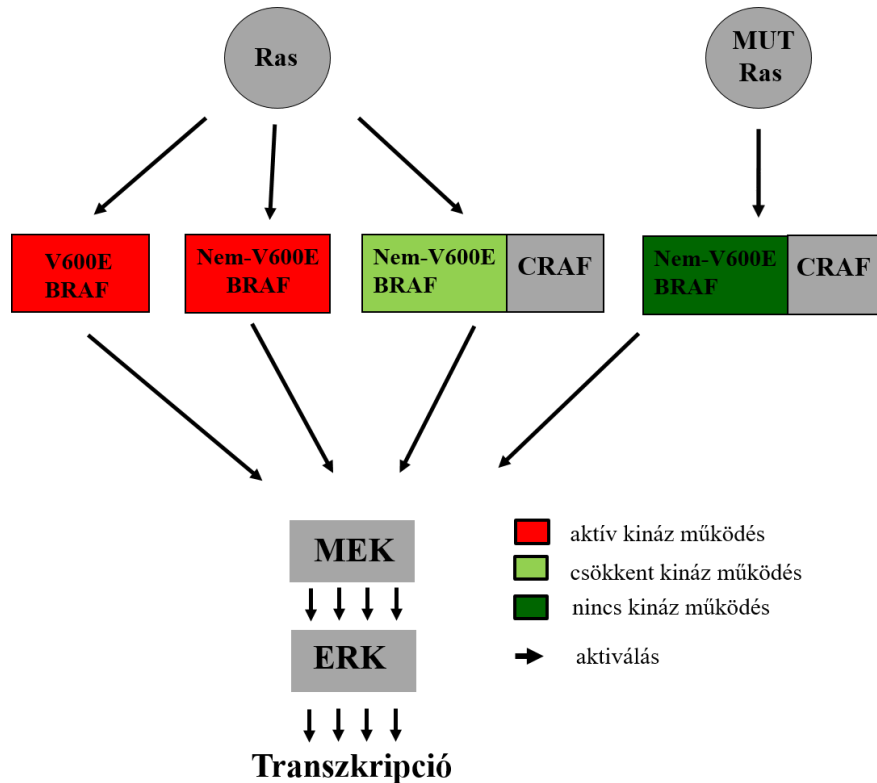
A fent említett BRAF mutációk lehetnek kináz aktivitást serkentő vagy csökkentő mutációk. A kináz aktivitás szerinti csoportosítás az 1. táblázatban látható.

1. táblázat

BRAF mutációk kináz aktivitás szerint csoportosítva (Zheng és mtsai 2015, Noeparast és mtsai 2017).

KINÁZ MŰKÖDÉS AKTIVÁLT	KINÁZ MŰKÖDÉS CSÖKKENT
R462I	G466V,E,R,V
I463S	G469E
G464E,R,V	Y472C
G466A	K483M
G469A,S,V	D594A,G,E,N,V
N581S	G596C,R
E586K	T599A,I
F595L	S602A
L597R,S,V	
A598V	
T599E	
V600D,E,K,R	
K601E	
S602D	

A BRAF mutációi közül (1. táblázat) leggyakrabban a V600E mutáció fordul elő daganatokban (Turski és mtsai 2016). A V600E BRAF mutáció a BRAF kináz aktivitásának emelkedése révén a downstream effektorok aktiválódását, ezáltal pedig onkogén transzformációt indukál a sejtekben (Wan és mtsai 2004, Turski és mtsai 2016). A V600E BRAF mutáns fehérjéknek nem szükséges dimerizálódni, monomerként is képesek aktiválni a downstream elhelyezkedő jelátviteli elemeket (Freeman és mtsai 2013, Samatar és mtsai 2014). Azonban paradox módon, a csökkentett kináz aktivitású BRAF mutációk jelenléte is a MEK/ERK útvonal aktiválódását okozhatja. Ebben az esetben a mutáns BRAF a CRAF-al heterodimerizálódik és a CRAF aktivációja okozza az onkogén szignált (Wan és mtsai 2004, Garnett és mtsai 2005, Heidorn és mtsai 2010, Freeman és mtsai 2013, Zheng és mtsai 2015). A kináz aktivitást teljesen nélkülöző BRAF mutációt hordozó sejtekben a downstream elemek aktivációjához szükséges az onkogén RAS társ mutáció jelenléte is (Heidorn és mtsai 2010) (3. ábra).



3. ábra A MAPK útvonal aktivációja a különböző kináz aktivitású BRAF mutációt hordozó sejtekben. A V600E és a nem-V600E kináz működés aktivált BRAF mutánsokban a downstream effektorok aktiválásának a RAF dimerizáció nem feltétele. A csökkent kináz aktivitású BRAF-mutáns tumorokban a CRAF-al való heterodimerizáció, míg kináz aktivitást nélkülöző BRAF-mutáns tumorokban onkogén RAS (MUT Ras) jelenléte is szükséges a downstream elemek aktiválásához (Zheng és mtsai 2015).

1.1.2 A V600E és nem-V600E BRAF mutáció előfordulási gyakorisága különböző szolid daganatokban

Annak ellenére, hogy csaknem 80%-ban a V600E BRAF mutáció fordul elő a BRAF-mutáns daganatokban, bizonyos tumor típusokban a nem-V600E BRAF mutációk jelentősége sem elhanyagolható (Carter és mtsai 2015, Kim és mtsai 2016, Tissot és mtsai 2016, Turski és mtsai 2016). A BRAF-mutáns esetek közül a nem-V600E BRAF mutációk gyakoriságát a 2. táblázat foglalja össze (Beadling és mtsai 2011, Carter és mtsai 2015, Wong és mtsai 2015, Zheng és mtsai 2015, Tissot és mtsai 2016, Cheng és mtsai 2018). A nem-V600E BRAF mutációk közül a leggyakoribbak melanómában a V600K/R/D,

L567V, tüdő adenokarcinómában a G469A/V, D594G, kolorektális daganatban a D594G/N/E/V, G469A/V/E és G466V/R/E mutációk (Paik és mtsai 2011, Litvak és mtsai 2014, Jones és mtsai 2017, Cheng és mtsai 2018). Fontos megemlíteni, hogy a nem-V600 BRAF mutáns tumorok gyakran hordoznak onkogén RAS társ mutációt, amely összefüggésben van azzal, hogy a nem-V600 BRAF mutáns tumorokban az onkogén RAS mutáció jelenléte szerepet játszhat a CRAF-on keresztüli ERK/MEK jelátvitel aktiválásában (3. ábra). Zheng és munkatársai tüdőrákon, kolorektális daganaton és melanómán vizsgálták a BRAF mellett előforduló RAS mutációk arányát (Zheng és mtsai 2015). Eredményeik alapján, míg a V600 BRAF mutáció mellett nem fordult elő RAS mutáció, a nem-V600 BRAF mutáció mellett gyakran megfigyelhető: 12 % tüdő adenokarcinómában, 8,8 % kolorektális daganat és 4,5 % melanóma esetén. Más tanulmányok szerint melanóma, kolorektális és pajzsmirigy daganatban V600 BRAF mutáció mellett sem kizárható a RAS mutáció jelenléte (Seth és mtsai 2009, Jovanovic és mtsai 2010, Zou és mtsai 2014, Albanell és mtsai 2017, Jones és mtsai 2017).

2. táblázat

BRAF mutációt gyakran hordozó szolid daganatok BRAF mutáció megoszlása (Beadling és mtsai 2011, Carter és mtsai 2015, Wong és mtsai 2015, Zheng és mtsai 2015, Kim és mtsai 2016, Tissot és mtsai 2016, Albanell és mtsai 2017, Cheng és mtsai 2018).

DAGANAT TÍPUSA	BRAf MUTÁCIÓ	
	V600	nem-V600
melanóma	66-93 %	7-34 %
tüdő adenokarcinóma	14-50 %	50-86 %
kolorektális	77-92 %	8-23 %
pajzsmirigy	90-99 %	1-10 %
ovárium	90 %	10 %
emlő	34%	66%

1.2 A V600 BRAF mutáns szolid tumorok célzott terápiája

A BRAF-ot, mint onkogént 2002-ben azonosították (Davies és mtsai 2002, Davis és mtsai 2012). A BRAF kristályszerkezete 2004-ben vált elérhetővé, utat nyitva az új, hatékony BRAF-gátlók fejlesztésének (Wellbrock és mtsai 2004, Davis és mtsai 2012). Mivel a leggyakoribb onkogén BRAF mutáció a V600E, a gyógyszercégek e mutáns ellen kezdték el a gátlószer fejlesztéseket. A sorafenib (3. táblázat) nevű gátlószert eredetileg pan-RAF (CRAF, vad BRAF, V600E mutáns BRAF) inhibitoroként fejlesztették ki, azonban későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy más kinázokat is gátol (VEGFR, PDGFR, C-KIT, FLT-3) (Eisen és mtsai 2006, Gadaleta-Caldarola és mtsai 2015). Azonban klinikai fázisvizsgálatokban a sorafenib hatástalannak bizonyult V600E BRAF mutáns melanóma kezelésében (Eisen és mtsai 2006). Az első igazolhatóan klinikailag hatékony BRAF gátló a Plexxikon cég PLX4032, más néven vemurafenib (3. táblázat) elnevezésű vegyülete volt, amely drámai terápiás hatást mutatott V600E BRAF mutációt hordozó melanómás betegekben. A kezelést kapott betegek mintegy 80 %-a adott, részleges vagy teljes választ a gátlószerre (Flaherty és mtsai 2010). Az amerikai Food and Drug Administration (FDA) 2011-ben engedélyezte a vemurafenib terápiát előrehaladott, V600E BRAF mutációt hordozó melanómás betegek kezelésében (Davis és mtsai 2012). A vemurafenib mellett a dabrafenib nevű vegyület a másik klinikai használatban lévő V600E BRAF mutáció specifikus gátlószer, mely 2013-ban került engedélyezésre (Volpe és mtsai 2017). Fontos megemlíteni, hogy a V600E mutáció mellett V600K mutációt hordozó áttétes melanómás betegekben is engedélyezték e két szer használatát (Wood és mtsai 2016).

Mivel a BRAF V600 mutáns tumorokban a downstream elhelyezkedő MEK is aktivált állapotba kerül, felmerült a MEK-gátlók használatának terápiás lehetősége is (Volpe és mtsai 2017). A MEK-inhibitorok közül a trametinib és cobimetinib van jelenleg klinikai használatban, míg a selumetinib és binimetinib még klinikai fázisvizsgálatok alatt állnak (Volpe és mtsai 2017). A trametinib kezelés habár nagyobb terápiás választ mutatott a hagyományos kemoterápiás kezelésnél, a BRAF-gátlókat nem sikerült túlszárnyalnia (Welsh és mtsai 2016). A MEK-gátló monoterápia mellett a BRAF és MEK kombinált gátlásának terápiás hatását is vizsgálták a V600 BRAF mutáns melanómás betegek esetében. A vemurafenib és cobimetinib valamint a dabrafenib és trametinib kombinált

terápia alkalmazása mutatott nagyobb túlélést, mint a monoterápia, így ezen kombinációk klinikai használatát már engedélyezték (Volpe és mtsai 2017).

A melanóma mellett más V600 BRAF mutáns tumorokban is vizsgálták a BRAF és MEK-gátlók hatásosságát. V600E BRAF mutáns tüdőrákban is folynak klinikai fázisvizsgálatok BRAF és MEK-gátlókkal valamint kombinációs alkalmazásban is, az eredmények alapján ebben a betegségben is elérhető terápiás válasz a betegekben (Hyman és mtsai 2015, Planchard és mtsai 2016, Planchard és mtsai 2016, Baik és mtsai 2017). A dabrafenib és trametinib kombinált kezelés jelentős tumor ellenes hatást mutatott a V600E BRAF mutáns tüdőrákban, így az FDA 2017-ben engedélyezte klinikai használatát (Myall és mtsai 2016, Planchard és mtsai 2016, Planchard és mtsai 2016, Pervere és mtsai 2017).

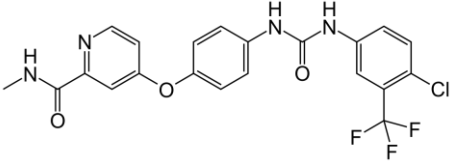
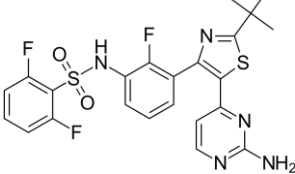
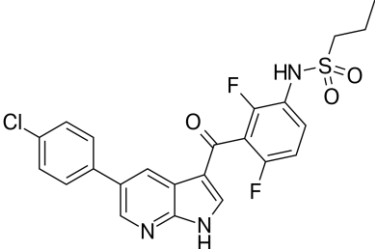
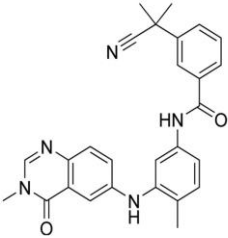
V600E BRAF mutáns kolorektális daganatos betegekben a BRAF-gátló alkalmazása sikertelen volt (Corcoran és mtsai 2015, Hyman és mtsai 2015). A sikertelenség magyarázata lehet, hogy kolorektális daganat esetén a BRAF-gátlóval történő kezelés az EGFR aktivációját okozza, visszakapcsolási mechanizmuson keresztül (Prahallad és mtsai 2012). Ennek megfelelően az EGFR-gátló és BRAF-gátló vegyületek kombinációja hatékony megközelítés lehet a V600E BRAF mutáns kolorektális daganat kezelésében (Hyman és mtsai 2015, Cohen és mtsai 2017).

Pajzsmirigy-daganatokban, ahol szintén nagy számban fordul elő V600E BRAF mutáció szintén vizsgálták a BRAF-gátlók hatékonyságát (Brose és mtsai 2016, Prager és mtsai 2016, Shah és mtsai 2017, White és mtsai 2017). Mind a vemurafenib monoterápia, mind a dabrafenib és trametinib kombinált kezelés klinikailag igazolható tumor ellenes hatást mutatott a betegekben (Brose és mtsai 2016, Shah és mtsai 2017).

Alacsony grádusú, szerózus V600E BRAF mutációt hordozó petefészek daganatban néhány esetbemutatás található az irodalomban, melyek igazolják, hogy a vemurafenibbel való kezelés részleges választ eredményezett (Combe és mtsai 2015, Hyman és mtsai 2015).

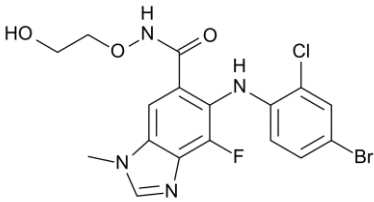
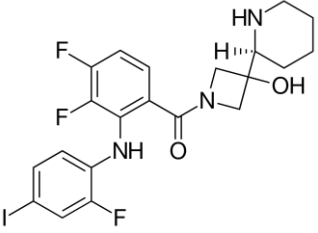
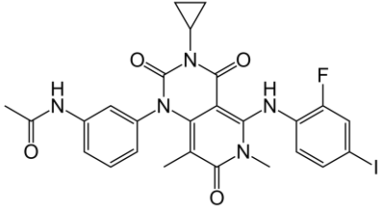
3. táblázat

Néhány általunk is alkalmazott, klinikai vizsgálat alatt lévő BRAF gátló szerkezete és célpontjainak IC₅₀ értéke. (Yeh és mtsai 2007, Montagut és mtsai 2008, Rahman és mtsai 2014, Garnock-Jones 2015) *Sorafenib, multikináz inhibitor egyéb célpontjai: RET (47 nM), c-KIT (68 nM), FLT-3 (33 nM), VEGFR1 (26 nM).

VEGYÜLET NEVE	SZERKEZET	CÉLPONT (IC ₅₀)		
		BRAF ^{WT}	BRAF ^{V600E}	CRAF
Sorafenib*		25 nM	38 nM	6 nM
Dabrafenib		3,2 nM	0,8 nM	5 nM
Vemurafenib		100 nM	31 nM	48 nM
AZ628		100 nM	30 nM	30 nM

4. táblázat

Néhány klinikai vizsgálat alatt lévő MEK gátló szerkezete és IC₅₀ értéke (Yeh és mtsai 2007, Garnock-Jones 2015).

VEGYÜLET NEVE	SZERKEZET	CÉLPONT (IC ₅₀)
		MEK 1
Selumetinib		14 nM
Cobimetinib		0,9 nM
Trametinib		0,9 nM

1.2.1 Mellékhatások

A BRAF inhibitorok használata során a kezdeti kedvező terápiás hatás mellett mellékhatásokkal is számolni kell. A gyakran előforduló mellékhatások között szerepelnek a különböző bőrt érintő elváltozások, mint kiütések, viszketés, fényérzékenység, hiperkeratózis, valamint ízületi fájdalmak, máj toxicitás és szívritmus zavarok. A mellékhatások megjelenése, súlyosságuktól függően az inhibitor dózisének csökkentését vagy a kezelés felfüggesztését jelenthetik (Hagen és mtsai 2014).

Fontos kiemelni, hogy a „BRAF inhibitor paradoxon” hatás miatt a kezelés hatására másodlagosan laphám karcinómák jelenhetnek meg a betegeken (Hagen és mtsai 2014, Merat 2017). A BRAF gátlók okozta paradox onkogén hatást a pan-RAF inhibitorok

(sorafenib) esetében írták le először, azonban a specifikus BRAF mutáció gátlók (vemurafenib, dabrafenib) esetében még hangsúlyosabban megjelenhet (Merat 2017). A paradox onkogén hatás szerint a V600E BRAF-ra specifikus gátlószer a vad típusú BRAF-ot és mutáns RAS-t hordozó sejtekben az ERK hiperaktivációját okozza (Weeraratna 2012, Holderfield és mtsai 2014, Hantschel 2015, Merat 2017). A jelenség hátterében a BRAF és a CRAF heterodimerizációja és így a CRAF-on keresztül végbemenő aktiváció állhat (Weeraratna 2012, Hantschel 2015). A paradox hatás kiküszöbölésre fejlesztés alatt állnak olyan BRAF-gátlók (PLX7904 és PLX8394), melyek a paradox onkogén hatást nem mutatják, így ígéretes másodgenerációs BRAF-gátlóknak tekinthetőek (Zhang 2015). A PLX8394 elnevezésű vegyület BRAF mutáns melanóma, tüdő és kolorektális daganatok preklinikai modelljeiben hatékony gátlószernek bizonyult (Okimoto és mtsai, Zhang 2015, Okimoto és mtsai 2016, Tutuka és mtsai 2017).

Emellett megfigyelték, hogy a több mint két évig tartó BRAF inhibitorral való kezelés után a vastagbél adenómák előfordulási gyakorisága is nagymértékben megnövekszik, amely szintén a BRAF inhibitor paradox hatással hozható összefüggésbe (Amaravadi és mtsai 2015, Kelleher és mtsai 2017).

1.2.2 A BRAF V600 inhibitorok elleni rezisztencia melanómában

A célzott terápiás kezelés jellemzője, hogy a kezdeti gyors tumor ellenes hatás után drámai visszaesés következik be a kezelés hatékonyságában, melynek oka a célzott gátlószer ellen megjelenő rezisztencia (Hughes és mtsai 2016).

A célzott terápiás gátlószer elleni rezisztencia egyik leggyakoribb formája az ún. gate-keeper mutációk megjelenése a célzott molekulában, azonban a BRAF-gátlókkal kapcsolatosan ez a mechanizmus nem játszik szerepet (Sullivan és mtsai 2013). A V600 BRAF inhibitorok elleni rezisztencia lehet eredendően jelenlévő és a kezelés közben fellépő (Sullivan és mtsai 2013). Az eredendően jelenlévő rezisztencia nagyjából a betegek 10%-át érinti (Lim és mtsai 2017). Hátterében, a sejtekben a BRAF V600 mutáció melletti egyéb mutációk jelenléte illetve a sztróma által szekretált aktiváló faktorok állhatnak (Fedorenko és mtsai 2011, Sullivan és mtsai 2013). A szerzett rezisztencia oka leggyakrabban a MAPK-út vonal újraaktiválódása, de előfordulhat a

MAPK útvonaltól független menekülési stratégia is a BRAF-gátlás hatása alól (Sullivan és mtsai 2013, Rizos és mtsai 2014). Ugyanakkor a betegek 25-40%-ban ismeretlen a rezisztencia mechanizmus (Lim és mtsai 2017). Fontos kiemelni, hogy komoly problémát jelent a rezisztencia leküzdésében a tumorok heterogenitása, az egy betegből származó, de különböző helyekről vett biopsziákban sokféle rezisztencia mechanizmus volt igazolható mind az egyes tumorokon belül mind a tumorok között (Lim és mtsai 2017). Mivel PhD munkám során a V600 BRAF mutáns tumorok közül kizárólag melanóma sejtvonalakkal végeztem kutatást, így a továbbiakban a melanómában előforduló BRAF-gátló rezisztencia mechanizmusokat ismertetem részletesebben (5. táblázat).

5. táblázat

BRAF-gátló rezisztenciát okozó mutációk összefoglalása. (Glitza és mtsai 2014).

GÉN NEVE	MUTÁCIÓ TÍPUSA
BRAF	Amplifikáció, splice variánsok
RAS	Pontmutáció
NF1	Pontmutáció
MEK	Pontmutáció
PI3K	Pontmutáció
PTEN	Deléción
AKT	Pontmutáció
IGF1R	Növekedett expresszió és aktiváció
EGFR	Növekedett expresszió és aktiváció
PDGFR	Növekedett expresszió és aktiváció
Ciklin D	Kópiaszám növekedés
CDK 4/6	Pontmutáció
CDKN2A	Pontmutáció
RAC1	Pontmutáció
p53	Pontmutáció
TERT	Promóter pontmutáció
MITF	Expresszió szint változás

1.2.2.1 RAS és NF1

A MAPK útvonal újraaktiválódásának egyik gyakori oka a RAS mutációk megjelenése a sejtekben. Mind a vizsgálatot megelőzően BRAF-gátló kezelést kapott, és nem kapott betegekben vizsgálták a RAS mutáció jelenlétét. A BRAF-gátló kezelést kapott betegekben az NRAS mutáció megjelenése gyakori esemény, az esetek mintegy 8-37%-ban fordul elő. Az NRAS mellett a KRAS mutációja is előfordulhat (7%) (Rizos és mtsai 2014, Shi és mtsai 2014). Azonban BRAF-gátló kezelést nem kapott melanómás betegekben Zheng és munkatársai megállapították, hogy V600E BRAF mutáció mellett nem fordult elő RAS mutáció. Ezzel ellentétben Jovanovic és munkatársai leírtak 3 olyan melanómás esetet, ahol NRAS Q61 mutáció mellett V600E BRAF mutáció volt megtalálható (Jovanovic és mtsai 2010). Fontos kiemelni, döntő fontosságú annak bizonyítása, hogy a RAS és BRAF mutáció valóban egyazon sejtben volt jelen. Míg Zheng és munkatársai mutáns allél-frekvencia vizsgálattal bizonyították ezt, addig Jovanovic és munkatársai ilyen jellegű vizsgálatokat nem végeztek.

A RAS mutáció miatt megjelenő rezisztencia megszüntetésére több preklinikai vizsgálatot is végeztek (Nazarian és mtsai 2010, Greger és mtsai 2012). Kimutatták, hogy RAF vagy MEK és PI3K/AKT gátlók kombinált alkalmazásával ezen rezisztens sejtekben is terápiás válasz érhető el (Greger és mtsai 2012).

Fontos még megemlíteni, hogy a RAS mellett a RAS aktiválódását gátló, így tumorszuppresszorként működő NF1 funkcióvesztése szintén hozzájárulhat a MAPK útvonal reaktiválódásán keresztül a BRAF vagy MEK-gátló rezisztencia kialakulásához (Whittaker és mtsai 2013).

1.2.2.2 MEK1 és aktivátorai

A MEK1-ben megjelenő mutációk szintén a MAPK útvonal reaktiválódásán keresztül a BRAF-gátlókkal szembeni rezisztenciához vezetnek (Greger és mtsai 2012). A MEK1 mutáció megjelenése a rezisztens esetek körülbelül három százalékában fordul elő (Shi és mtsai 2014). A MEK1 mutációk közül a P124S és C121S mutáció mutatott összefüggést a BRAF-gátló terápia hatékonyságával (Wagle és mtsai 2011). BRAF-gátlóval kezelt P124S MEK1 és V600E BRAF kettős mutáns betegek rövidebb progressziómentes túlélési idővel bírtak, mint a csak V600E BRAF mutáns betegek (Carlino és mtsai 2015). Sejtvonalakon végzett vizsgálatokban kimutatták, hogy a BRAF-

gátló rezisztenciát okozó MEK1 mutánsok esetében a BRAF és MEK vagy ERK-gátló kombinált alkalmazása csökkentette a rezisztens klónok megjelenését (Emery és mtsai 2009, Carlino és mtsai 2015). A MEK aktivátor COT fehérje aktiválódása szintén összefüggésbe hozható a BRAF-gátlókkal szembeni rezisztenciával (Arozarena és mtsai 2017).

1.2.2.3 RAF amplifikáció és splice variánsok

Habár BRAF specifikus gátlószer hatására másodlagos mutációk nem jelennek meg a BRAF-ban, a BRAF vagy CRAF fehérje szintű amplifikációja és BRAF splice variánsok megjelenése állhat a BRAF-gátló rezisztencia hátterében (Montagut és mtsai 2008, Corcoran és mtsai 2011, Wagle és mtsai 2014). Poulidakos és munkatársai kimutatták, hogy a RAS-kötő domént nélküli BRAF splice-variánsok képesek a RAS közreműködése nélkül is dimerizálódni és aktiválni a MEK/ERK jelpályát (Poulidakos és mtsai 2011). Egy BRAF+MEK-gátló kezelést kapott melanómás betegeket vizsgáló kohortban az esetek 40%-ban állapították meg BRAF amplifikációt és 20-30%-ban BRAF splice variánsok megjelenését (Poulidakos és mtsai 2011, Long és mtsai 2014, Wagle és mtsai 2014).

1.2.2.4 Tirozin kináz receptorok (RTK)

Az RTK közül az EGFR, IGF1R és a PDGFR β hozható összefüggésbe a BRAF-gátló rezisztenciával (Nazarian és mtsai 2010, Villanueva és mtsai 2010, Girotti és mtsai 2013). A PDGFR β amplifikációja BRAF-gátló rezisztenciát okozott sejtvonalakon végzett vizsgálatban (Nazarian és mtsai 2010). Az IGF1R fehérje szint megemelkedésének BRAF-gátló rezisztenciában játszott szerepét preklinikai vizsgálatokban is bizonyították valamint megfigyelték BRAF-gátlóval kezelt melanómás betegek relapszusaiban is (Villanueva és mtsai 2010). Az EGFR emelkedett szintjét és aktivációját szintén igazolták BRAF-gátlóra rezisztens melanóma sejtvonalakon (Girotti és mtsai 2013). Továbbá kimutatták, hogy a BRAF-gátló rezisztens melanómákban az EGFR expressziója epigenetikai változások miatt növekedett meg és a PI3K/AKT útvonal aktivációját okozta (Wang és mtsai 2015).

1.2.2.5 PI3K/AKT és PTEN

A PI3K/AKT útvonal (1. ábra) párhuzamos onkogén aktivációja is előfordulhat BRAF mutáns tumorokban. Mind BRAF-gátló kezelést nem kapott betegek mintáiban, mind kezelés utáni rezisztens tumor mintákban a PI3K és az AKT társ mutáció előfordulási gyakorisága 3-4,5 % körülnek adódott (Shi és mtsai 2014, Manca és mtsai 2015, Zheng és mtsai 2015). Az AKT mutáció közül a Q79K és E17K, a PI3K mutáció közül a D350G és az E545G/K mutatott BRAF-gátló rezisztenciával összefüggést egy melanóma sejtvonalakon végzett kutatásban (Shi és mtsai 2014).

A PTEN tumorszuppresszor funkcióvesztéses mutációja is vezethet a PI3K/AKT útvonal aktivációjához. Melanóma esetében a V600E BRAF mutáció mellett megjelenő PTEN funkcióvesztéses mutáció hozzájárulhat a metasztatikus melanóma kialakulásához és progressziójához, valamint szignifikánsan rosszabb túlélést mutat és gyorsabb agyi áttétképződéshez vezet (Dankort és mtsai 2009, Bucheit és mtsai 2014). PTEN funkcióvesztéses mutáció V600E BRAF mutáció mellett gyakran, mintegy 31%-os gyakorisággal fordult elő BRAF-gátló kezelést nem kapott betegek mintáiban (Bucheit és mtsai 2014). Catalanotti és munkatársai vizsgálatai azt mutatták, hogy a PTEN mutációja, habár nem minden esetben, de szignifikánsan rontotta a teljes túlélést (Catalanotti és mtsai 2017). Egy másik tanulmány szerint a progressziómentes túlélés csaknem felére csökkent a PTEN társ mutációt is hordozó csoportban (Nathanson és mtsai 2013). Melanóma sejtvonalakon végzett vizsgálatok is alátámasztották, hogy a PTEN társ mutációt hordozó BRAF mutáns tumorok kevésbé érzékenyek a BRAF gátlószerekre (Paraiso és mtsai 2011). BRAF mutáns és PTEN funkcióvesztéses melanóma sejtvonalakban a BRAF-gátló kezelés AKT aktiváció emelkedését és apoptózis csökkenést okozott (Paraiso és mtsai 2011). A PTEN vad típusú melanómákhoz képest a PTEN funkcióvesztéses mutáció magasabb AKT alap aktivációs és integrin expressziós szintet okozott, valamint ezen sejtvonalak a BRAF-gátlásra a citotoxikus válasz elkerülését mutatták (Fedorenko és mtsai 2016). Preklinikai vizsgálatokban kimutatták, hogy a BRAF+PTEN kettős mutáns melanómákban a panPI3K+IGFR+BRAF kombinációs gátlás hatékonyabb lehet, mint a BRAF monoterápia (Herkert és mtsai 2016).

A PTEN funkcióvesztéses mutációt hordozó melanómákban felmerülhet a PI3K/AKT útvonal gátlásának más terápiás megközelítése is. A Rheb kis GTP-áz fehérje

farnezilálódása szükséges ahhoz, hogy az mTORC1-et aktiválja, így a PI3K/AKT útvonal aktiválódjon, így felmerülhet a farneziláció gátlás lehetősége a PI3K/AKT útvonal gátlására (1. ábra). A PTEN funkcióvesztéses mutációt hordozó limfómákban a farnezilációt gátló szerek tumor ellenes hatását már igazolták (Mavrakis és mtsai 2008). A biszfoszfonátok közé tartozó zoledronsav a farnezildifoszfónát-szintáz gátolja és számos tumortípusban igazolták proliferációt gátló és apoptózis indukáló hatását (Zekri és mtsai 2014). Továbbá emlő és húgyhólyag tumorok esetében igazolták, hogy a zoledronsav tumor növekedést gátló hatása a PTEN/AKT útvonalon keresztül érvényesül (Li és mtsai 2011, Fragni és mtsai 2016). A fentiek alapján a V600E BRAF mutáns + PTEN funkcióvesztéses tumorok esetében is felmerülhet a zoledronsav tumor ellenes hatásának lehetősége.

1.2.2.6 p53

A p53 mutációja a leggyakoribb előforduló mutáció humán daganatokban, az esetek mintegy felében megjelenhet (Yu és mtsai 2009, Muller és mtsai 2014). A p53 fehérje a genom őrzője, a DNS károsodása esetén szabályozza, hogy DNS-javítás vagy az sejthalál folyamata menjen végbe a sejtben (Bond és mtsai 2012). A p53 mutációi közül előfordulhat funkció-nyeréses és funkció veszteses mutáció is (Muller és mtsai 2014). A p53 pontmutációja általában agresszívebb tumor fenotípushoz vezet, mint a vad típusú vagy funkcióvesztéses p53 mutációt hordozó tumorok (Muller és mtsai 2014).

Melanómában a betegek mindössze 10-18 %-a hordoz p53 pontmutációt (Box és mtsai 2014, Kim és mtsai 2016). Továbbá a V600E BRAF és p53 kettős mutáns esetek 12 – 22 %-ban fordulnak elő. Jelenleg klinikai vizsgálat alatt van dabrafenib+trametinib valamint mdm2-p53 kapcsolódást gátló (AMG232) kombinációs terápiája (Eroglu és mtsai 2016).

1.2.2.7 TERT

Humán tumorokban a telomeráz reverz transkriptáz (TERT) promóter mutációjának előfordulása gyakori esemény és a mutáció már a tumorgenezis első lépéseiben megjelenik (Bell és mtsai 2016). A leggyakoribb pontmutációk 124 (C228T) és 146 (C250T) bázispárral a translációs start kodon előtt helyezkednek el (Bell és mtsai 2016). TERT mutáció BRAF mutáns melanómában 21%-os gyakorisággal fordul elő (Macerola és mtsai 2015, Vuong és mtsai 2017). Kimutatták, hogy melanóma esetében a BRAF és

TERT kettős mutáns tumorok agresszívabb fenotípussal és rosszabb túléléssel járnak, mint csak az egyik mutációt hordozó tumorok (Xing és mtsai 2014, Macerola és mtsai 2015, Liu és mtsai 2016).

TERT és BRAF kettős mutáns melanómában a RAS-ERK jelátvitel onkogén aktivációja központi szerepet játszik az aktív kromatin regulációjában és az RNS polimeráz II mutáns TERT promóterhez való kapcsolódásában (Li és mtsai 2016). A TERT mutáció megjelenése a BRAF mutáció mellett hozzájárulhat a benignus naevusból való malignus melanóma kialakulásához (Li és mtsai 2016). A fentiek alapján felvetődik a lehetőség BRAF és TERT promóter gátlók kombinált alkalmazásának terápiás előnyeiről a BRAF és TERT kettős mutáns melanómákban (Li és mtsai 2016).

1.2.2.8 Ciklin D1/CDK4/6/CDKN2A

A sejtciklus szabályozásában fontos szerepet betöltő p16-ciklinD1-CDK4/6 útvonal gyakran sérült melanómában (Yadav és mtsai 2015, Yoshida és mtsai 2016). Leggyakrabban a CDKN2A vagy CDK4 mutációja valamint a ciklinD1 amplifikáció okozza a sejtciklus szabályozás zavarait. Ezek a mutációk a V600E BRAF mutáns esetek mintegy felében fordulhatnak elő (Yadav és mtsai 2015). Sejtvonalakon végzett vizsgálatok is alátámasztották, hogy a ciklinD1 amplifikáció BRAF-gátló rezisztenciát okoz (Smalley és mtsai 2008). Betegmintákon végzett vizsgálatokban a ciklinD1 amplifikáció és CDKN2A deléción rosszabb progressziómentes túléléssel társult, mint az ezeket a társ mutációkat nem hordozó csoportban (Nathanson és mtsai 2013). Mivel a ciklinD1 amplifikáció érzékenyíti a tumorokat a CDK4/6-gátlókra, felmerülhet a CDK4/6-gátlók használata a BRAF-gátló rezisztens melanómákban (Yadav és mtsai 2015). Preklinikai vizsgálatokban kimutatták, hogy a BRAF-gátlóra rezisztens vonalak CDK4/6-gátló kezelésre szenzitívek maradtak (Yoshida és mtsai 2016). Továbbá BRAF és CDK4/6-gátlók kombinált alkalmazására klinikai vizsgálatok vannak folyamatban (Yadav és mtsai 2015).

1.2.2.9 RAC1

A RAC1 fehérje a Rho kis GTP-ázok közé tartozik és a tumorgenezis és metasztázis folyamataiban vesz részt (Watson és mtsai 2014). A RAC1 P29S mutációja a betegek 4-7%-ában található meg és vemurafenib rezisztencia kialakulásához vezethet (Watson és

mtsai 2014, Halaban 2015). Egy nemrég megjelent közlemény szerint a p21 aktivált kináz (PAK) elleni gátlószerek hatékonyak lehetnek a RAC1 mutáns melanómák kezelésében (Araiza-Olivera és mtsai 2018).

1.2.2.10 MITF

A MITF transzkripciós faktor a melanociták fejlődésének központi szabályozója és a melanóma progressziójában is fontos szabályozó funkcióval bír (Levy és mtsai 2006). A MITF expressziójára szükség van a melanóma sejtek túléléséhez, valamint expressziós szintje befolyásolja a melanóma sejtek proliferációt, inváziót és túlélési képességét. (Wellbrock és mtsai 2008, Wellbrock és mtsai 2015). Az onkogén BRAF mutáció közvetlen hatással van a MITF fehérje expressziójára, szabályozza az optimális MITF expressziós szintet a tumor sejtek túléléséhez (Wellbrock és mtsai 2015). Egyre több bizonyíték van arra, hogy a MITF a BRAF-gátló elleni rezisztenciát jelző fehérje. Az eddigi vizsgálatok eredményei ellentmondásosak, mind a növekedett, mind a hiányzó MITF expresszió összefüggésbe volt hozható a rezisztencia kialakulásával (Wellbrock és mtsai 2015). Egy tanulmányban kimutatták, hogy a BRAF-gátlóval való kezelés kezdeti szakaszában a MITF expressziója fokozatosan növekszik és hozzájárul a rezisztens klónok kiválogatódásához (Smith és mtsai 2016). Továbbá Van Allen és munkatársai BRAF-gátló rezisztens betegek mintáiban MITF gén amplifikációját mutatták ki (Van Allen és mtsai 2014). Ugyanakkor a MITF hiányzó expressziója együtt jár az AXL/WNT5 emelkedett szintjével, ami egy agresszív, rezisztens melanóma populációt eredményez (Muller és mtsai 2014). Egy funkcionális vizsgálatban megállapították, hogy a MITF depléciója az EGFR jelátvitel aktivációjához és rezisztens fenotípus megjelenéséhez vezet, míg a MITF magas expressziója BRAF és MEK-gátló érzékenységet okoz (Ji és mtsai 2015).

1.3 A melanóma immun checkpoint fehérjék gátlásán alapuló terápiája

A melanóma alapvetően immunogén daganat, így az immunsejtek működésének befolyásolása hatással lehet a daganat progressziójára. Ezt bizonyítja az a két megfigyelés, mely szerint az elsődleges daganat eltávolítása és az áttétek kialakulása

között gyakran hosszú idő telik el, valamint néhány esetben megfigyelték a melanóma spontán gyógyulását is (Sullivan és mtsai 2013).

Jelenleg a PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) és CTLA-4 (ipilimumab) T-sejtes immunválaszt gátló receptorok gátlásán alapuló immunterápiák elfogadottak melanómában (Hughes és mtsai 2016). Mivel a BRAF-gátlók használata megnövelheti az immunsejtek aktivitását és az antigén bemutatást, a BRAF V600 mutációt hordozó melanómákban klinikai fázisvizsgálatok vannak a V600 BRAF specifikus inhibitorok és immunterápiák kombinálásának hatékonyságának tesztelésére (Hughes és mtsai 2016). Az első eredmények alapján a vemurafenib és ipilimumab kombinációs alkalmazása biztató eredményeket hozott és a kezelés mellékhatásai jól tolerálhatónak bizonyultak (Hassel és mtsai 2016). Azonban vannak olyan tanulmányok is, amelyek a mellékhatásként megjelenő, súlyos májtoxicitás miatt nem ajánlják a két szer kombinált alkalmazását (Park és mtsai 2013). Felmerült a lehetősége a BRAF-gátlók és immunterápia egymás után történő alkalmazásának is. Egy nemrég megjelent tanulmány szerint a korábban BRAF-gátlót kapott betegek közül, akik több mint 6 hónapig reagáltak a kezelésre, utána jobban reagáltak a másodvonalbeli anti-PD-1 terápiára, mint akik gyorsan progrediáltak a BRAF-gátló kezelésre (Johnson és mtsai 2017).

1.4 A BRAF-gátló rezisztencia hatása a melanóma sejtek fenotípusára

Több tanulmány kimutatta, hogy a BRAF-gátlóra rezisztens sejtek invazívabb fenotípussal bírnak, mint a BRAF-gátlóra érzékeny sejtek (Li és mtsai 2015, Wang és mtsai 2015, Cordaro és mtsai 2017). Az invazív fenotípus kialakulásának folyamata az epitéliális – mezenhimális átmenet (EMT) (Tulchinsky és mtsai 2014). Az EMT során az eredetileg epitél jellegű sejtek elveszítik apikális-bazális polarizáltságukat valamint a környező sejtekhez és a bazális membránhoz való kapcsolódásukat. Ugyanakkor a mezenhimális sejtekhez hasonló fehérjéket kezdenek el termelni (Pearlman és mtsai 2017). A melanómára jellemző EMT során fellépő fehérje expressziós szint változásokat a 6. táblázat tartalmazza.

Melanómában az EMT folyamatát több útvonal (RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR, Wnt/ β -catenin, TGF- β) is szabályozza az EMT-transzkripciós faktorokon (Zeb, Snail, Twist) keresztül (Pearlman és mtsai 2017). Előrehaladott

melanómában a BRAF vagy NRAS aktiválódása szabályozhatja az EMT folyamatát, a MEK/ERK/FRA-1 útvonalon keresztül ZEB-1 és TWIST-1 transzkripciós faktor aktiválással. (Tulchinsky és mtsai 2014, Paluncic és mtsai 2016). A FRA-1 transzkripciós faktor a RAS jelpálya egyik effektora (Tulchinsky és mtsai 2014). A FRA-1 a ZEB-1 és TWIST-1 expresszióját növeli, míg a ZEB-2 és SNAIL-2 expresszióját csökkenti (Dhillon és mtsai 2015). Az EMT folyamatának fontos markere az E-cadherin expressziójának elvesztése és az N-cadherin expressziójának növekedése. A V600E BRAF mutáns melanóma sejtekben az E-cadherin expressziójának elvesztése figyelhető meg, amely összefüggésbe hozható a sejtek metasztatikus aktivitásának növekedésével (Boyd és mtsai 2013). Továbbá az N-cadherin szintjének növekedése mellett a vimentin intermedier filamentum expressziója is megnő, így segítve elő a sejtek invazív fenotípusának kialakulását (Paluncic és mtsai 2016). A mátrix metalloproteázok aktiválódása is elősegíti a sejtek invázióját: a BRAF mutáns melanómában a mutáns BRAF a MEK/ERK/TWIST-1 útvonalon keresztül aktiválja az MMP-1-et (Weiss és mtsai 2012). Az invazív fenotípus kialakulásának másik központi kapcsolója a MITF transzkripciós faktor. Az EMT folyamata során a MITF szintje fokozatosan csökken (Tulchinsky és mtsai 2014). A MITF alacsony expressziója invazív fenotípus, míg magas expressziója differenciációhoz és proliferatív fenotípus megjelenéséhez vezet (Hartman és mtsai 2015).

6. táblázat

Fehérje expressziós szint változások az EMT során melanómában (Tulchinsky és mtsai 2014, Pearlman és mtsai 2017).

FEHÉRJE	EXPRESSZIÓ CSÖKKENÉS (↓) NÖVEKEDÉS (↑)
ZEB-1	↑
ZEB-2	↓
SNAIL-1	↑
SNAI-2 (SLUG)	↓
TWIST-1	↑
TWIST-2	↓
MITF	↓
FRA-1	↑
E-CADHERIN	↓
N-CADHERIN	↑
VIMENTIN	↑
FIBRONEKTIN	↑
MÁTRIX METALLOPROTEÁZOK (MMP)	↑

1.5 A nem-V600 BRAF mutáns szolid tumorok célzott terápiája

Az elmúlt években a BRAF-ot célzó gyógyszerfejlesztések a V600E mutációra fókuszáltak, főként a melanómában gyakran előforduló V600E BRAF mutáns esetek miatt. Azonban az új generációs szekvenálási módszerek széles körben való elterjedésével és a 600-as kodonon kívül eső szekvenciák (főként az 11. és 15. exonban elhelyezkedők) vizsgálatával, a nem-V600E esetek száma növekedést mutat (Richtig és mtsai 2017).

Mivel a nem-V600 BRAF mutáns tumorokban is aktivált állapotba kerül a RAF/MEK/ERK jelpálya (lásd: 1.1.1 fejezet), a BRAF és/vagy MEK gátlók használata ebben a molekuláris altípusban is felmerülhet. Nem-V600 BRAF mutáns áttétes

melanómás betegekben a V600E BRAF specifikus gátlószerrek (vemurafenib, dabrafenib) nem értek el terápiás hatást, a daganatok progrediáltak (Kim és mtsai 2016). Ebben a daganattípusban egy esettanulmány bemutatta, hogy egy L597S BRAF mutáns beteg részleges választ adott MEK-gátló kezelésre (Dahlman és mtsai 2012). Nem-V600 BRAF mutáns tüdőrák esetén a vemurafenib terápiára 6-ból 1 beteg adott részleges választ (Gautschi és mtsai 2015) és néhány esettanulmány létezik, ahol a pan-RAF gátló sorafenib hatására betegek részleges terápiás választ mutattak (Gautschi és mtsai 2015, Sereno és mtsai 2015, Casadei Gardini és mtsai 2016). Valamint egy preklinikai tanulmányban kimutatták, hogy a dabrafenib és trametinib kombinált terápia gátolhatja a növekedést és apoptózist indukálhat nem-V600 BRAF mutáns tüdőrák sejtvonalakon (Noeparast és mtsai 2017).

A nem-V600 BRAF mutáció prognosztikus értéke eltérő a különböző daganatokban. A nem-V600 BRAF mutáció jelenléte melanómában és kolorektális daganatban jobb teljes túlélést mutat, mint az ilyen mutációt nem hordozó daganatok (Kim és mtsai 2016, Jones és mtsai 2017). Melanómában IV. stádiumú betegeknél a nem-V600 BRAF mutáns betegek teljes túlélése 17.9 hónap, míg a V600E BRAF mutánsoké 16.1 hónap volt (Kim és mtsai 2016). Kolorektális daganatos betegek esetében egy több mint 9000 IV. stádiumú beteget vizsgáló tanulmány kimutatta, hogy a nem-V600 BRAF mutáns betegek túlélése (60.7 hónap) szignifikánsan magasabb volt, mint a V600E BRAF mutáns (11.4 hónap) és BRAF vad típusú (43 hónap) betegeké (Jones és mtsai 2017). Tüdőrákban a nem-V600 BRAF mutáció jelenléte azonban rosszabb teljes túlélési adatokat mutat mint a V600E BRAF mutáció (Litvak és mtsai 2014, Gautschi és mtsai 2015). Első vonalban kemoterápiát kapott BRAF mutáns tüdőrákos betegeknél a teljes túlélés a V600E BRAF mutáció esetén 25.3 hónapnak, míg nem-V600 BRAF mutáció esetén 11.8 hónapnak adódott (Gautschi és mtsai 2015).

Összességében azonban elmondható, hogy a nem-V600 BRAF mutáns betegek célzott terápiás kezelése jelenleg nem megoldott, így új terápiás megközelítésekre sürgető szükség van.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során a BRAF mutáns szolid tumorok célzott terápia érzékenységét meghatározó molekuláris faktorokat vizsgáltuk. A következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg.

1. V600E BRAF mutáns és PTEN-t expresszáló és V600E BRAF mutáns és PTEN fehérjét nem vagy csak kis mértékben expresszáló melanóma sejtvonalakon a biszfoszfonátok közé tartozó zoledronsav tumor ellenes hatásának összehasonlítása.

2. V600E BRAF mutációt hordozó melanóma sejtvonalakon a hosszú távú vemurafenib kezelés során fellépő fenotípusos és molekuláris változások feltérképezése:

- a sejtvonal párok proliferációs és migrációs képességének vizsgálata
- a fenotípusos változások háttérében álló molekuláris folyamatok vizsgálata különböző faktorok mRNS és fehérje expressziós szintjének meghatározásával
- a fellépő rezisztencia mechanizmusok alapján, a rezisztenciát okozó fehérjék elleni gátlószerek hatékonyságának tesztelése.

3. A nem-V600 BRAF mutációt hordozó szolid daganatok (melanóma, tüdő, emlő sejtvonalak) preklinikai modelljein a pan-RAF (sorafenib, AZ628) és a MEK (selumetinib) kombinációs gátlás tumor ellenes hatásának vizsgálata.

3. MÓDSZEREK

3.1. Sejtvonalak

A kísérletek során használt sejtvonalak szövettani eredete és elérhetősége a 7. táblázatban olvasható.

7. táblázat

A kísérletekben felhasznált sejtvonalak listája.

SEJTVONAL	TUMOR TÍPUSA	EREDET (Katalógus szám)
4.1 fejezet		
A375	melanóma	ATCC CRL-1619
A2058	melanóma	ATCC CRL-11147
LOX	melanóma	(Fodstad és mtsai 1988)
HT168-M1; M1	melanóma	(Ladanyi és mtsai 1990)
HT199	melanóma	(Ladanyi és mtsai 1995)
WM239	melanóma	WISTAR
WM35	melanóma	WISTAR
4.2 fejezet		
Mel KD	melanóma	(Lai és mtsai 2012)
Mel JL	melanóma	(Lai és mtsai 2012)
Mel JR	melanóma	(Lai és mtsai 2012)
MM90906	melanóma	Marco Donia
MM90911	melanóma	(Donia és mtsai 2017)
MM040111	melanóma	Marco Donia

4.3 fejezet		
A375	melanóma	ATCC CRL-1619
CRL5885	tüdő	ATCC NCI-H1666
CRL5922	tüdő	ATCC NCI-H2087
WM3629	melanóma	WISTAR
WM3670	melanóma	WISTAR
MDAMB231	emlő	ATCC HTB-26

A sejteket 5% CO₂ tartalom mellett 37 °C fokon tenyésztettük termosztátban. A sejteket 10% FBS-el (Life Technologies, Carlsbad, CA) és antibiotikumokkal (penicillin-sztreptomicin, amfotericin B) (Lonza, Basel, Switzerland) kiegészített 4,5%-os glükóz tartalmú DMEM médiumban (Lonza) tenyésztettük.

A hosszú távú vemurafenib kezelés hatásait vizsgáló kísérleteinket 3 pár vemurafenib kezelés előtti (pre) és közbeni – 4-6 héttel első kezelés után - (post) betegekből izolált sejtvonalakon (Mel KD, Mel JL, Mel JR), illetve 3 pár *in vitro* 14 hétig tartó, emelkedő koncentrációjú vemurafenib (0,001 µM-10 µM) kezelésnek alávetett sejtvonalakkal (MM90906, MM90911, MM040111) végeztük. A sejtvonalak eredetét és a betegek információt a 8. táblázat tartalmazza. A Mel KD, Mel JL, és Mel JR sejtvonal párokat Karianne Risberg és Oystein Fodstadt (Institute for Cancer Research Oslo University Hospital), az MM90906, MM90911 és MM040111 sejtvonal-párokat Marco Donia (University of Copenhagen Herlev Hospital) adományozta laborunknak további vizsgálatokra.

A nem-V600 BRAF mutáns sejtvonalak BRAF/RAS mutációs státuszát a 9. táblázatban ismertetem.

8. táblázat

A hosszú távú vemurafenib kezelés hatásait vizsgáló kísérleteinkben felhasznált sejtvonalakra vonatkozó klinikai adatok. A Mel sejtvonalak eredetének információ Lai, 2012 cikke alapján vannak megadva (Lai és mtsai 2012) (1. beteg=Mel KD, 3. beteg=Mel JR, 4. beteg= Mel JL). Az MM sejtvonalak eredetének információit Marco Donia bocsátotta rendelkezésünkre. Minden sejtvonalt V600E BRAF mutációt tartalmazott. (F – férfi, N- nő, DTIC – dekarbazin, IL-2 – interleukin-2, IFN-a –interferon alfa)

SEJTVONAL	NEM	KOR	KEZELÉS VEMURAFENIB KEZELÉS ELŐTT	VEMURAFENIB KEZELÉST KAPOTT A BETEG?	VÁLASZ VEMURA- FENIB KEZELÉSRE
Mel KD	F	35	DTIC	Igen, 11 hétig	Részleges válasz
Mel JL	N	53	Taxol	Igen, 15 hétig	Részleges válasz
Mel JR	N	54	DTIC	Igen, 15 hétig	Részleges válasz
MM90906	F	36	IL-2/IFN-a	Nem	-
MM90911	F	41	IL-2/IFN-a, anti- CTLA4 (ipilimumab), Dendritikus sejt vakcina (klinikai vizsgálat)	Nem	-
MM040111	N	78	Nem kapott	Nem	-

9. táblázat

A nem-V600 BRAF mutáns pan-RAF + MEK gátlásra adott válaszána vizsgálatához használt sejtvonalak BRAF/RAS mutációi.

SEJTVONAL	BRAF	BRAF KINÁZ AKTIVÁLTSÁGA	RAS (N/K)	REFERENCIA
A375 melanóma	V600E	magas	wt	(Hoeflich és mtsai 2009)
CRL5885 tüdő	G466V	alacsony	wt	(Guo és mtsai 2008)
WM3629 melanóma	D594G	alacsony	G12D (N)	(Lin és mtsai 2008)
WM3670 melanóma	G469E	alacsony	G12D (N)	(Lin és mtsai 2008)
MDAMB231 emlő	G464V	közepes	G13D (K)	(Holderfield és mtsai 2013)
CRL5922 tüdő	L597V	közepes	Q61K (N)	(Davies és mtsai 2002)

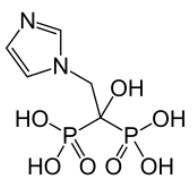
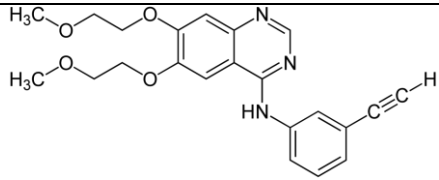
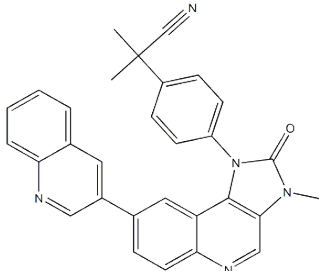
3.2 Gátlószer

A kísérletek során a következő gátlószereket használtuk fel: preniláció-gátló: zoledronsav (Selleck Chemicals, Houston, TX), V600E BRAF specifikus gátlószer: vemurafenib (Selleck Chemicals), MEK-gátló: selumetinib (Selleck Chemicals), pan-RAF-gátló: sorafenib (LC Laboratories, Woburn, MA) és AZ628 (Sigma-Aldrich), PI3K/mTOR kettős-gátló: BEZ235 (Selleck Chemicals), EGFR-gátló: erlotinib (Selleck Chemicals) (3. 4. és 10. táblázat). A zoledronsav kivételével, melyet fiziológiás sóoldatban oldottunk fel 4 mg/ml koncentrációban, a gátlószereket 100%-os DMSO-ban (Sigma-Aldrich,

Saint-Luis, Missouri, USA) oldottuk fel 10 mM-os vagy 100 μ M-os (BEZ235) törzskoncentrációban és felhasználásig -80 °C-on tároltunk.

10. táblázat

Kísérleteink során felhasznált inhibitorok szerkezete és célpontjai.

VEGYÜLET NEVE	SZERKEZET	CÉLPONT (IC50)
Zoledronsav		kis GTP-ázok preniláció-gátlása: 10-100 μ M
Erlotinib		EGFR: 2 nM
BEZ235		PI3K-p110 α / β / γ / δ : 4/5/7/75 nM mTOR:6 nM

3.3 Életképességi tesztek

3.3.1 SRB esszé

A sejtek fehérje mennyiségének meghatározásán alapuló SRB esszé segítségével analizáltuk a sejtek életképességét. A sejteket 96 lyukú edény középső 60 lyukába (5000 sejt/lyuk; 500 sejt/lyuk), vagy 24 lyukú sejtenyésző edénybe (1000 sejt/lyuk) tettük, majd egy éjszakán keresztül hagytuk letapadni. Rövidtávon 72 óráig vagy hosszútávon 6 illetve 10 napig kezeltük a sejteket az adott gátlószerekkel. A proliferációs képességet vizsgáló kísérletekben 1000 sejtet tettünk 96 lyukú sejtenyésző edénybe, majd a kiültetés utáni 1. 3. 5. és 7. napon lefixálva a sejteket megállapítottuk, hányszorosára nőtt

a sejtek száma az adott napon az 1. naphoz képest. A kezelés idő letelte után 10%-os triklórecetsavval (TCA) oldattal fixáltuk a sejteket, majd csapvizes mosás következett. A fixálás után 0,4%-os SRB oldattal festettük meg a fixált sejteket. A megkötött festéket 10 mM-os Tris pufferben (pH=8) oldottuk fel és fotometráltuk 570 nm-en (EL800, BioTec Instruments, Winooski, VT). A kísérleteket minimum háromszor, egymástól függetlenül elvégeztük. A módszert a 4.1.2, 4.2.1, 4.2.2, 4.2.6 fejezeteknél alkalmaztuk.

3.3.2 Klonogenitási esszé

A sejtek fehérje mennyiségének meghatározásán alapuló klonogenitási esszé segítségével jellemeztük a sejtek klónképző képességét. A sejteket 6 lyukú sejttenyésztő edénybe (1000 sejt/lyuk) helyeztük és egy éjszakán át hagytuk letapadni. A sejteket 10 napig kezeltük az adott gátlószerekkel. A kezelés idő letelte után 3:1 arányú metanol: ecetsav oldattal fixáltuk a sejteket, majd csapvizes mosás következett. A fixálás után 0,1 w/v%-os kristályibolya oldattal festettük meg a fixált sejteket. A megkötött festéket 2%-os SDS-ben oldottuk fel és fotometráltuk 570 nm-en (EL800, BioTec Instruments, Winooski, VT). A gátlószerek hatását a kontroll, tehát kezelést nem kapott csoport értékéhez normalizáltuk (relatív viabilitás, relatív klonogenitás). A kísérleteket legalább háromszor, egymástól függetlenül elvégeztük. A módszert a 4.1.2 és 4.2.7 fejezeteknél alkalmaztuk.

3.3.3 Kombinációs index (CI) számítása

Két inhibitor gátló hatása közti szinergia meglétét kombinációs index segítségével állapítottuk meg. A kombinációs indexet a Chou-Talalay módszerrel, a CompuSyn program (Ting Chao Chou and Nick Martin, Paramus, NJ, 2005) segítségével számoltuk ki (Chou 2010). Összesen 36 különböző inhibitor koncentrációnál állapítottuk meg a kombinációs indexet. Ha $CI < 1$, szinergista, ha $CI = 1$ additív, ha $CI > 1$ antagonistá hatás áll fent a két inhibitor között. A módszert a 4.2.6 és 4.3.1 fejezeteknél alkalmaztuk.

3.4 Videomikroszkópos mérések

A videomikroszkópos méréseket az alábbi cikk alapján végeztük el (Hegedűs és mtsai 2004) . Röviden a sejteket 24 lyukú sejtenyésztő edény középső 12 lyukába tettük és egy éjszakán át hagytuk letapadni. (Corning Incorporated, Corning, NY). Másnap a médiumot kicseréltük CO₂ independens médiumra (Life Technologies, Carlsbad, CA), amely 10 % FBS-el és 4 mM glutaminnal egészítettünk ki. A külső lyukakat PBS-el (Lonza) töltöttük fel a párolgásból adódó veszteség kiküszöbölésére. Ezután a sejteket inverz fázis-kontraszt mikroszkóppal kiegészített 37°C-os inkubátorba helyeztük (World Precision Instruments, Sarasota, FL). A mérés során 10 percenként készült felvétel 3 szomszédos látótérrel, a kezelés után minimum 72 óráig. A felvételekről látóterenként minimum 6 sejt mozgását követtük. A kísérleteket legalább háromszor, egymástól függetlenül elvégeztük. Az eredmények kiértékelést egyes sejtek követésével manuálisan végeztük el, majd megállapítottuk sejtek adott időegység alatti elmozdulását. A módszert a 4.2.3 és 4.3.4 fejezeteknél alkalmaztuk.

3.5 TUNEL esszé

Az apoptotikus sejtek detektálásához a sejteket 24 lyukú sejtenyésztő edénybe tettük és egy éjszakán át hagytuk letapadni. A kezelés után a sejteket fixáltuk 4%-os PFA-val és a gyártó protokollja szerint elvégeztük az apoptotikus sejtek jelölését (Kat.szám:11684795, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). A sejtmagokat DAPI festékkel jelöltük. A kiértékeléshez megszámloltuk a TUNEL pozitív sejtek arányát legalább három 20x nagyítású látótérben. A módszert a 4.1.3 és 4.3.5 fejezeteknél alkalmaztuk.

3.6 Immunblot

A vizsgált sejteket 6 lyukú sejtenyésztő edénybe tettük és egy éjszakán át hagytuk letapadni. A kezelés után a sejteket 6%-os TCA-val fixáltuk, majd módosított Laemmli pufferben (90 mM Tris-HCl, pH 7.9, 2% SDS, 10% glicerol, 5 mM EDTA, 125 mg/ml urea, 100 mM dithiothreitol, 0.02% brómfenol-kék) oldottuk fel a pelletet. A teljes fehérjekoncentrációt Qubit 3 (Thermo Scientific, Waltham, MA) készülékkel mértük meg. A fehérjéket elektroforézis módszerrel választottuk el méret szerint 10%-os SDS-

PAGE (BioRad, Hercules, CA) segítségével, majd a fehérjéket PVDF membránra (Thermo Scientific) transzferáltuk. Az immunblot analízis során a következő ellenanyagokat használtuk elsődleges antitestként 1:1000 hígításban egy éjszakán át 4 °C-on történő inkubációval: anti PARP/cleaved-PARP (Merck Millipore, Billerica, MA AM30, Cell Signaling, Danvers, MA #9541), anti p-Erk/Erk, p-Akt/Akt, p-S6/S6, p-CRAF/CRAF, PTEN, EGFR (CellSignaling; #9101, #9102, #4058, #9272 #2215, #2217, #9427, #9422, #9188, #4267). A foszforilált kinázok foszforiláltsági helyei: p-CRAF (Ser338), p-Erk (Thr202/Tyr204), p-S6 (Ser240/244), p-Akt (Ser473). Kontrollként anti β -tubulin vagy β -aktint (Cell Signaling #2128 és #4970) használtunk. Másodlagos antitestként HRP-jelölt anti-nyúl vagy anti-egér (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) - 1:10000 hígítás, 1 óra, szobahő - használtunk. A vizualizáció Pierce™ ECL Western Blotting Substrate kittel (Thermo Scientific) történt. A módszert a 4.1.3, 4.2.5 és 4.3.3 és 4.3.5 fejezeteknél alkalmaztuk.

3.7 Sejtciklus vizsgálatok

A sejtciklus vizsgálatokhoz a sejteket 6 lyukú sejttenyésztő edénybe tettük és egy éjszakán át hagytuk letapadni. A kezelést követően a sejteket tripszinizáltuk, majd DAPI-val festettük 5 percig 37°C-on. A stabilizáló puffer hozzáadása után a mintákat 8 lyukú NucleoCounter lemezekre tettük. NucleoCounter NC-3000™ (Chemometec, Allerød, Denmark) készülék segítségével elemeztük a fluoreszcens jelet. Az egyedi sejtekhez rendelhető DAPI fluoreszcens jel intenzitásából számítható ki az adott sejt DNS tartalma és így az adott sejtciklus fázisban lévő sejtek százalékos aránya. A módszert a 4.3.2 fejezetnél alkalmaztuk.

3.8 Kvantitatív PCR

A vizsgált sejteket 6 lyukú sejttenyésztő edénybe tettük és egy éjszakán át hagytuk letapadni. A sejttenyésztőből PBS oldattal történő mosás után saját készítésű TRIZOL reagenssel (0,9 M guanidin-tiocianát, 0,45 M ammónium-tiocianát, 0,12 M nátrium-acetát, 6% glicerol, 40 % fenol) izoláltunk RNS-t. 1 ml TRIZOL reagenst adtunk a sejtekhez lyukanként és inkubáltuk 5 percig. A lizátumot Eppendorf-csőbe helyeztük és

0,2 ml kloroformot adtunk hozzá, majd centrifugáltuk (12000 g, 15 perc). A felső fázist egy új Eppendorf csőbe helyeztük át, majd 0,5 ml izopropanolt adtunk hozzá és 30 percig -20 °C-on inkubáltuk. Centrifugálás (13000g, 10 perc) után a felülúszót elöntöttük és 1 ml 75%-os etanolt adunk hozzá. Centrifugálás (13000g, 5 perc) után a felülúszót elöntöttük és az RNS pelletet kiszárítottuk, majd 10 µl RN-áz mentes vízben oldottuk fel és -80 °C-on tároltuk a mintákat. Az izolált RNS mennyiségét és minőségét a Nanodrop ND-1000 spektrofotométerrel ellenőriztük és a megfelelő mennyiségű és tisztaságú RNS-t használtuk a PCR reakciók során. Revert Aid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) használtunk a reverz transzkripcióhoz, a használati útmutatónak megfelelően. A primerek tervezését a Clone Manager szoftverrel (Sci-Ed Software, Cary, NC, USA) végeztük el. A legtöbb vizsgálathoz a PCR reakciókat 12 µl térfogatban, Maxima SYBR/ROX mastermixet (Thermo Scientific) használva 50 ng kiindulási cDNS-ből, 0,5 µM-os primer koncentráció mellett végeztük. A mérések során ABI Prism 7000 SDS Thermocycler (Applied Biosystems) készüléket használtunk. TaqMan valós idejű PCR segítségével mértük az EGFR gén expresszióját. A primer szekvenciákat a 11. táblázat foglalja össze. Minden mintát minden génre kétszeres ismétlésben mértünk. GAPDH és β-aktin háztartási gének expresszióját használtuk kontrollként és a relatív expressziót a delta CT módszerrel számítottuk ki. Az mRNS expresszió változást a kezelés utáni sejtekben a deltadelta CT módszerrel határoztuk meg (fold change, FC). Az mRNS expresszió növekedését vagy csökkenését hőtésképen ábráztuk MatLab szoftver (Natick, MA) segítségével. A módszert a 4.1.4 fejezetnél alkalmaztuk.

11. táblázat A qPCR során használt primerek szekvenciái

PRIMER NEVE	SZEKVENCIA
SNAIL FOR	TAT GCT GCC TTC CCA GGC TTG
SNAIL REV	ATG TGC ATC TTG AGG GCA CCC
ZEB-1 FOR	CCA GTG GTC ATG ATG AAA ATG GAA CAC C
ZEB-1 REV	CAG ACT GCG TCA CAT GTC TTT GAT CTC
VIMENTIN FOR	GGC TCA GAT TCA GGA ACA GC

VIMENTIN REV	CTG AAT CTC ATC CTG CAG GC
N-CADHERIN FOR	GCA TCA TCA TCC TGC TTA TCC
N-CADHERIN REV	TTC TCC TCC ACC TTC TTC ATC
E-CADHERIN FOR	CAG AGC CTC TGG ATA GAG AAC GCA
E-CADHERIN REV	GGC ATT GTA GGT GTT CAC ATC ATC GTC
MMP1 FOR	TAC ATG CGC ACA AAT CCC
MMP1 REV	ACA GCC CAG TAC TTA TTC CC
MMP3 FOR	TGG GCC AGG GAT TAA TGG AG
MMP3 REV	GGG AGT GGC CAA TTT CAT GAG
FRA-1 FOR	ACA CCC TCC CTA ACT CCT TTC
FRA-1 REV	TGC TGC TAC TCT TGC GAT G
MITF FOR	AGA CAT GCG CTG GAA CAA GG
MITF REV	GAG CAA CAA ATG CCG GTT GG
EGFR TAQMAN	HS01076078_M1
PDL-1 FOR	GCC GAA GTC ATC TGG ACA A
PDL-1 REV	TTG GTG GTG GTG GTC TTA C
PDL-2 FOR	CAA TGT GAC CCT GGA ATG
PDL-2 REV	GGC TGT TAT TGC TCC AAG
PD-1 FOR	AGC CTG GTG CTG CTA GTC TG
PD-1 REV	TGC GCC TGG CTC CTA TTG TC
B7-1 FOR	CCT GGG CCA TTA CCT TAA TC
B7-1 REV	AGT AGG TCA GGC AGC ATA TC
GAPDH FOR	CTGGCGTCTTCACCACCAT
GAPDH REV	GCCTGCTTCACCACCTTCT
AKTIN FOR	CGG CCA GGT CAT CAC CAT TG
AKTIN REV	CTC CAT GCC CAG GAA GGA AG

3.9 In vivo kísérletek

Az állatkísérleteket az Országos Onkológiai Intézet Kísérletes Farmakológia Osztályán végeztük, az Országos Onkológiai Intézet Állatkísérleti Bizottságának követelményei szerint (engedély szám: PEI/001/2574-6/2015). MDAMB231 sejteket (2×10^6 50 μ l szérum mentes DMEM-ben) oltottunk 10 hetes nőstény NSG egerek emlőjébe (10 egér/csoport). Az oltás után számított második héten az egereket 25 mg/tkg sorafenibbel és/vagy 10 mg/tkg selumetinibbel kezeltük naponta, intraperitoneálisan 18 napig. A kontrol csoport ezeknek megfelelő mennyiségű DMSO-t kapott. A tumorokat kaliperrel hetente kétszer mértük meg és a tumor térfogatát a következő képlettel számoltuk ki (hosszúság x szélesség² x $(4\pi/3)$). A kapott értékeket relatív értékre (V) transzformáltuk a következő képlet segítségével: $V = V_t/V_0$, ahol a V_0 a kezelés 1. napján mért tumor térfogat, a V_t az adott napon mért tumor térfogat. A kezelés utáni 18. napon az állatokat elaltattuk, majd a tumorokat eltávolítottuk és a tömegüket lemértük. A módszert a 4.3.6 fejezetnél alkalmaztuk.

3.10 Statisztika

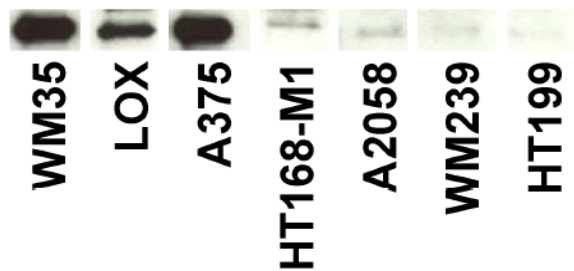
Több csoport közti statisztikailag szignifikáns különbségek megállapítására ANOVA-tesztet használtunk Tukey vagy Dunnett's post hoc teszttel. Két csoport esetén párosítatlan t-tesztet használtunk. A korreláció számításnál Spearman korrelációt alkalmaztunk. A statisztikai analíziseket a GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA) segítségével végeztük. Az ábrákon minden esetben az átlag és a standard hiba (SEM) értéke van feltüntetve. Az eredmények értékelésekor $p < 0,05$ változást tekintettünk statisztikailag szignifikáns különbségnek.

4. EREDMÉNYEK

4.1 A zoledronsav hatása a V600E BRAF mutáns melanóma sejtek életképességére és apoptózis indukciójára PTEN fehérje expressziós szintjének függvényében

4.1.1 A vizsgált melanóma sejtek PTEN státuszának meghatározása

A vizsgálat során felhasznált hét V600E BRAF mutáns melanóma sejt vonal PTEN expresszióját immunblot módszerrel elemeztük (4. ábra). A WM35, LOX és A375 vonalak PTEN fehérjét kifejezik, míg az M1, A2058, WM239 és HT199 vonalak a PTEN fehérjét nem vagy csak nagyon kis mértékben termelik.

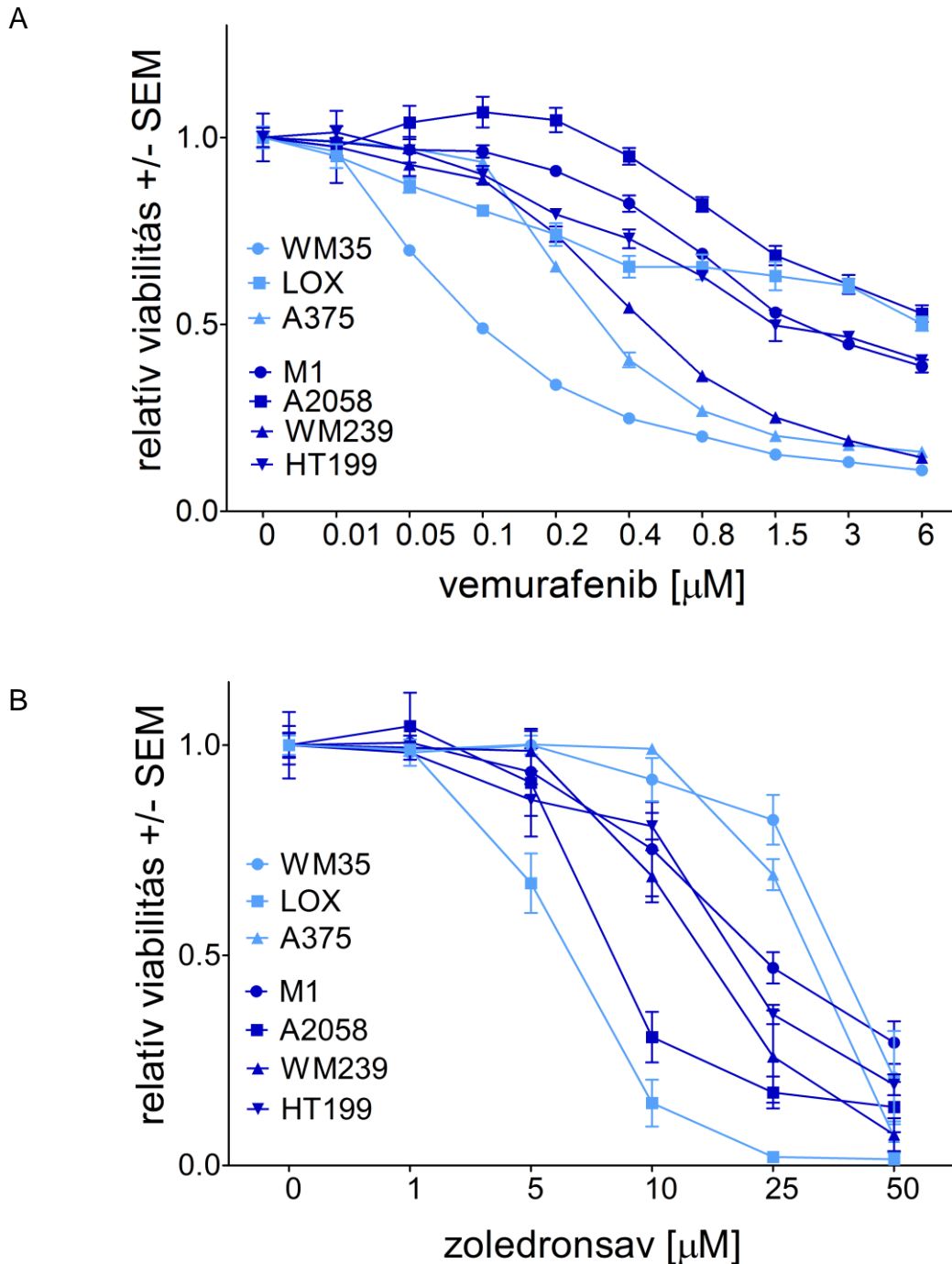


4. ábra A vizsgált melanóma sejtek PTEN státuszának meghatározása immunblot módszerrel.

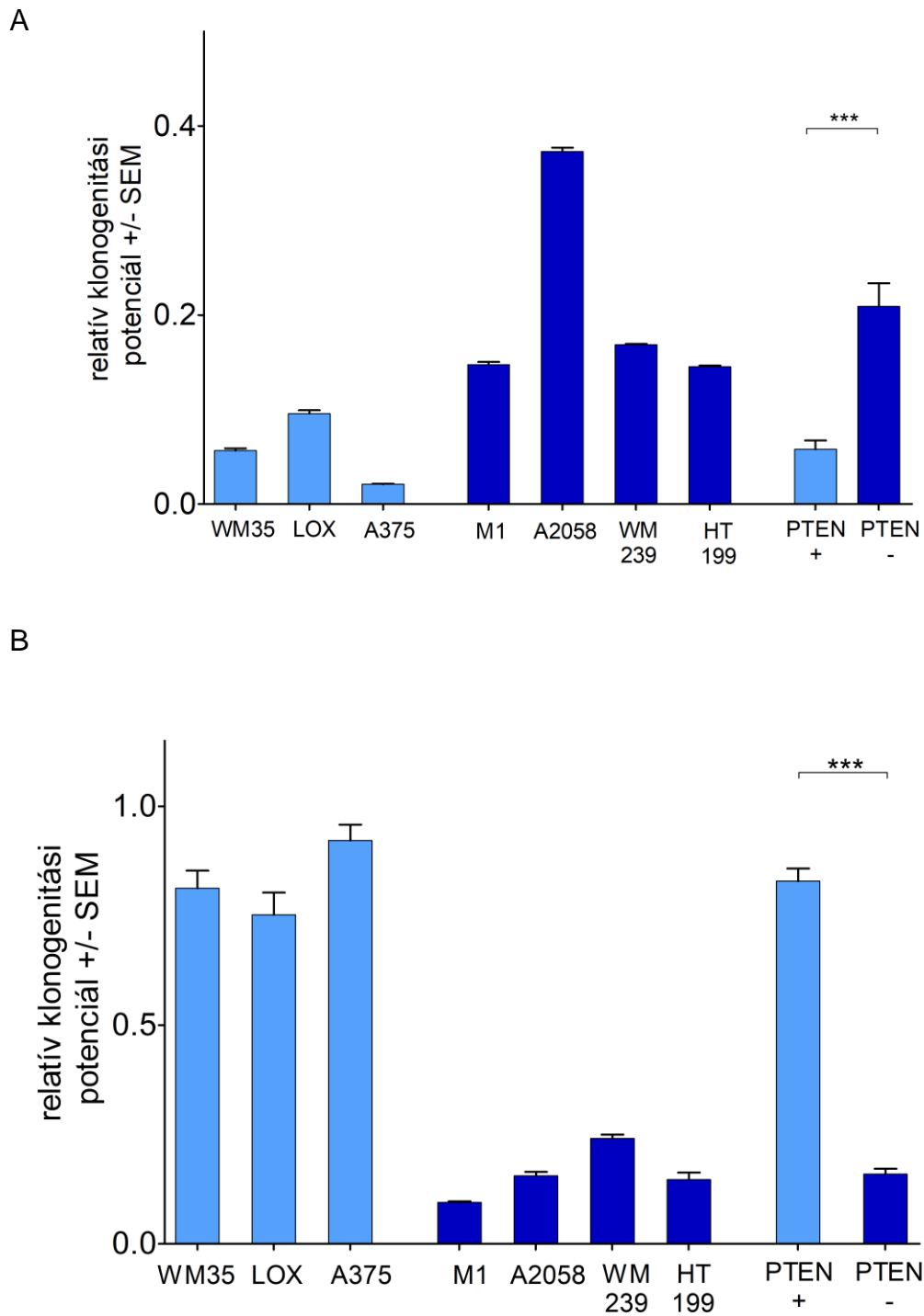
4.1.2 A vemurafenib és zoledronsav kezelés hatása az életképességre

Az életképességi teszteket mind rövid (72 óra), mind hosszú távon (10 nap) elvégeztük. A rövid távú életképességi tesztek eredményei azt mutatták, hogy a vemurafenib esetében a csak BRAF mutációt hordozó sejtek (világos kék), a zoledronsav kezeléskor pedig (a LOX sejt vonal kivételével) a BRAF mutáns és PTEN fehérjét csökkentve expresszáló sejtek (sötét kék) voltak érzékenyebbek (5. ábra). A hosszú távú életképességi tesztek eredményei is megerősítették a rövid távú tesztek eredményeit (6. ábra). A LOX, az egyik

csak BRAF mutáns sejtvonal, a rövid távú életképességi tesztben a zoledronsavra érzékenynek bizonyult (5/B. ábra), addig a hosszútávú életképességi esszében már rezisztensnek bizonyult a zoledronsav kezelésre (6/B. ábra).



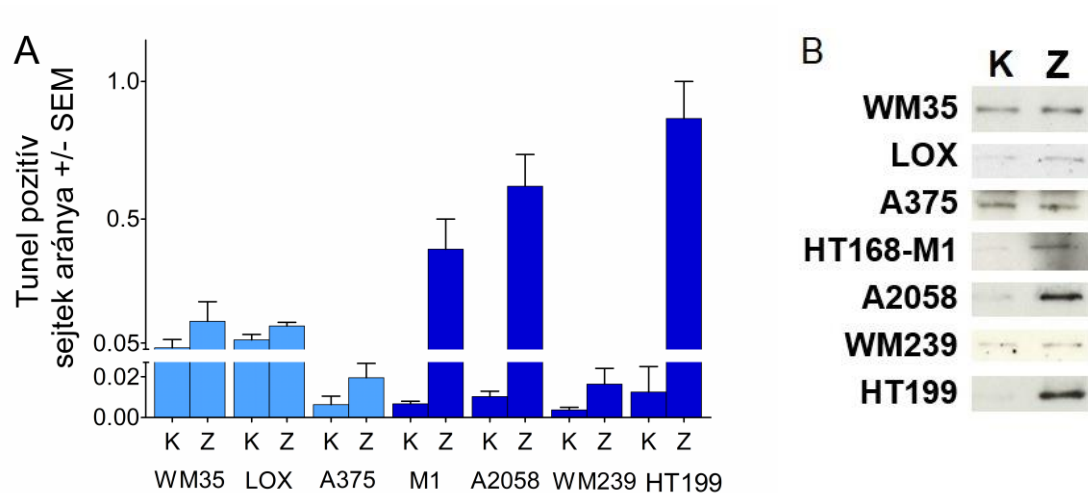
5. ábra A vizsgált 7 BRAF mutáns melanóma sejtvonal (A) vemurafenib és (B) zoledronsav érzékenységének meghatározása életképességi esszé segítségével. 72 órás kezelés.



6. ábra A vizsgált 7 BRAF mutáns melanóma sejtvonal (A) vemurafenib és (B) zoledronsav érzékenységének meghatározása életképességi esszé segítségével. A vemurafenib kezelés koncentráció 3 μM , a zoledronsav kezelési koncentráció 5 μM volt, 10 napos kezelés (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

4.1.3 A zoledronsav apoptózis indukáló hatásának vizsgálata

A sejteken apoptózis vizsgálatot is végeztünk TUNEL és hasított PARP immunblot esszé segítségével (7. ábra). A zoledronsav kezelésre a csak BRAF mutációt hordozó sejtekben nem jelent meg a hasított PARP és negatívak voltak a TUNEL festésre, míg a BRAF mutáns és PTEN fehérjét nem vagy kis mértékben expresszáló sejtekben a WM239 kivételével a hasított PARP megjelent és a sejtek nagy arányban TUNEL pozitív mutattak. Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a zoledronsav kezelés a BRAF mutáns és PTEN fehérjét nem vagy kis mértékben expresszáló sejtekben apoptózist indukálhat.



7. ábra A vizsgált hét BRAF mutáns melanóma sejtvonal apoptózis vizsgálata zoledronsav (Z) kezelés hatására. (A) TUNEL esszé és (B) hasított PARP esszé vizsgálat K=kontrol, Z= zoledronsav. 48 órás kezelés.

4.2 A hosszú távú vemurafenib kezelés hatásának feltérképezése V600E BRAF mutáns melanóma sejtvonal párokon

A vizsgálat során célunk volt a hosszú távú vemurafenib kezelés hatására bekövetkező molekuláris és fenotípusos változások feltérképezése hat V600E BRAF mutáns melanóma sejtvonal páron (8. táblázat). A kezelés előtti sejtvonal a „pre”, míg a kezelés utáni sejtvonal a „post” nevet kapta. Első lépésben megvizsgáltuk a sejtek vemurafenib IC50 értékét, valamint a kezelés proliferációra és migrációra gyakorolt hatását. Majd molekuláris szinten vizsgáltuk különböző EMT markerek, transzkripciós faktorok, immunfaktorok és növekedési faktor receptorok mRNS expressziós szintjének és néhány EGFR/MAPK és PI3K/mTOR/Akt jelátviteli útvonal tag aktivációjának változásait.

4.2.1 A sejtvonal párok vemurafenib IC50 értékének meghatározása

A sejtvonal párok vemurafenib IC50 értékét 72 órás SRB esszé segítségével határoztuk meg (12. táblázat). Az eredményekből látszik, hogy a hat sejtvonal párból kettőben (Mel JL és MM90906) már a kezelés előtt is magas volt a vemurafenib IC50 érték, ami nem nőtt tovább jelentősen a kezelés után, míg a többi négy sejtvonal párban jelentősen megnövekedett az IC50 érték a kezelés hatására.

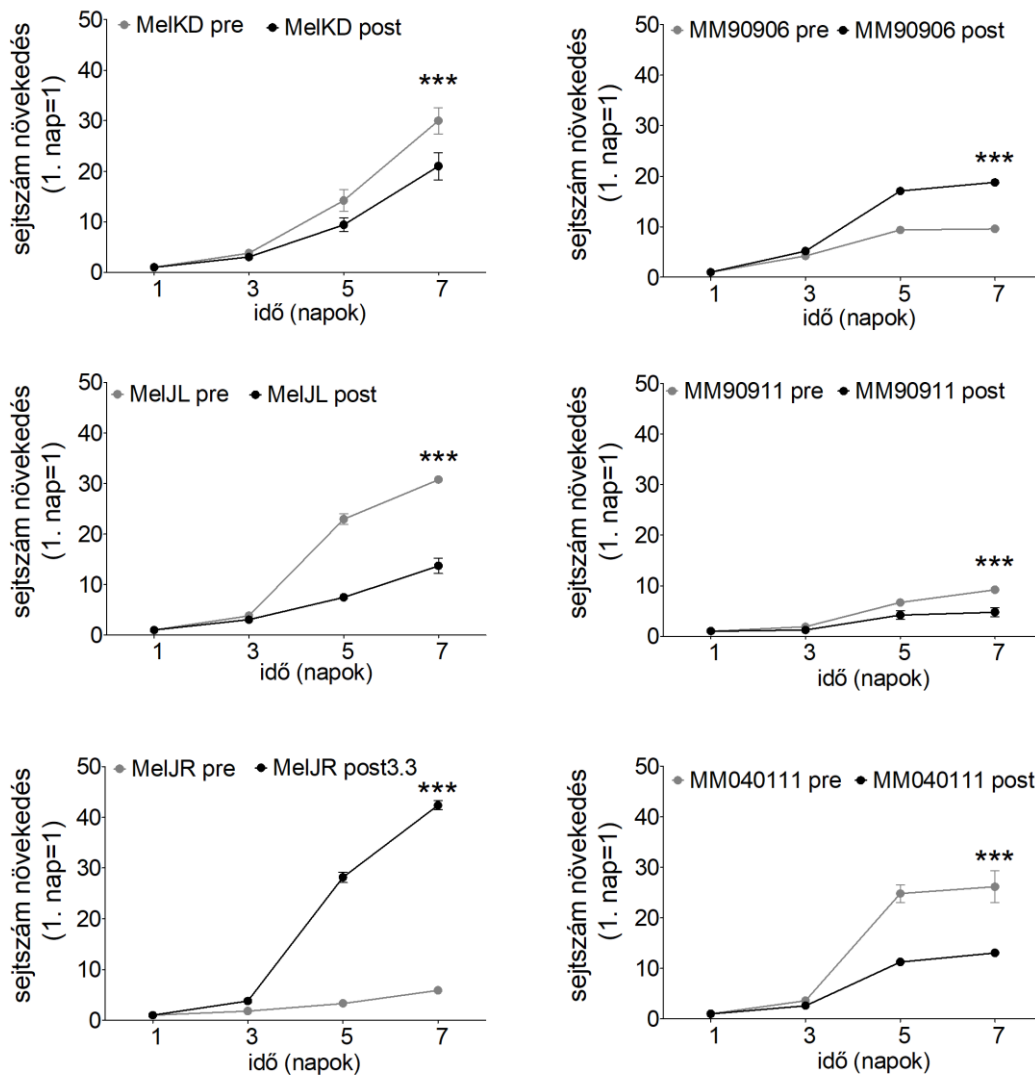
12. táblázat

A vizsgált BRAF mutáns melanóma sejtvonal párok vemurafenib kezelés előtti (pre) és utáni (post) vemurafenib érzékenysége. 72 órás kezelés.

SEJTVONAL	VEMURAFENIB KEZELÉS ELŐTTI (PRE) IC50 [μM]	VEMURAFENIB KEZELÉS UTÁNI (POST) IC50 [μM]
Mel KD	3,0	11,8
Mel JL	19,3	22,9
Mel JR	0,6	9,1
MM90906	8,4	12,5
MM90911	0,9	>>25
MM040111	0,4	1,5

4.2.2 A sejtvonal párok proliferációs képességének vizsgálata

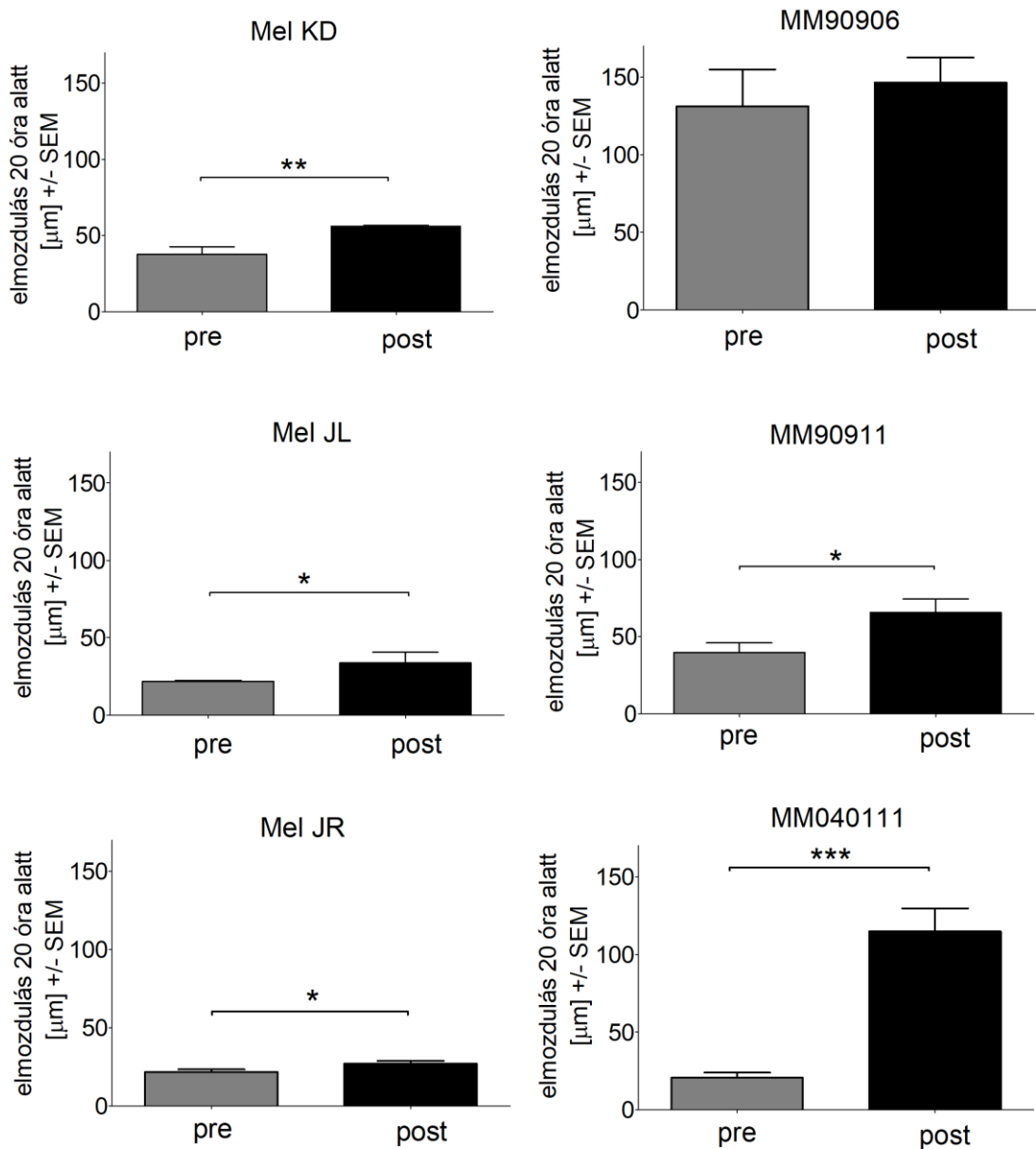
A sejtvonal párok proliferációs képességét a sejtek számának SRB esszé segítségével történő mérésével jellemeztük a kiültetést követő 1, 3, 5 és 7 napokon. Az eredmények a 8. ábrán láthatók. A hat sejtvonal párból négyben a kezelés után csökkent (Mel KD, Mel JL, MM90911, MM040111), míg két párnál (Mel JR, MM90906) nőtt a proliferáció.



8. ábra A vizsgált BRAF mutáns melanóma sejtvonal párok proliferációja (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

4.2.3 A sejtvonal párok migrációs képességének vizsgálata

A sejtvonal párok migrációs képességét videomikroszkópos módszerrel vizsgáltuk. A 20 óra alatt megtett elmozdulás értékeit a 9. ábra szemlélteti. Az MM90906 sejtvonal pár kivételével minden esetben szignifikánsan megnőtt a kezelés után a migrációs képesség.



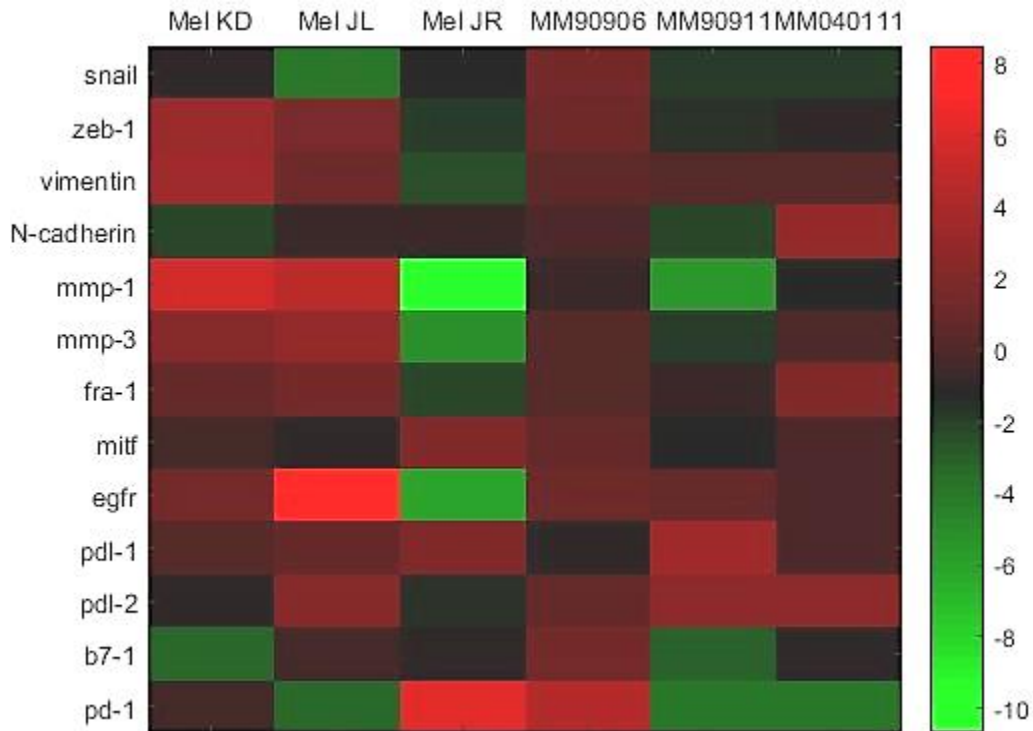
9. ábra A vizsgált BRAF mutáns melanóma sejtvonal párok migrációs aktivitása (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

4.2.4 A hosszú távú vemurafenib kezelés hatására bekövetkező molekuláris változások feltérképezése

Mivel a fenotípusos változások vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy szinte minden sejtvonal pár migrációs képessége nőtt a hosszú távú kezelés hatására, így ennek molekuláris hátterét szerettük volna következő lépésben felderíteni. Kvantitatív PCR

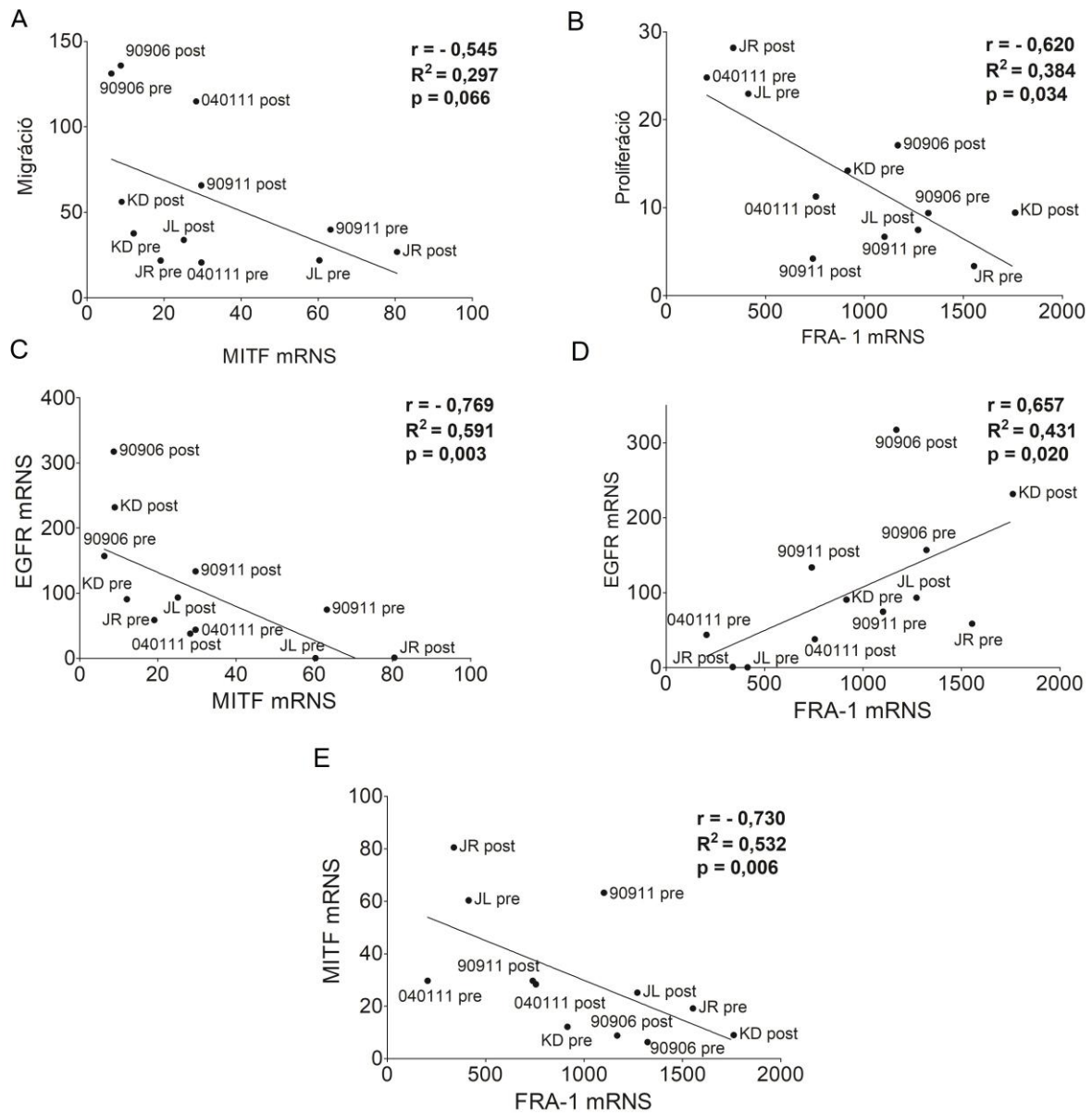
segítségével vizsgáltuk különböző klasszikus EMT markerek (SNAIL, ZEB-1, MMP-3, MMP-1, vimentin, N-cadherin, E-cadherin), egyes transzkripciós faktorok (MITF, FRA-1), az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) és az immun checkpoint fehérjék (PDL-1, PD-1, PDL-2, B7-1) mRNS szintjének változásait a sejtvonal párokban. Az eredményeket a 10. ábra szemlélteti.

Az egyes sejtvonal párok nem mutattak egységes mintázatot a vizsgált faktorok expressziós szint változásában. Mivel minden sejtvonal pár esetén nőtt a migrációs képesség a hosszú távú kezelés hatására, az E-cadherin kivételével a vizsgált EMT markerek esetében növekedést vártunk. E-cadherin mRNS expressziót nem találtunk egyik sejtben sem. A többi EMT marker esetében mind növekedés (MM90906, Mel KD, Mel JL), mind csökkenés (Mel JR, MM90911, MM040111) előfordult a kezelés hatására. Egyedül a vimentin mutatott egységesen emelkedést a sejtvonal párokban, a Mel JR sejtvonal kivételével. A migrációs képességet és az EMT folyamatát szabályozó transzkripciós faktorok közül a MITF szintjének csökkenését és a FRA-1 szintjének növekedését vártuk, azonban ezen faktorok esetében is heterogén képet kaptunk a sejtvonalak között. A növekedési faktorok közül az EGFR szintjét vizsgáltuk, a Mel JR sejtvonal kivételével mRNS szintjük növekedését tapasztaltuk. Az immun markerek közül a PDL-1 mRNS szintje növekedett, nem változott vagy csökkent, míg a PDL-2 mRNS szintjének csökkenése vagy növekedése volt megfigyelhető a sejtvonal párokban.



10. ábra. A kvantitatív PCR alapú kifejeződés változása a hosszútávú vemurafenib kezelés során. Az ábrán a kezelés utáni mRNS expresszió változás van ábrázolva. Színekód: piros - expresszió növekedés, zöld - expresszió csökkenés.

A következőkben a vizsgált faktorok mRNS expressziós szintjeit hasonlítottuk össze a migrációs és proliferációs képességgel (11. ábra). A migrációs képességgel a MITF transzkripciós faktor (majdnem szignifikáns), míg a proliferációs képességgel a FRA-1 transzkripciós faktor mutatott negatív korrelációt. Az EGFR mRNS expresszió a MITF mRNS expressziójával negatív, míg a FRA-1 mRNS expresszióval pozitív korrelációt mutatott. Továbbá negatív korrelációt találtunk a MITF és a FRA-1 mRNS expressziója között.

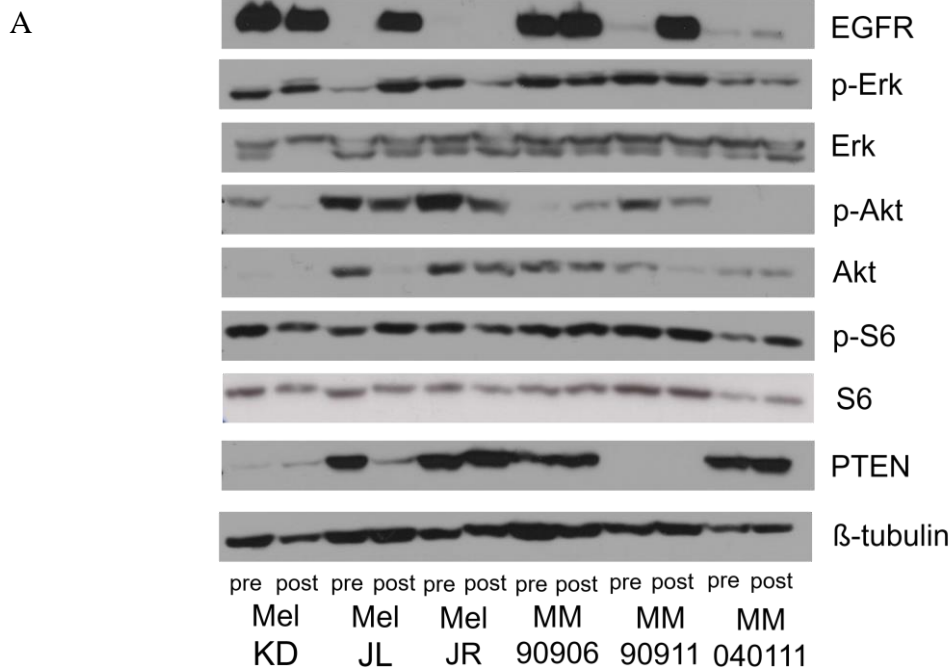


11. ábra. Korrelációk a (A) migráció és MITF mRNS (B) proliferáció és FRA-1 mRNS (C) EGFR és MITF mRNS (D) EGFR és FRA-1 mRNS (E) és MITF és FRA-1 mRNS között. A feltüntetett paraméterek a Spearman-korreláció számítás során kapott értékek.

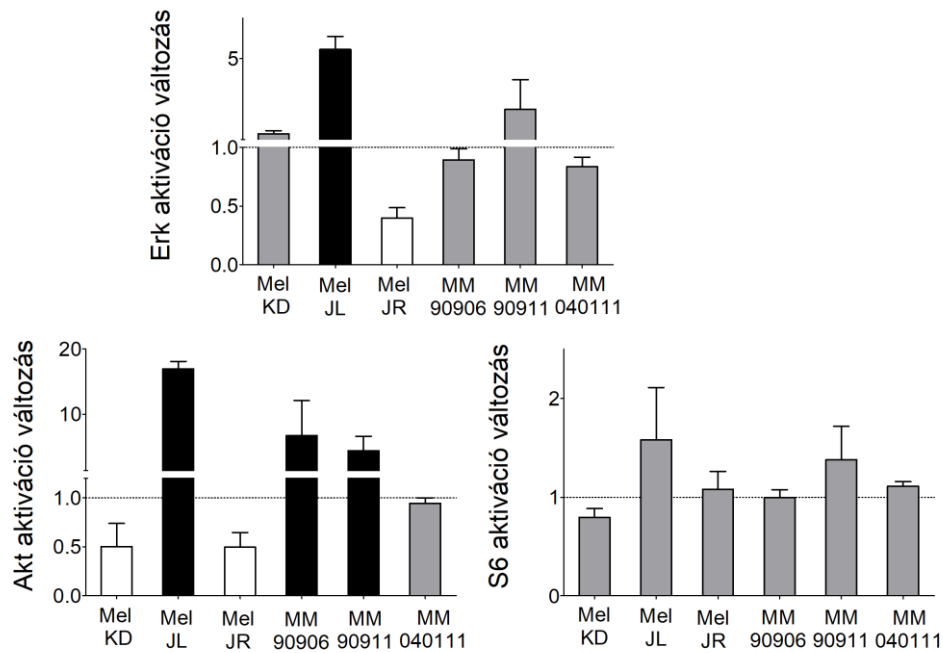
4.2.5 A jelátviteli útvonalak aktiválódása a sejtvonalpárokban

A MAPK útvonal aktivációját Erk, míg a PI3K/AKT útvonal aktivációját az Akt és S6 fehérjék aktivációjával jellemeztük. Ezen kívül – a korábbi vizsgálataink eredményeinek megfelelően - vizsgáltuk még a sejtek PTEN és EGFR expressziós státuszát is (12/A.

ábra). A legtöbb párban nem találtunk szignifikáns eltérést az Erk és S6 aktivációban. Kivételt a Mel JL és a Mel JR pár képezett, itt egyik esetben csökkent, míg a másik esetben növekedett az Erk aktivációja (12/B. ábra). Ezzel szemben az Akt aktiváció majdnem minden sejtben megváltozott, a Mel KD és Mel JR párokban jelentősen lecsökkent, míg a Mel JL, MM9096 és MM90911 párokban jelentősen növekedett (12/B. ábra).



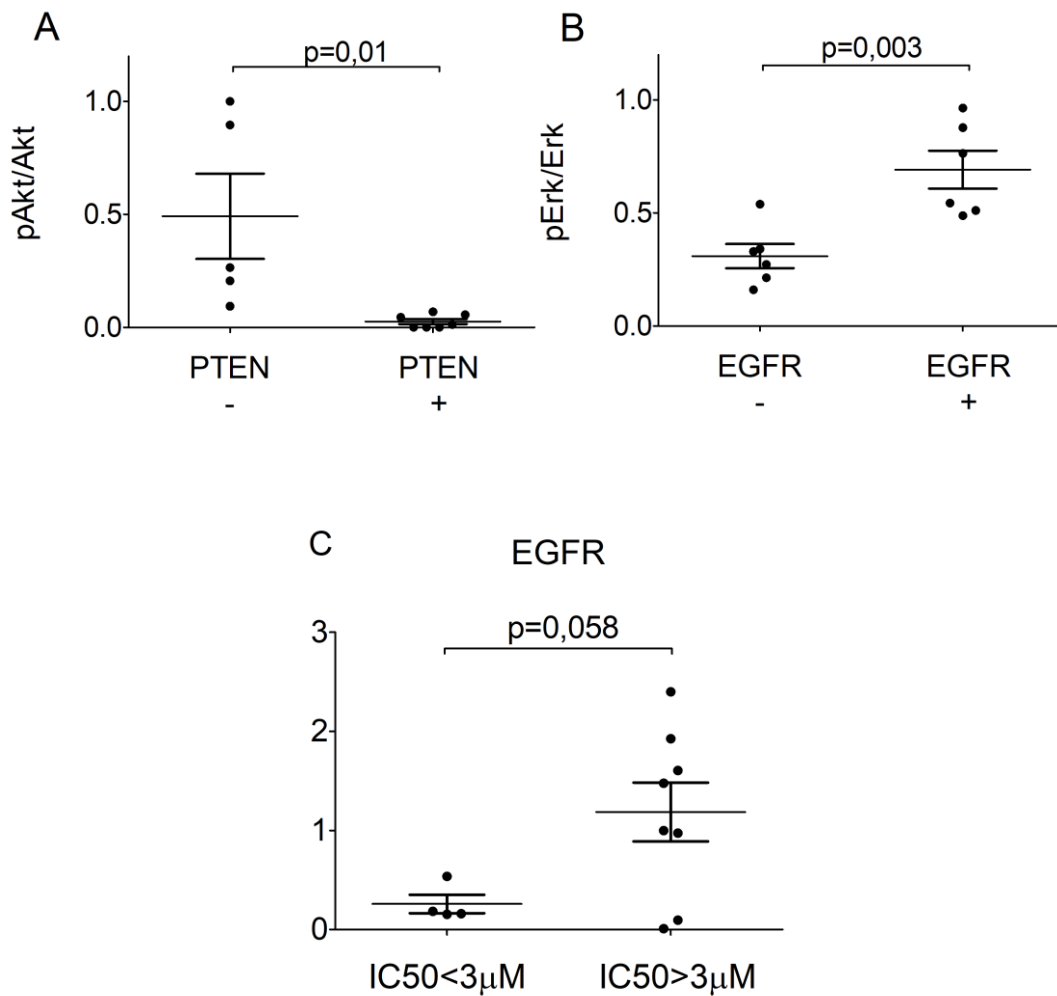
B



12. ábra. Immunblot eredmények. (A) Reprerzentatív immunblot a sejtvonal párok Erk, Akt, S6 totál és foszforilált valamint a PTEN fehérje expressziójáról. (B) A hosszú távú vemurafenib kezelésre bekövetkező Erk, Akt és S6 aktiváció változások. Szürke: nem változott, Fehér: szignifikáns csökkenés Fekete: szignifikáns növekedés.

Megvizsgáltuk az Akt aktiváció és a PTEN expresszió, valamint az Erk aktiváció és EGFR expresszió közti összefüggést is (13/A,B. ábra). A PTEN tumorszuppresszor funkciójának megfelelően azt találtuk, hogy a PTEN fehérjét csökkentve expresszázó sejtekben (Mel KD pre, Mel KD post, Mel JL post MM90911 pre és MM90911 post) az Akt aktiváció szignifikánsan nagyobb, mint a PTEN-t expresszázó sejtekben (Mel JL post, Mel JR pre, Mel JR post, MM90906pre, MM90906 post, MM040111 pre, MM040111 post) (13/A ábra). Továbbá az EGFR-t csökkent mértékben expresszázó sejtekben (Mel JL pre, Mel JR pre, Mel JR post, MM909011 pre, MM040111 pre, MM040111 post) az Erk aktiváció szignifikánsan kisebb, mint az EGFR-t nagy mértékben expresszázó sejtekben (Mel KD pre, Mel KD post, Mel JL post, MM90906 pre, MM90906 post, MM90911 pre) (13/B ábra).

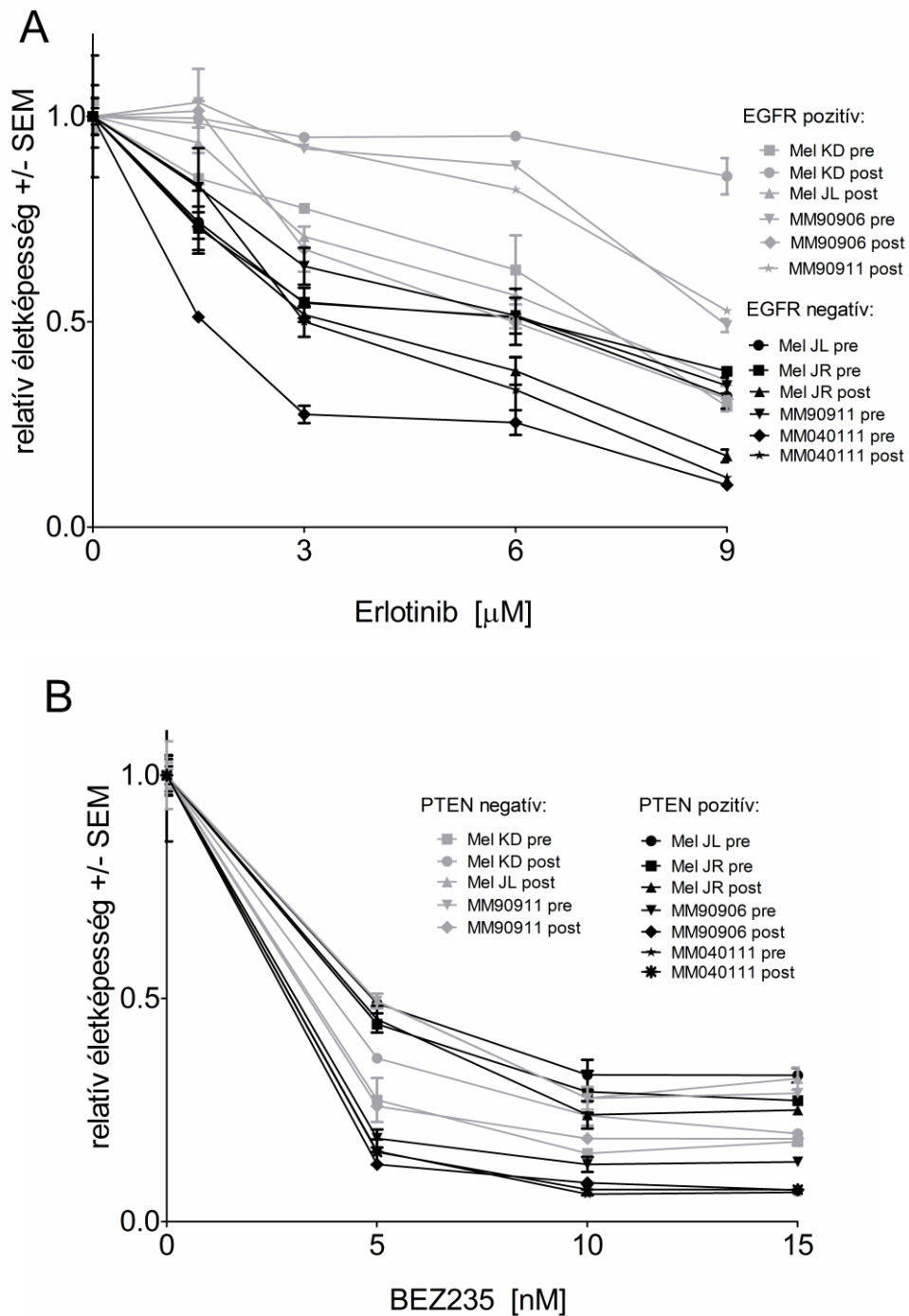
Az EGFR fehérje expresszióját a sejtek IC₅₀ értékének függvényében is megvizsgáltuk. A vemurafenibre szenzitív sejtek (IC₅₀<3 μM) alacsony, míg a rezisztens sejtek (IC₅₀>3 μM) többnyire magas szinten expresszázták az EGFR-t (13/C ábra).



13. ábra (A) A PTEN fehérje expresszió hatása az Akt aktivációra. (B) Az EGFR fehérje expresszió hatása az Erk aktivációra. (C) Az EGFR fehérje magasabb expressziója a vemurafenib rezisztens sejtekben jellemző.

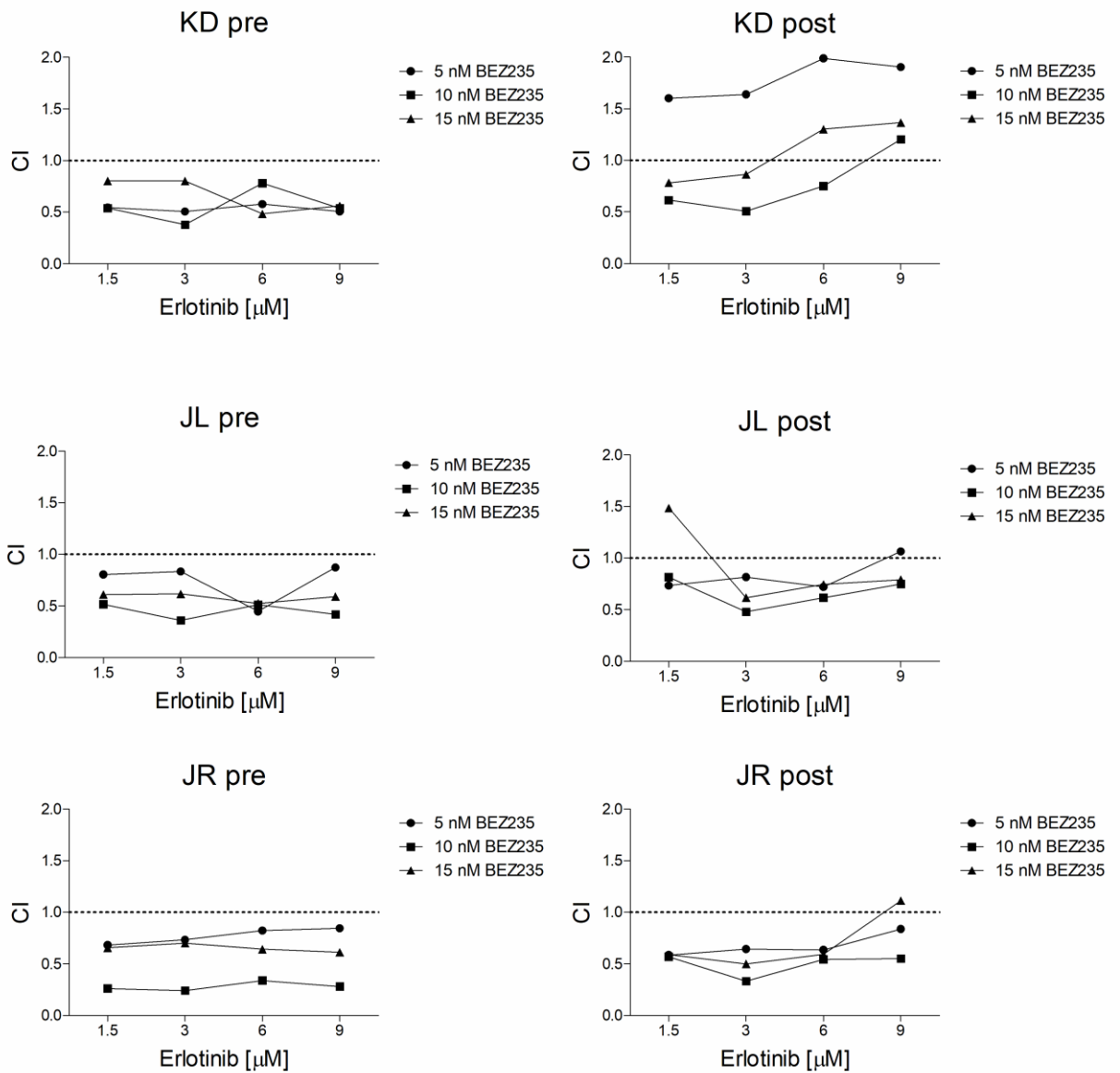
4.2.6 EGFR és PI3K/mTOR inhibitorok hatásának vizsgálata a sejtek életképességére

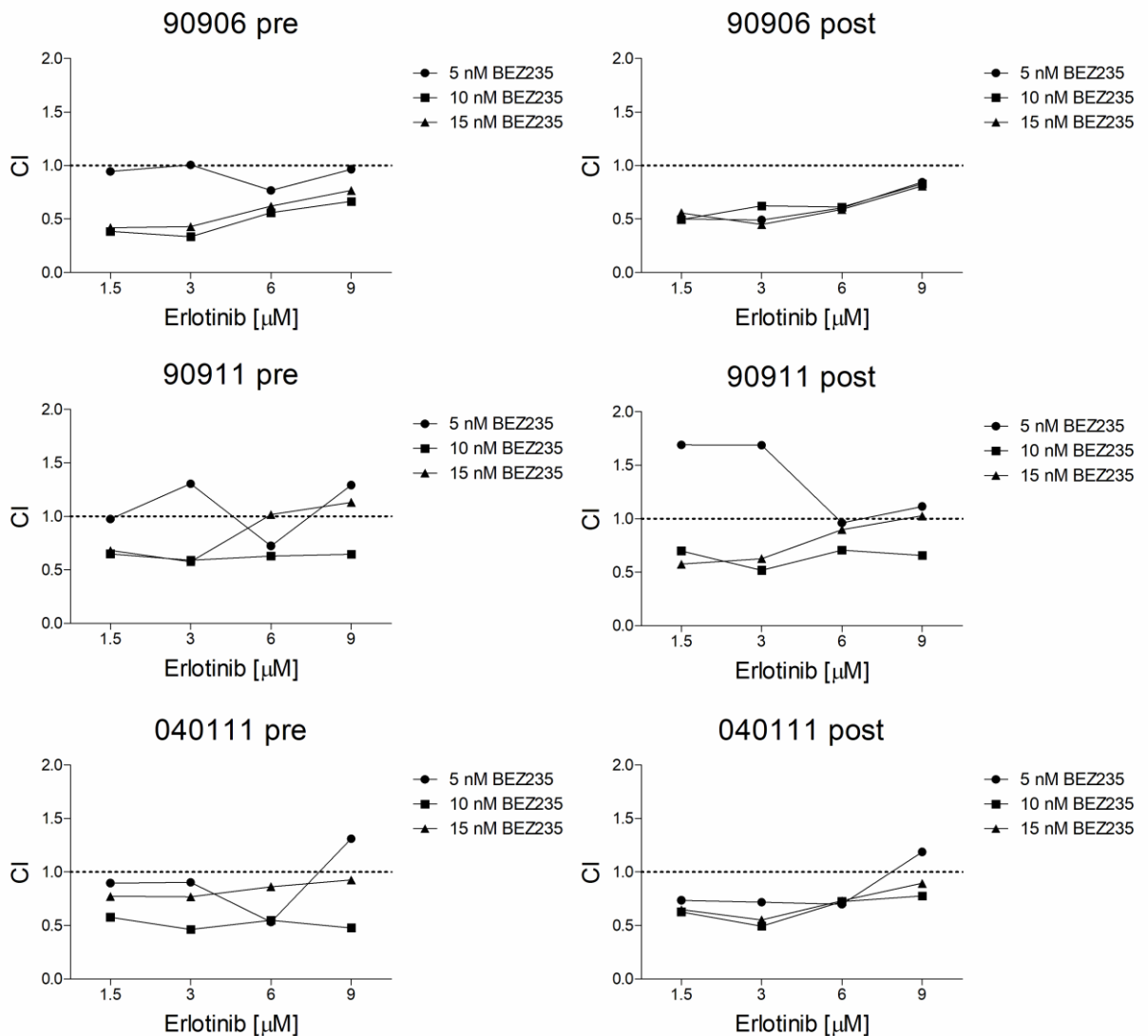
Mivel az EGFR expressziója az Erk aktivációval pozitív, a PTEN expresszió az Akt aktivációval negatív korrelációt mutatott, teszteltük az EGFR inhibitor erlotinib és PI3K/mTOR kettős inhibitor BEZ235 hatását a sejtvonal párokon. Azt az eredményt kaptuk, hogy az EGFR-t kis mértékben expresszáló vonalak (EGFR negatív) mutattak általánosságban nagyobb érzékenységet az erlotinibre, míg a PTEN expresszió nem mutatott jelentős összefüggést a BEZ235 érzékenységgel, mindegyik sejtvonal érzékenynek bizonyult a kezelésre (14/A,B ábra).



14. ábra. A sejtvonal párok (A) erlotinib (B) BEZ235 érzékenységének meghatározása életképességi esszé segítségével. 6 napos kezelés.

A BEZ235 és erlotinib kombinációs kezelés hatását is megvizsgáltuk a sejtvonalakon. Compusyn program segítségével számoltuk ki a kombinációs index (CI) értékeket. A CI értékek alapján elmondhatjuk, hogy a legtöbb kezelési koncentrációban szinergista vagy additív hatást mutatott a két szer kombinációs alkalmazása (15. ábra).

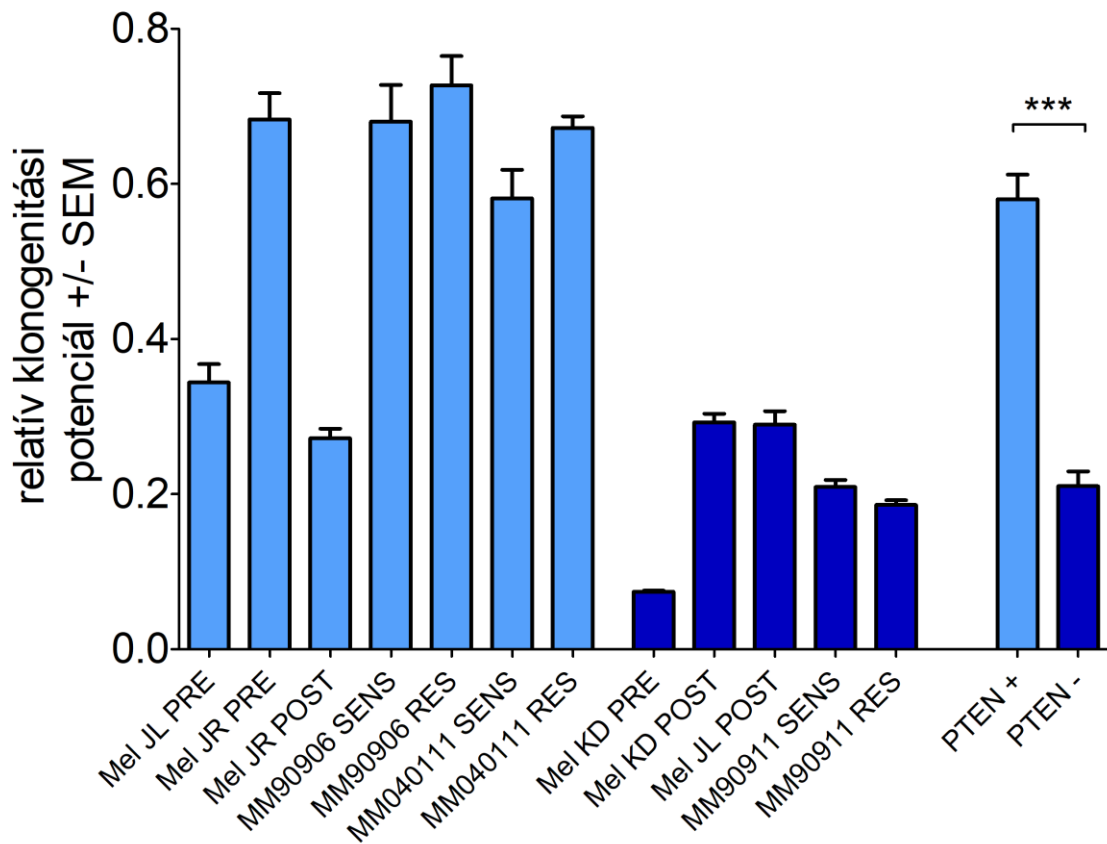




15. ábra. Kombinációs index (CI) értékek meghatározása erlotinib és BEZ235 kezelésre. A CI értékek jelenése: $CI > 1$ antagonista, $CI = 1$ additív és $CI < 1$ szinergista gátló hatás.

4.2.7 A sejtvonal párok zoledronsav érzékenységének vizsgálata PTEN expressziós státuszuk függvényében

A 4.1 fejezetben leírt megfigyelést, miszerint a BRAF mutáns és a PTEN fehérjét nem vagy kis mértékben expresszáló sejtek a zoledronsav kezelésre nagyobb érzékenységet mutatnak, a sejtvonal párokon is teszteltük. Ezen sejtvonalak esetében is igazoltuk, hogy PTEN-t nem vagy csak kis mértékben expresszáló sejtvonalak érzékenyebbek a zoledronsav kezelésre, mint a PTEN fehérjét expresszáló sejtek (16. ábra).



16. ábra A vizsgált melanóma sejtvonal párok zoledronsav érzékenységének meghatározása hosszú távú (10 nap) életképességi esszé segítségével. Világos kékkel a PTEN fehérjét expresszáló, sötét kék színnel a PTEN fehérjét nem vagy csak kis mértékben expresszáló sejtek vannak feltüntetve (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

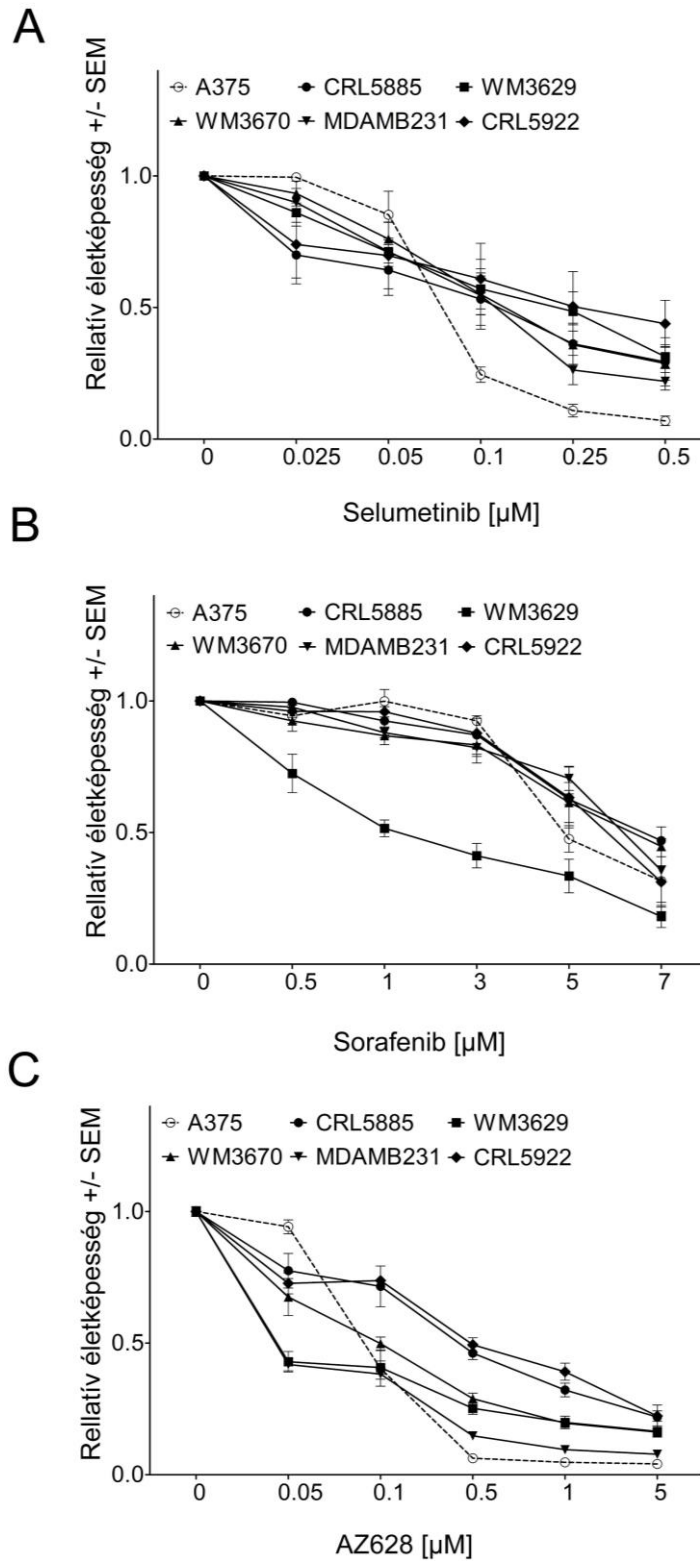
4.3 Nem-V600 BRAF mutációt hordozó szolid tumoros sejtvonalak pan-RAF és MEK kombinált gátlásra adott válasza

Vizsgálataink során öt nem-V600 BRAF mutáns és egy V600E BRAF mutáns sejtvonalon (9. táblázat) elemeztük a pan-RAF és MEK kombinált gátlásának hatását. Pan-RAF inhibitorként sorafenibet, MEK-inhibitorként selumetinibet használtunk. Mivel a sorafenib pan-RAF gátló hatása mellett más kinázokat is gátolhat (3. táblázat), ezért egy

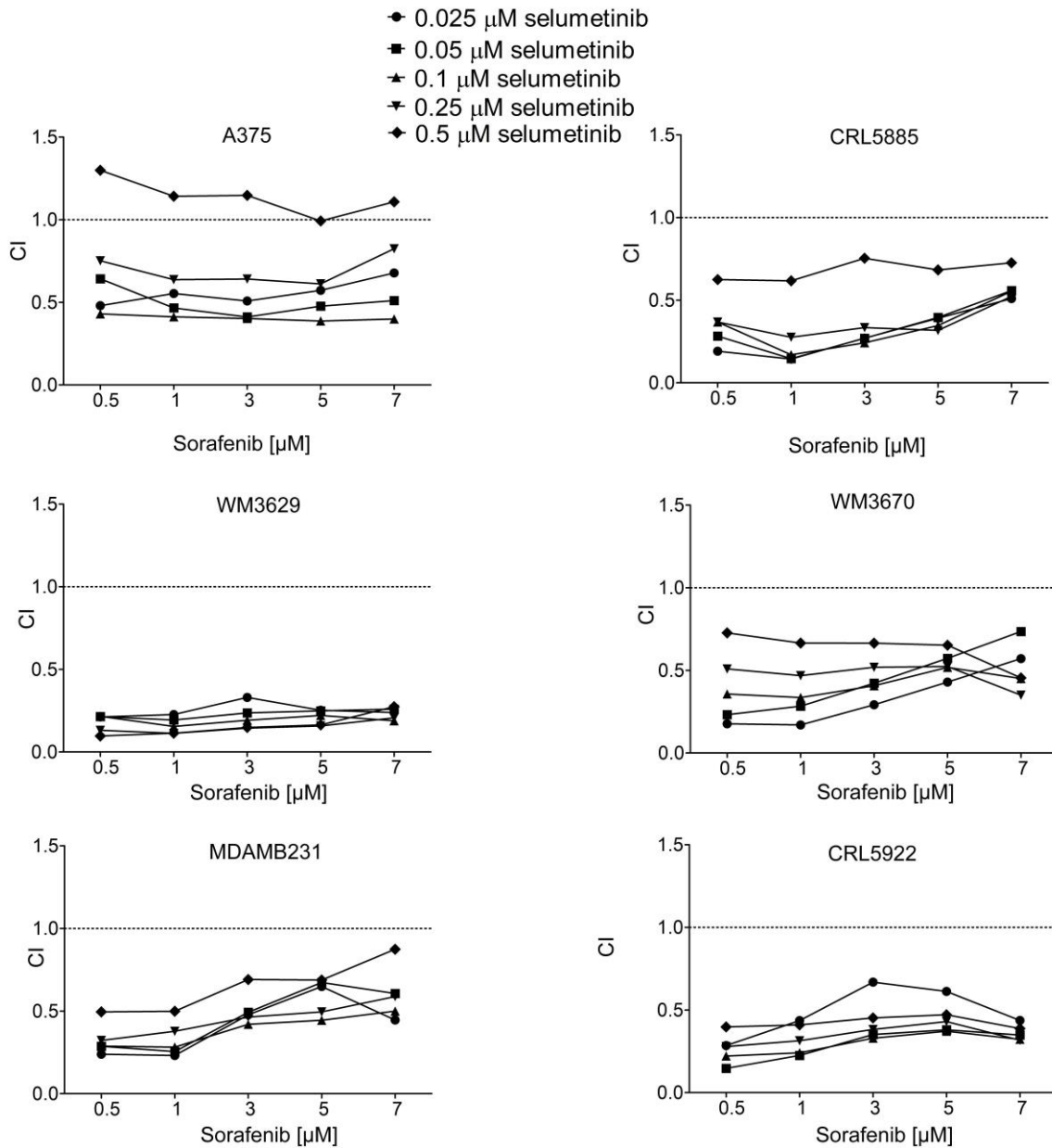
specifikus pan-RAF inhibitorral, az AZ628-al is elvégeztük az életképességi és apoptózis indukciót vizsgáló kísérleteket.

4.3.1 Életképességi vizsgálatok és a kombinációs index meghatározása a pan-RAF és MEK gátlószerekkel

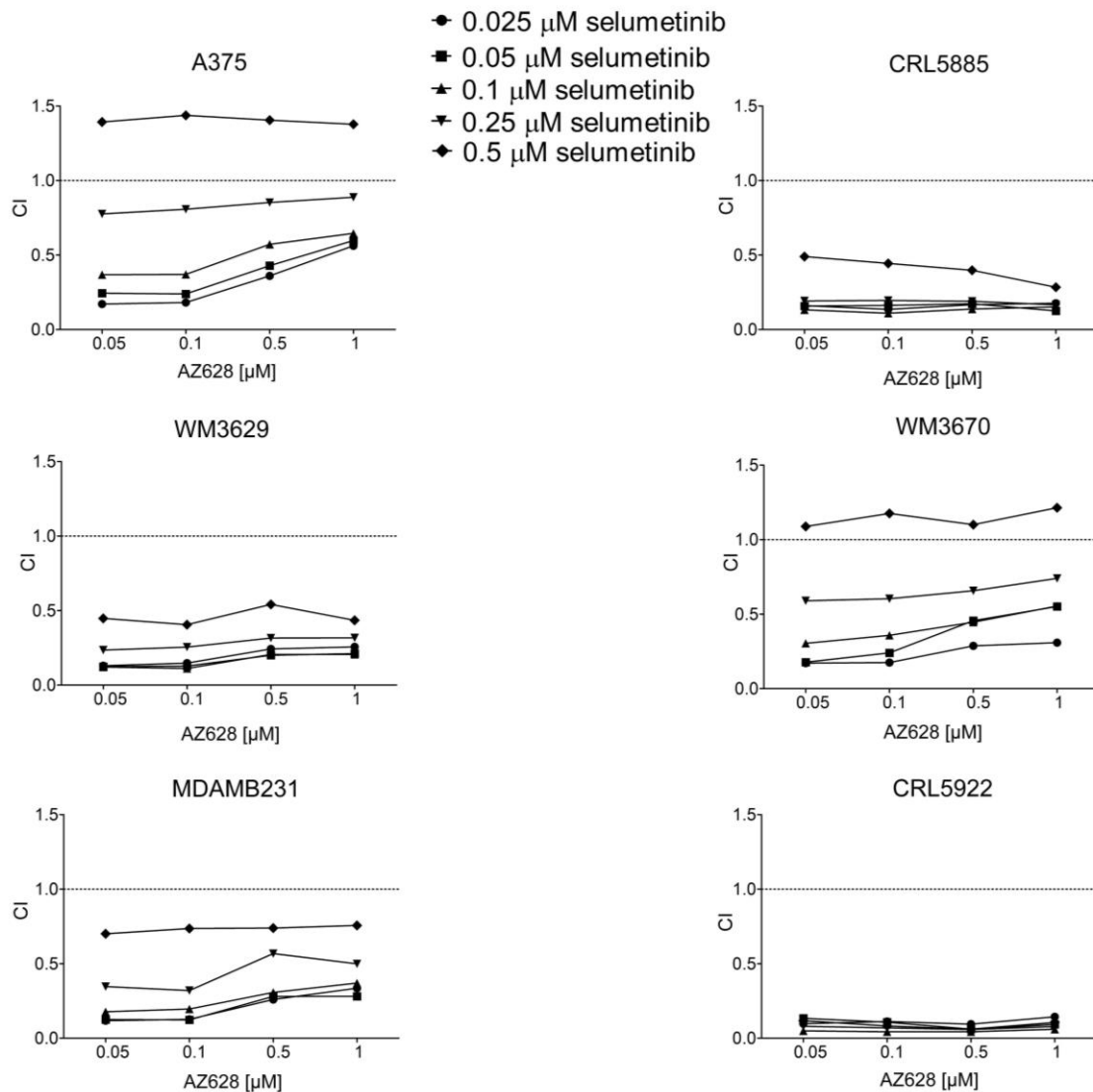
Az életképességet vizsgáló kísérletekben az egyes kezelésekre a selumetinib esetén az A375, a sorafenib esetén a WM3670, míg az AZ628 esetén a WM3670 és MDAMB231 sejtvonal bizonyult a legérzékenyebbnek (17. ábra). A szinergista gátló hatás vizsgálatához a sejteket selumetinib és sorafenib/AZ628 kombinációjával kezeltük, majd Compusyn program segítségével számoltuk ki a kombinációs index (CI) értékeket. Azt tapasztaltuk, hogy minden sejtvonal esetén kisebb CI értéket kaptunk, mint 1, tehát a pan-RAF és MEK-gátlószer között szinergista hatás áll fent a vizsgált nem-V600 BRAF mutáns sejtvonalak esetében (18. és 19. ábra).



17. ábra A vizsgált 6 BRAF mutáns sejtvonal (A) selumetinib (B) sorafenib és (C) AZ628 érzékenységének meghatározása SRB esszé segítségével.



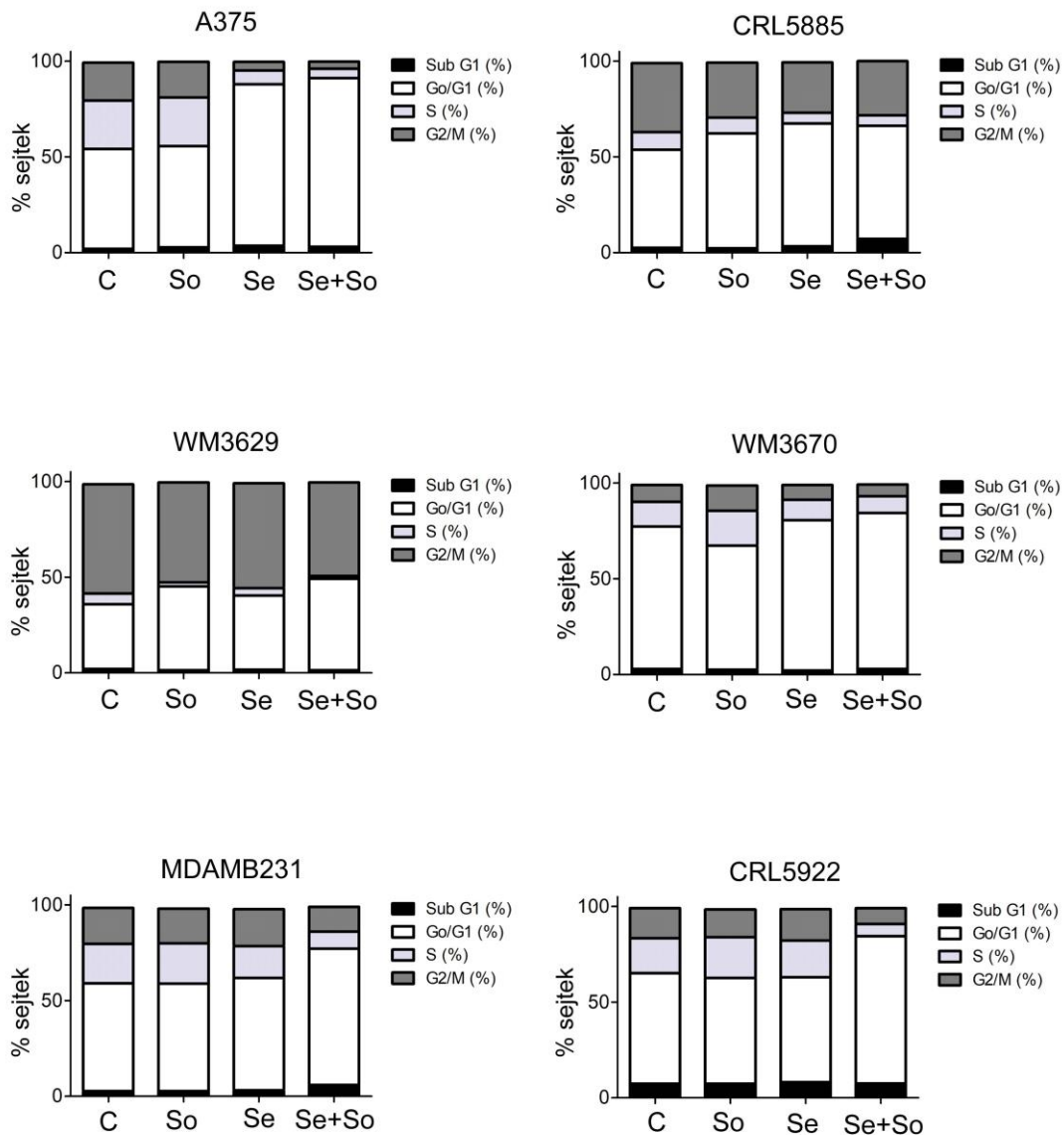
18. ábra Kombinációs index (CI) értékek a selumetinib és sorafenib kezelésre. A CI értékek jelenése: $CI > 1$ antagonista, $CI = 1$ additív és $CI < 1$ szinergista gátló hatás.



19. ábra Kombinációs index (CI) értékek a selumetinib és AZ628 kezelésre. A CI értékek jelenése: $CI > 1$ antagonista, $CI = 1$ additív és $CI < 1$ szinergista gátló hatás.

4.3.2. A kezelések hatása a sejtciklus eloszlásra

A sejtciklus analízis során kimutattuk, hogy a sejtek a G0/G1 fázisban rekednek meg a selumetinib és sorafenib kombinációs kezelés hatására. Továbbá a CRL5885 és MDAMB231 sejtekben a szubG1 fázisban lévő apoptotikus sejtek számának emelkedését is tapasztaltuk a kombinációs kezelés hatására (20. ábra).

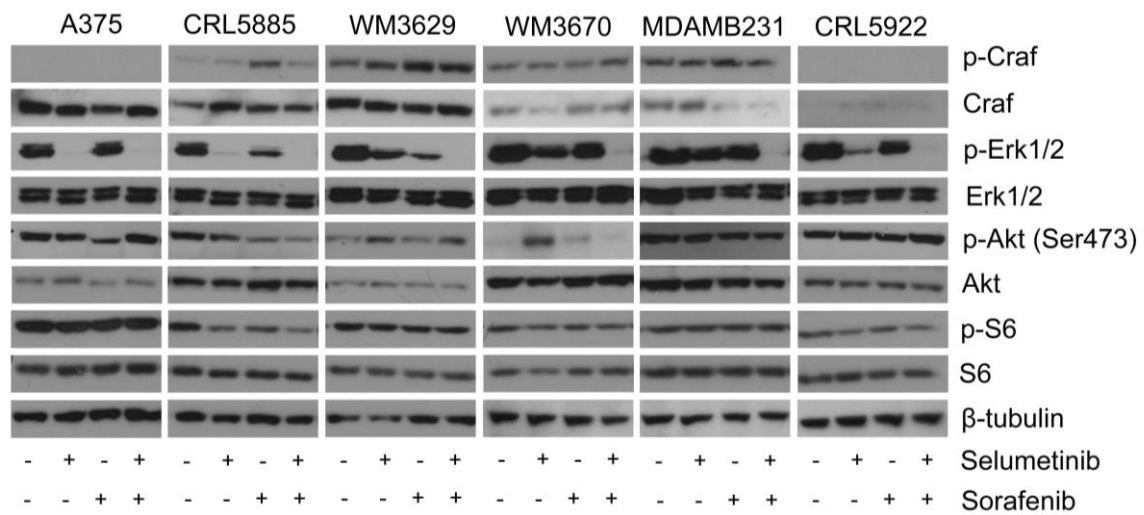


20. ábra A selumetinib (Se) és/vagy sorafenib (So) kezelés hatása a sejtciklus eloszlásra. 48 órás kezelés.

4.3.3 A kombinációs kezelés jelátvitelre gyakorolt hatásának vizsgálata

A selumetinib és sorafenib kombinációs gátlás hatását a CRAF, Erk1/2, Akt és S6 expressziójára és aktivációra immunblot esszével vizsgáltuk (21. ábra). Az Erk1/2 aktiváció mind selumetinib, mind sorafenib kezelésre csökkent. A kombinációs kezelés az egyes kezelésekhez képest tovább csökkentette a p-Erk1/2 szintet, kivéve az A375 sejtvonalban, ahol a selumetinib kezelés teljes Erk1/2 deaktíválást okozott. Eredményeink arra utalnak, hogy a kombinációs kezelés hatékonyabban tudja gátolni a

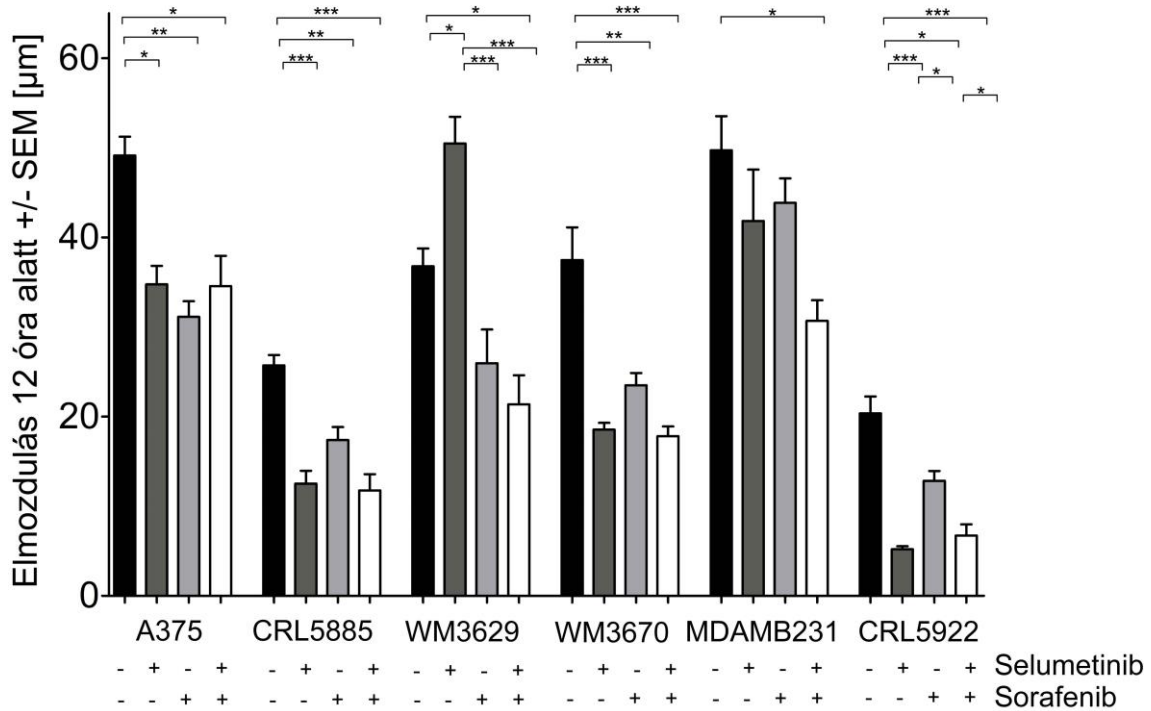
MAPK útvonalat a nem-V600 BRAF mutáns sejtekben. A selumetinib és sorafenib kombinált kezelés hatását az Akt/mTOR útvonal elemein is vizsgáltuk. A kombinált kezelés hatása nem volt egyforma a sejtvonalakon. A WM3629 és CRL5922 sejtvonalakban a p-Akt szint megemelkedett, míg a többi sejtvonalban csökkent vagy nem változott a kontrollhoz képest. Hasonló módon a p-S6 szint csökkent vagy nem változott a kontrollhoz képest kombinált kezelésre a sejtvonalakban. Érdekes módon a WM3629 és WM3670 melanóma vonalakban az egyes selumetinib kezelés az Akt aktivációjának emelkedését okozta. Továbbá az egyes vagy kombinált kezelések a nem-V600 BRAF mutáns sejtekben a CRAF expresszió emelkedést indukálhattak. A CRAF aktiváció a CRL5885, WM3629, WM3670 és MDAMB231 sejtekben emelkedett meg a kezelések hatására.



21. ábra A vizsgált BRAF mutáns sejtvonalakon a selumetinib és/vagy sorafenib kezelés jelátviteli fehérjékre (CRAF, Erk, Akt, S6: totál és foszforilált) gyakorolt hatásának meghatározása immunblot módszerrel. 4 órás kezelés.

4.3.4 A kombinációs kezelés hatása a sejtek migrációs képességére

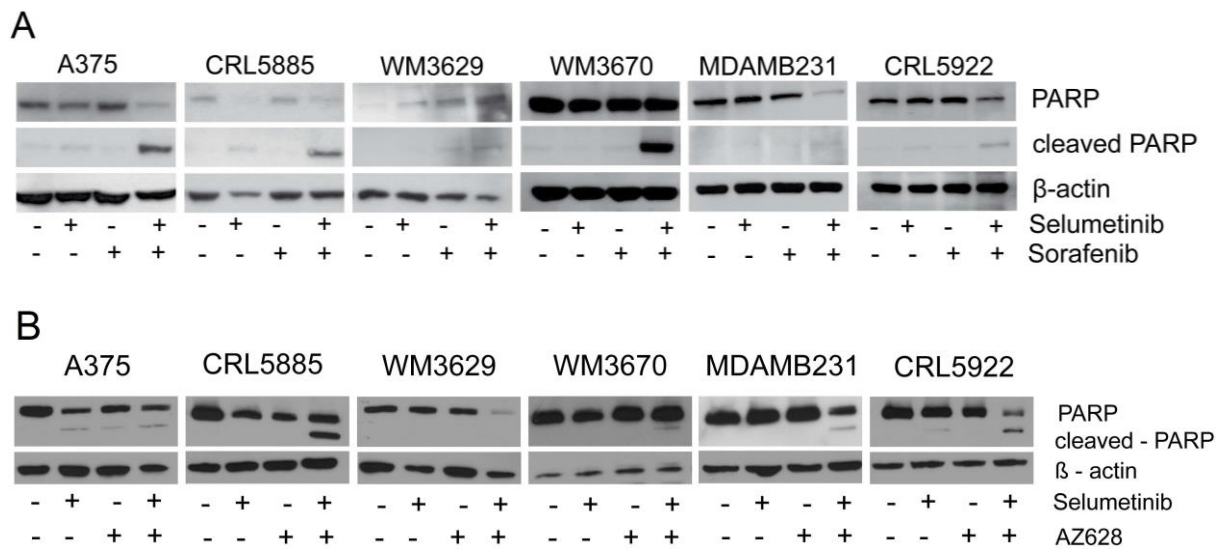
A selumetinib és sorafenib kombinációs kezelés hatását vizsgáltuk a sejtek migrációs képességére is (22. ábra). Az egyes selumetinib vagy sorafenib kezelések hatására a legtöbb sejtvonal esetében csökkent a migrációs képesség. Érdekes módon a WM3629 melanóma sejt migrációs képessége megemelkedett az egyes selumetinib kezelés hatására. A kombinációs kezelés nem okozott szignifikánsan nagyobb hatást a sejtek migrációs képességének csökkentésében, mint az egyes kezelések. Azonban a WM3629 és MDAMB231 vonalakban csak a kombinációs kezelés okozott szignifikánsan csökkent migrációt a kontrollhoz képest.



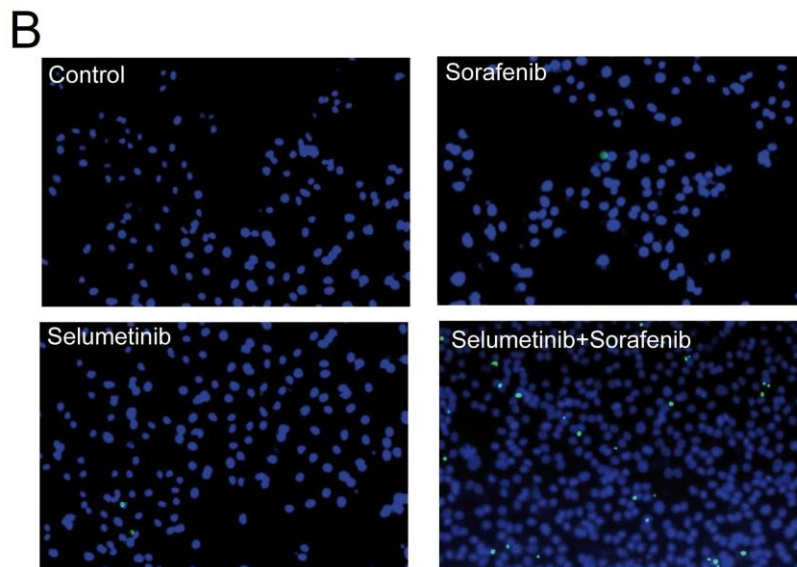
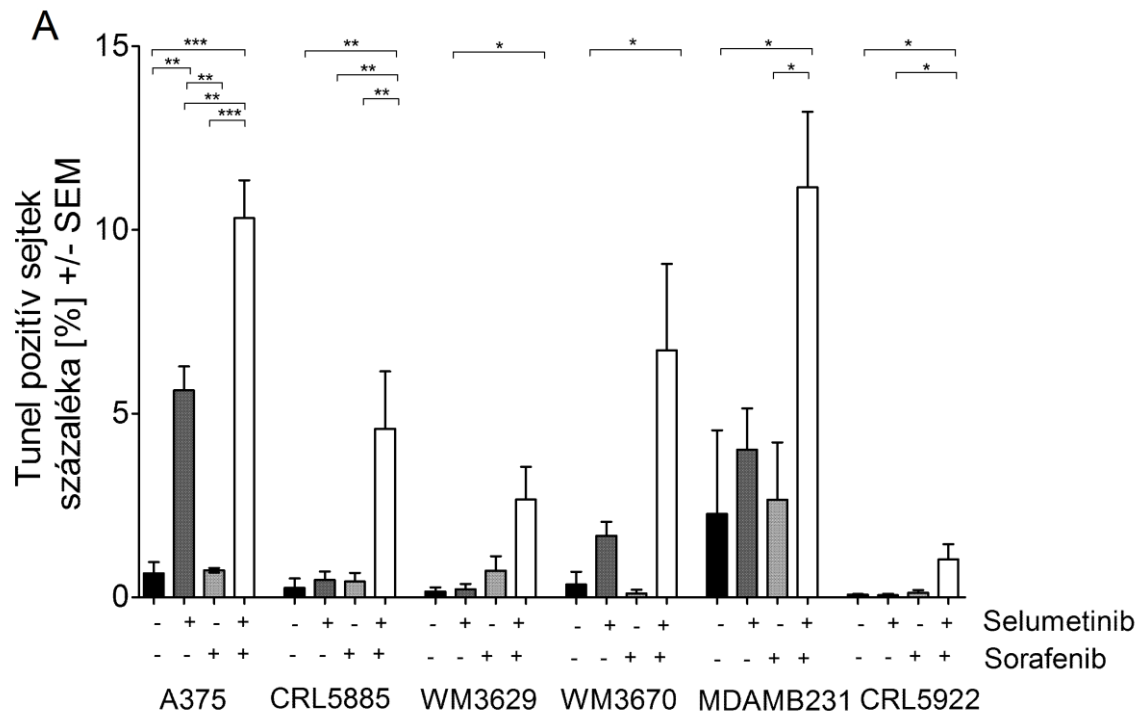
22. ábra A selumetinib és/vagy sorafenib kezelés migrációra gyakorolt hatásának vizsgálata video mikroszkópos módszerrel. Kezelés utáni 48-72 óra (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

4.3.5. Apoptózis indukció a kombinációs kezelések során

A sejteken további két apoptózis vizsgálatot is végeztünk TUNEL és hasított PARP immunblot esszé segítségével (23. és 24. ábra). A selumetinib vagy sorafenib/AZ628 kezelésre nem vagy csak minimális szinten jelent meg a hasított PARP, míg a kombinációs kezelés a sejtekben megnövelte a hasított PARP megjelenését (23/A,B ábra). A WM3629 vonalban a selumetinib és AZ628 kombinációs kezelésre a totál PARP szint lecsökkent, a hasított PARP nem jelent meg. A selumetinib és sorafenib kombinációs kezelés esetében a TUNEL esszét is elvégeztünk, ami megerősítette a hasított PARP immunblot esszé eredményeit (24/A,B ábra). Az eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a pan-RAF és MEK kombinált gátlása növeli az apoptotikus sejtek arányát az egyes kezelésekhez képest.



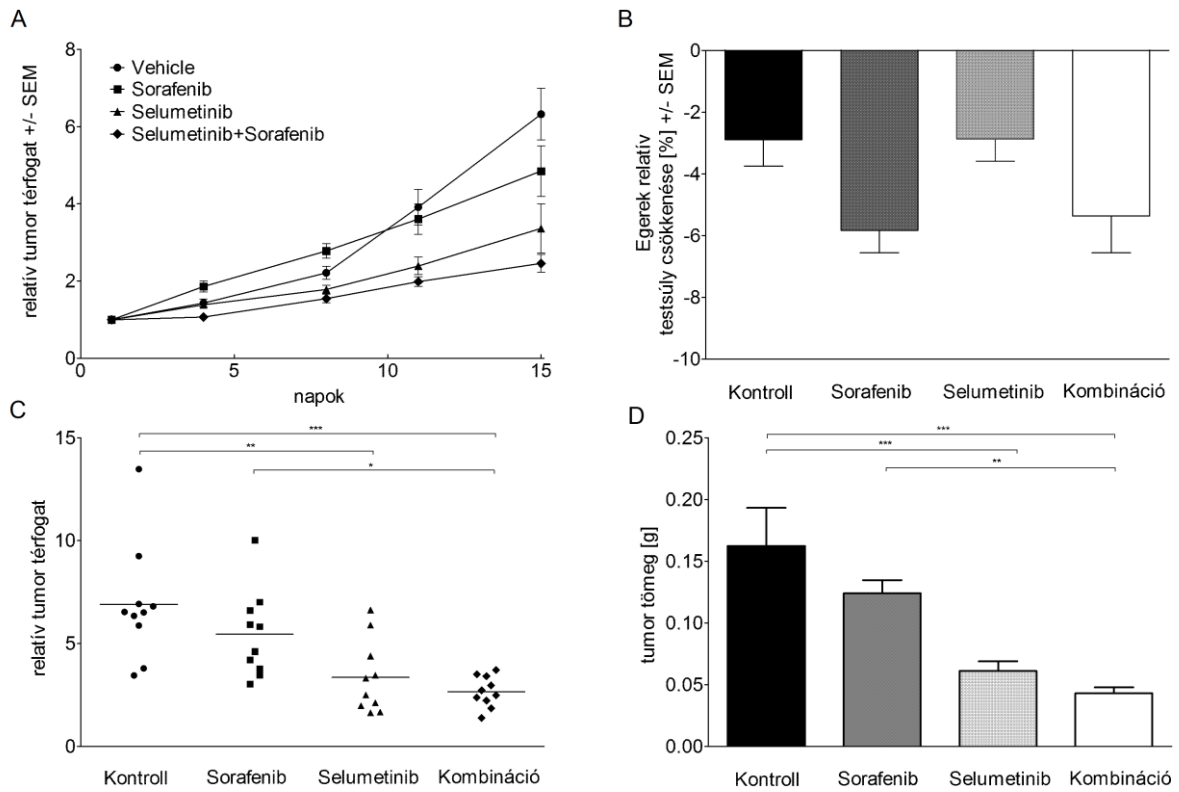
23. ábra A vizsgált 6 BRAF mutáns sejtvonal apoptózis vizsgálata selumetinib és/vagy sorafenib/AZ628 kezelés hatására. (A) Hasított PARP immunblot esszé selumetinib és/vagy sorafenib kezeléssel. (B) Hasított PARP immunblot esszé selumetinib és/vagy AZ628 kezeléssel.



24. ábra A vizsgált 6 BRAF mutáns sejtvonal apoptózis vizsgálata selumetinib és/vagy sorafenib kezelés hatására. (A) TUNEL pozitív sejtek aránya selumetinib és/vagy sorafenib kezelésre. (B) Reprézatívképek a WM3670 sejtvonal TUNEL esszé eredményéről kék – DAPI sejtmag; zöld – TUNEL pozitív sejtmagok. 48 órás kezelés (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

4.3.6. A kombinációs kezelés hatása MDAMB231 xenograftokon

Meghatároztuk a selumetinib és sorafenib kombinációs kezelés hatását 14 hetes NSG egerek MDAMB231 sejvonallal oltott ortotopikus modelljében is. Az MDAMB231 sejteket nőstény egerek emlőmirigyébe injekcióztuk, majd a tapintható tumorméret elérése után az állatokat véletlenszerűen négy csoportra osztottuk. A kontroll csoportban DMSO-t, a selumetinib csoportban 10 mg/tkg selumetinibet, a sorafenib csoportban 25 mg/tkg sorafenibet, míg a kombinációs csoportban selumetinibet és sorafenibet kaptak az állatok naponta, intraperitoneális injekció formájában. A 18. kezelési napon a kezelést leállítottuk és az állatokat eutanizáltuk. Az eredmények azt mutatták, hogy bár mind a sorafenib mind a selumetinib csökkentette a tumor növekedést a kombinációs kezelés érte el a legnagyobb tumor csökkentő hatást (25/A, C, D ábra). A nagyobb tumorcsökkentő hatás a DMSO kontroll és a sorafenib csoporthoz viszonyítva szignifikáns volt a kombinációs csoportban, míg a selumetinib csoporthoz viszonyítva a különbség nem adódott szignifikánsnak (25/C,D ábra). A kezelések toxicitását is monitoroztuk a kísérlet során. Az állatok testsúlya nem változott szignifikánsan a kísérlet során és a kezelési csoportok testsúly vesztesége között sem találtunk szignifikáns eltérést (25/B ábra).



25. ábra Az MDAMB231 emlő sejtvonal xenograft növekedése NSG egérmodellben. (A) A relatív tumor méret az idő függvényében. (B) Az egerek testsúlyának csökkenése (%) az 1. kezelési naphoz képest. (C) A relatív tumor térfogatok a 18. kezelési napon. (D) A tumor tömegek (g) a 18. kezelési napon (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

5. MEGBESZÉLÉS

5.1 A PTEN tumorszupresszor hatása a V600E BRAF mutáns melanóma sejtek terápiás érzékenységére

A V600 BRAF mutáns szolid daganatok terápiájának tovább fejlesztésére sürgető szükség van. A betegek nagy részének teljes túlélésének jelentős javítása nem érhető el a jelenlegi célzott terápiás eszközökkel a gátlószerekkel szemben fellépő rezisztencia mechanizmusok miatt. Dolgozatomban V600E BRAF mutáns melanóma sejtvonalakon vizsgáltam a vemurafenib elleni rezisztencia mechanizmusait és a lehetséges kezelési megoldásokat.

A PTEN mutáció a V600E mutáció mellett 30-40%-os gyakorisággal fordul elő és a melanóma sejtek BRAF-gátló rezisztenciáját okozza (Paraiso és mtsai 2011, Bucheit és mtsai 2014, Herkert és mtsai 2016). Paraiso és munkatársai kimutatták, hogy a PTEN fehérje elvesztése nem a BRAF-gátlók sejtnevekedést gátló hatását, hanem az apoptózis indukcióját csökkenti a BIM proapoptotikus fehérje gátlásán keresztül (Paraiso és mtsai 2011). Míg a vemurafenib apoptózis indukcióját mi nem vizsgáltuk, azonban kimutattuk, hogy a vemurafenib a hosszú távú életképességi esszében nagyobb mértékben gátolta a PTEN-t expresszáló sejteket, mint a PTEN negatív sejteket (6/A ábra). Továbbá a PTEN negatív melanómákban magasabb Akt alapaktiváció mutatható ki, mint a PTEN pozitív melanómákban (Fedorenko és mtsai 2016). Ezt a megfigyelést az általunk vizsgált melanómákban is kimutattunk (13/A. ábra). A PTEN funkcióvesztéses melanómák terápiájára többféle megoldási javaslat született az irodalomban. Felmerült a BRAF és PI3K gátlók kombinált alkalmazása valamint a panPI3K, IGF1R és MAPK gátlók kombinációja is (Fedorenko és mtsai 2016, Herkert és mtsai 2016). Munkánk során alternatív megoldásként a preniláció-gátló zoledronsavat teszteltük V600E BRAF mutáns és PTEN pozitív és negatív melanóma sejtvonalakon. A zoledronsav az oszteoklasztokat gátolja, csontmetasztázisok esetén a csonttörések megakadályozására már alkalmazásban lévő gyógyszer. Továbbá tumor ellenes hatását már számos preklinikai tesztben kimutatták (Zekri és mtsai 2014). Eredményeink alapján a zoledronsav kezelés a BRAF mutáns és PTEN fehérjét nem vagy kis mértékben expresszáló sejtek növekedését gátolta valamint bennük apoptózist indukálhat (6/B, 7. és 16. ábra). Feltételezésünk szerint az

egyik lehetőség a jelenség magyarázatára a zoledronsav Rheb fehérje farnezilációját gátló hatása lehet (Zekri és mtsai 2014). A Rheb, amely egy kis GTP-áz fehérje, farnezilálódása szükséges ahhoz, hogy az mTORC1-et aktiválja, így a PI3K/AKT útvonal aktiválódjon (Buerger és mtsai 2006). Habár feltételezésünket kísérletesen egyelőre nem igazoltuk, több tumor típus (emlő, húgyhólyag) estében már igazolták, hogy a farneziláció-gátlás az PTEN/Akt útvonalon keresztül fejt ki hatását (Li és mtsai 2011, Fragni és mtsai 2016). Mivel a hosszú távon vemurafenib kezelt melanóma sejtvonal párokon igazoltuk, hogy a PTEN funkcióvesztés az Akt magasabb aktivációját okozza (13/A ábra), így feltételezhetjük, hogy a Rheb fehérje gátlása révén a zoledronsav növekedés gátlást és apoptózist indukálhat ezekben a sejtekben. A melanóma sejtvonalpárokon vizsgáltuk a BEZ235 PI3K/mTOR kettős inhibitor hatását PTEN expresszió függvényében. Nem találtunk jelentős különbséget a sejtvonalak között az érzékenységi területben, minden sejtvonal érzékenynek bizonyult a gátlószerre (13/B ábra). Korábbi tanulmányok leírták, hogy a BEZ235 hatékony lehet BRAF-gátlóra rezisztens melanómákban (Dugo és mtsai 2015). Ugyanakkor egy másik munkacsoport azt mutatta ki, hogy a BRAF-gátlás elleni rezisztencia kereszt rezisztenciát okoz MEK és PI3K/mTOR gátlókra is (Penna és mtsai 2016).

5.2 Az EGFR fehérje szerepe a vemurafenib-rezisztens BRAF mutáns melanóma sejtekben

A hosszú távú vemurafenib kezelésnek alávetett melanóma sejtvonal párok rezisztencia mechanizmusait vizsgálva, azt találtuk, hogy az EGFR fehérje magasabb expressziója a vemurafenib rezisztens sejtekben jellemzőbb, valamint az EGFR-t magasabb szinten expresszáló sejtekben magasabb az Erk aktiváció (13/B, C ábra). Először BRAF-gátlókra rezisztens V600 BRAF mutáns kolorektális daganatokban írták le az EGFR aktivációját, mint lehetséges rezisztencia mechanizmust, valamint felvetették az EGFR és BRAF-gátlók kombinált alkalmazásának lehetőségét (Prahallad és mtsai 2012). Később az EGFR-SFK-STAT3 útvonal aktiválódását azonosították BRAF-inhibitor rezisztens melanómában is (Girotti és mtsai 2013). Ezekben a tumorokban magasabb a proliferációs és inváziós aktivitás, mint az EGFR-SFK-STAT3 útvonal nem aktivált sejtekben. Továbbá kimutatták, hogy az EGFR és BRAF-gátlók kombinált alkalmazása is hatékony

lehet ezekben a sejtekben (Girotti és mtsai 2013). Sun és munkatársai az EGFR expressziójának növekedését írták le BRAF-gátló rezisztens melanómákban és azonosítottak egy olyan EGFR pozitív alcsoportot, amelyben hatékony lehet BRAF+MEK inhibitorok adagolásának megvonása majd újra-adagolása (Sun és mtsai 2014). Gross és munkatársai is vizsgálták az EGFR és a vemurafenib rezisztencia összefüggéseit több melanóma sejtvonalon és azt az eredményt kapták, hogy EGFR-t magas szinten expresszáló sejtekben a fehérje inaktív lehet, valamint az EGFR aktivációja prediktálhatja a vemurafenib rezisztenciát (Gross és mtsai 2015). Egy másik munkacsoport rávilágított arra, hogy az EGFR aktiválódása epigenetikai változások következményeként jön létre, valamint a PI3K/Akt útvonal aktiválódását okozza (Wang és mtsai 2015). Továbbá úgy találták, hogy az EGFR-inhibitorok hatástalanok voltak ezekben a tumorokban (Wang és mtsai 2015). Mi is teszteltük az EGFR-gátló erlotinib hatását a hosszú távon vemurafenib kezelt melanóma sejtvonalon párokon. Az erlotinibet jelenleg EGFR-mutáns tüdő daganatok első vonalbeli kezelésében használják (Girard 2018). Eredményeink szerint az EGFR-t magas szinten expresszáló V600E BRAF mutáns melanóma vonalak rezisztensebbnek bizonyultak az erlotinib kezelésre (14/A ábra). Ezt a megfigyelést már több tanulmányban alátámasztották (Dugo és mtsai 2015, Wang és mtsai 2015).

Mivel a BRAF-gátlásnak ellenálló, EGFR fehérjét magas szinten termelő vonalakban az erlotinib egyes kezelés hatástalannak bizonyult, így megvizsgáltuk az erlotinib és PI3K/mTOR kettős gátló BEZ235 kombinált hatását a sejtvonalon párokon. A BEZ235 preklinikai tesztekben hatékony tumor ellenes választ mutatott számos daganat esetében, azonban a klinikai fázisvizsgálatok eddig elbuktak a magas toxicitása miatt (Carlo és mtsai 2016). Kísérleteink alapján a BEZ235 hatékony gátlószernek bizonyult minden általunk vizsgált sejtvonalon esetében (14/B ábra) és az erlotinib hozzáadása szinergista/additív módon növelte a növekedés gátló hatást (15. ábra). Az EGFR és PI3K/mTOR kombinált gátlásának hatékonyságát már több tumor esetében leírták. EGFR-gátló rezisztens emlő valamint fej-nyak tumorsejtvonalon kimutatták, hogy a kombinált EGFR és PI3K/mTOR gátlás alkalmazására hatékony lehet (Brüner-Kubath és mtsai 2011, D'Amato és mtsai 2014). Továbbá hasnyálmirigy sejtvonalon az mTOR gátlás okozta EGFR aktiváció kivédhető erlotinib és mTOR-gátló kombinációjával (Wei és mtsai 2015). Az erlotinib és BEZ235 kombináció tüdő sejtvonalon esetében is nagyobb

növekedés gátló hatással bírt, mint az egyes kezelések (Zito és mtsai 2012). Eredményeink alapján a BRAF és EGFR-gátló rezisztens melanómákban az EGFR és PI3K/mTOR kombinált gátlása hatékony tumor ellenes választ adhat.

5.3 A mutáns BRAF gátlásának hatása melanóma sejtek immun checkpoint fehérjéinek kifejeződésére

Mivel az immunterápiák, köztük a PD-gátlók alkalmazása egyre nagyobb teret kap az onkológiában és a melanóma kezelésében, megvizsgáltuk, hogy a melanóma sejtvonalakon hogyan változott a PD-L1 és PD-L2 mRNS expressziója a hosszú távú vemurafenib kezelés hatására. Eredményeink azt mutatták, hogy a hosszú távú vemurafenib kezelés hatására minden esetben növekedett vagy a PD-L1 vagy a PD-L2 mRNS expressziója, alátámasztva az eddigi irodalmi eredményeket (10. ábra). Auditro és munkatársai arra az eredményre jutottak, hogy a BRAF és MEK-gátló rezisztens melanómákban magasabb a PD-L1 expressziója, valamint BRAF-gátlóval kezelt betegekben is növekedett PD-L1 expressziót azonosítottak (Auditro és mtsai 2017). A PD-L1 és PD-L2 expresszió prediktív értéke még nem teljesen tisztázott melanómában. Egy retrospektív vizsgálatban arra jutottak, hogy a PD-L1-et és PD-L2-öt expresszáló melanómák jobb prognózissal bírnak (Obeid és mtsai 2016). Továbbá előzetesen vemurafenib kezelést kapott betegekben a PD-L1 pozitivitást mutató betegek csoportja jobb teljes túlélést mutatott, mint a PD-L1 negatív betegek (Wongchenko és mtsai 2017).

5.4 A vemurafenib rezisztencia kialakulása során bekövetkező fenotípusváltás molekuláris háttere melanómában

Munkánk során vizsgáltuk a hosszútávú vemurafenib kezelés hatását a sejtek proliferációjára és migrációjára is. Azt találtuk, hogy hosszútávú vemurafenib kezelés hatására az esetek többségében (hatból négy esetben) csökkent az alap proliferációs aktivitás, viszont minden esetben megnövekedett a sejtek migrációja (8. és 9. ábra). Irodalmi adatok alapján a megnövekedett migrációs aktivitás hátterében egy az EMT folyamathoz hasonló átalakulás állhat, amely során a sejtek fokozzák a mezenhimális

sejtekre jellemző fehérjék termelését, és így növelik a migrációs és inváziós aktivitásukat (Pearlman és mtsai 2017). Különböző EMT faktorok (SNAIL, MMP-3, MMP-1, ZEB-1, Vimentin, N-Cadherin, E-Cadherin) hírvivő RNS expressziós szintjét elemeztük a sejtvonalpárokban (10. ábra). Az E-cadherin elvesztése gyakori a V600E BRAF mutáns melanómákban (Boyd és mtsai 2013). Ezt eredményeink is alátámasztották, az E-cadherin expresszió már a vemurafenib kezelés megkezdése előtt elveszett minden sejtvonal pár esetében. Ugyanakkor E-cadherin elvesztése a melanóma sejtekben az EMT program bekapcsolódásának egyik jele (Caramel és mtsai 2013). A többi vizsgált EMT faktor expressziós szintjének növekedését vártuk az irodalmi adatok alapján (6. táblázat). Azonban az általunk vizsgált melanóma sejtvonal párokban nem tudtunk megállapítani egységes mintázatot az EMT faktorok expressziós szintjének változásában, így további vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy a kapott eredményeket megfelelően értékelni tudjuk (10. ábra). Az EMT faktorok mellett elemeztük néhány melanómában fontos szerepet betöltő transzkripciós faktor (MITF, FRA-1) mRNS szintjének változásait és a lehetséges összefüggéseket a proliferációs és migrációs aktivitás között. Azt találtuk, hogy a MITF mRNS expresszió a migrációs aktivitással mutatott negatív korrelációt (11/A ábra), továbbá a hosszú távú vemurafenib kezelés hatására hatból négy esetben csökkent a MITF mRNS szintje (10. ábra). Korábbi tanulmányok már kimutatták, hogy a MITF alacsony expressziója invazívabb fenotípus megjelenéséhez vezet (Muller és mtsai 2014, Hartman és mtsai 2015). Továbbá a magas szinten MITF-et expresszáló sejtekben a MITF expressziójának csendesítése gyorsabb migrációt okozott a sejtekben (Eccles és mtsai 2013). Egy beteganyag vizsgálat pedig kimutatta, hogy az alacsony MITF expresszió rosszabb prognózissal társul (Agnarsdóttir és mtsai 2012). A FRA-1 mRNS expresszió a proliferációs aktivitással mutatott negatív korrelációt (11/B ábra). Továbbá azokban a melanóma vonalakban, ahol csökkent a proliferációs aktivitás a hosszú távú vemurafenib kezelés hatására, a FRA-1 mRNS szint megnőtt (négyből három esetben) (8. és 10. ábra). Abban a két vonalban ahol nőtt a proliferációs aktivitás a hosszú távú vemurafenib kezelés hatására, a FRA-1 mRNS szint lecsökkent (8. és 10. ábra). Glióma sejtvonalakon már kimutatták, hogy a FRA-1 túlexpresszálása a proliferáció gátlását okozza (Shirsat és mtsai 2003). Emlő vonalakon végzett vizsgálatok azonban azt mutatták, hogy a FRA-1 túlexpressziója proliferációs aktivitás növekedését idézi elő (Belguise és mtsai 2005). Obenauf és munkatársai melanóma modellen vizsgálták a FRA-1 jelentőségét és azt

találták, hogy a BRAF inhibitorra szenzitív sejtekben az inhibitor hatására csökken a FRA-1 expresszió és így olyan „terápia indukált szekretom” termelődik, melyek a rezisztens sejtek proliferációját és metasztatikus kapacitását növelik a PI3K/Akt útvonalon keresztül (Bernards 2015, Obenauf és mtsai 2015). Korábbi kutatásokban már kimutatták, hogy a FRA-1 és MITF expresszió negatív korrelációban van egymással, a magas MITF expresszió alacsony FRA-1 expresszióval jár együtt (Smith és mtsai 2017). Ezt a megfigyelést a mi eredményeink is alátámasztották (11/E ábra). Továbbá azt találtuk, hogy az EGFR mRNS expresszió a MITF mRNS expresszióval negatív, míg a FRA-1 mRNS expresszióval pozitív korrelációt mutat (11/C,D ábra). Már több munkacsoport is kimutatta az EGFR és MITF expresszió közti negatív összefüggést melanómában (Sun és mtsai 2014, Dugo és mtsai 2015, Ji és mtsai 2015). Összefoglalva, eredményeink arra utalhatnak, hogy az EGFR expresszió meghatározhatja a FRA-1 és MITF transzkripció faktorok expresszióját és ezáltal befolyásolhatja a proliferációs és migrációs aktivitást a sejtekben.

5.5 A nem-V600 BRAF mutáns tumorsejtek célzott terápiájának új lehetőségei

A nem-V600 BRAF mutáns tumorok célzott terápiája jelenleg nem megoldott. Munkánk során a sorafenib/AZ628 pan-RAF inhibitorok és a selumetinib kombinációs terápiáját vizsgáltuk nem-V600 BRAF mutáns tumorok preklinikai modelljein. Eredményeink alapján a kombinációs terápia nagyobb mértékben csökkentette a sejtek életképességét, indukált apoptózist, csökkentette a migrációt és az Erk aktivációt, mint az egyes kezelések (18-24. ábra). A sorafenib nem tekinthető szelektív pan-RAF inhibitornak, mivel számos egyéb célpontja is van (3. táblázat). Így a kombinációs hatást megvizsgáltuk egy specifikusabb és szelektív pan-RAF inhibitorral, az AZ628 vegyülettel is, alátámasztva azt a feltételezésünket mi szerint a sorafenib RAF – gátló hatása fontos szerepet játszik. Eredményeink alapján mind a sorafenib, mind az AZ628 hasonló hatást mutatott a MEK-gátló selumetinibbel kombinációban alkalmazva (19. és 23/B ábra). Míg vizsgálatunk az első olyan munka, amely a sorafenib/AZ628 és a selumetinib kombinált terápia lehetőségeit feltérképezte, vannak olyan tanulmányok, melyek a V600 BRAF mutációra szelektív inhibitorok (dabrafenib/vemurafenib) és MEK-inhibitorok kombinációját

vizsgálták nem-V600 BRAF mutáns NSCLC-ben és kolorektális daganatban. A nem-V600 BRAF mutáns H1666 és H1395 NSCLC és a H508 kolorektális sejtvonalakon a dabrafenib és trametinib kombinációs kezelés nagyobb mértékben növelte a sejtnövekedés gátlást és a kaszpáz aktivációt, mint az egyes kezelések (Noeparast és mtsai 2017). A H1755 nem-V600 BRAF mutáns NSCLC vonalban a vemurafenib és trametinib kezelés egy kis mértékű, de szignifikáns apoptózis növekedést okozott az egyes kezelésekkel összehasonlítva (Joshi és mtsai 2015). Azonban fontos kiemelni, hogy a klinikai tesztekben a nem-V600 BRAF mutáns betegekben a V600E BRAF specifikus inhibitorok elbuktak, így az ezekkel az inhibitorokkal való próbálkozások eredménytelenek lehetnek (Kim és mtsai 2016). Továbbá egy nemrég megjelent cikk is alátámasztotta, hogy a II-es típusú gátlószerek közé tartozó AZ628/sorafenib nagyobb mértékben gátolja az Erk útvonalat, mint az I-es típusú gátlószerek közé tartozó vemurafenib és dabrafenib (Noeparast és mtsai 2018). Továbbá, már 2009-ben megjelent egy publikáció a sorafenib hatékonyságáról az alacsony kináz aktivitású BRAF mutáns melanómákban (Smalley és mtsai 2009). Kimutatták, hogy a sorafenib csökkentette a tumor növekedést és apoptózist indukált az alacsony kináz aktivitású nem-V600 BRAF mutáns melanómákban (WM3629, WM3670). Azonban ez a hatás nem volt megfigyelhető a magas aktivitású BRAF mutánsokban. A mi eredményeink alátámasztották ezt a megfigyelést, azonban mi azt tapasztaltuk, hogy MEK-inhibitor hozzáadásával tovább növelhető a sorafenib tumor ellenes hatása. Továbbá kiemelendő az a néhány eset bemutatás, ahol nem-V600 BRAF mutáns betegekben a sorafenib terápia drámai tumor ellenes hatást mutatott (Gautschi és mtsai 2015, Sereno és mtsai 2015, Casadei Gardini és mtsai 2016). Ugyanakkor a célzott terápia okozhat ellentétes hatásokat a párhuzamos jelátviteli utakon. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a sorafenib vagy MEK-gátlók használata az Akt aktiváció emelkedését okozhatja KRAS vagy BRAF mutáns tumor sejtekben (Fritsche-Guenther és mtsai, Won és mtsai 2012, Yuen és mtsai 2012, Fritsche-Guenther és mtsai 2016). Munkánk során megvizsgáltuk a pan-RAF és MEK kombinált gátlás hatására bekövetkező változásokat a PI3K/Akt útvonalon (21. ábra). Azt találtuk, hogy 4 órás kezelés után a két alacsony kináz aktivitású BRAF mutációt és NRAS társ mutációt hordozó melanóma vonalban (WM3629, WM3670), a selumetinib kezelés az Akt emelkedett aktivációját okozta (21. ábra). Ugyanakkor a WM3629 sejtvonalban a selumetinib kezelés megemelte a sejt migrációs képességét is

(22. ábra). Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a MEK-gátlók okozhatnak tumor serkentő választ a nem-V600 BRAF mutáns sejtekben, azonban ez a hatás sorafenib adásával kiküszöbölhető. Megvizsgáltuk a sorafenib és selumetinib kombinált gátlásának hatását a nem-V600 BRAF mutáns MDAMB231 emlő sejtvonal *in vivo* xenograft modelljében is (25. ábra). Habár a fokozott tumor növekedést gátló hatás nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet a selumetinib és kombinációs kezelési csoportok között, a kombinációs kezelési csoportban a szórás szignifikánsan kisebb volt ($p=0.017$, F-teszt) (25/A,C,D ábra). Ez az eredmény arra utalhat, hogy a kombinált kezelés csökkentheti a selumetinibre kevésbé reagálók számát. Továbbá egy nemrég megjelent tanulmány szerint az MDAMB231 sejtvonal *in vivo* modelljében a selumetinib és sorafenib kombinált kezelés majdnem teljesen meggátolta a tumor növekedést és csökkentette a tüdő metasztázisok számát (Nagaria és mtsai 2017). Mivel vizsgálatunkban csak egy *in vivo* modellen teszteltük a pan-RAF és MEK kombinált gátlásának tumor ellenes hatását, a jövőben további vizsgálatok szükségesek annak igazolására, hogy a kombinált terápia több előnnyel jár, mint a monoterápia. A sorafenib és selumetinib biztonságos alkalmazására már folyamatban van egy I. fázisú klinikai vizsgálat, amelyben hepatocelluláris karcinómás betegekben vizsgálták a két szer alkalmazását. Eredményeik szerint a kombinációs kezelés tolerálható mellékhatásokkal jár együtt (Tai és mtsai 2016).

6. KÖVETKEZTETÉSEK

A Célkitűzések fejezetben meghatározott kérdésekre eredményeink alapján az alábbi válaszokat adhatjuk:

1. Tudomásunk szerint először mutattuk be, hogy a V600E BRAF mutáns és PTEN fehérjét nem vagy csak kis mértékben expresszáló melanóma sejtekben a zoledronsav kezelés növekedés-gátló és apoptózist indukáló hatást vált ki. Ezzel szemben a V600E BRAF mutáns és PTEN fehérjét expresszáló sejtek esetében nem tapasztaltunk jelentős tumor ellenes hatást a zoledronsav kezelés során.

2. Az általunk vizsgált V600E BRAF mutáns melanóma sejtvonalak kezelés előtti és hosszú távú vemurafenib kezelés utáni sejtvonalpárjaiban a sejtek migrációs képessége növekedett, míg proliferációjuk mértéke egyes esetekben csökkent más sejtekben pedig megnőtt. Eredményeink alapján a fenotípusváltással összefügg az EGFR, FRA-1 és MITF fehérjék kifejeződésének változása.

Számos BRAF-gátló rezisztens melanómában az EGFR és PI3K/mTOR kombinált gátlása szinergista tumor ellenes választ adott.

3. Tudomásunk szerint először írtuk le, hogy a nem-V600 BRAF mutációt hordozó szolid daganatok (melanóma, tüdő, emlő sejtvonalak) preklinikai modelljein a pan-RAF (sorafenib, AZ628) és a MEK (selumetinib) kombinációs gátlás fokozott tumor ellenes hatást mutatott az egykomponensű kezelések hatásához képest.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A BRAF mutáns szolid daganatok kezelése még számos kihívást tartogat a kutatók számára. Egyrészt a V600E BRAF mutáns daganatok kezelésére már létezik célzott terápia, azonban a kezelés során fellépő rezisztencia komoly megoldandó problémát jelent. Másrészt a nem-V600E BRAF mutáns daganatokra jelenleg nem érhető el célzott terápia.

Munkánk során BRAF mutáns szolid daganatok preklinikai modelljein tanulmányoztuk a vemurafenib rezisztens V600E BRAF mutáns melanómák rezisztencia mechanizmusait és a kezelésük lehetséges alternatív megoldásait, valamint feltérképeztük a nem-V600 BRAF mutáns daganatok kezelésének egy lehetséges pan-RAF és MEK kombinált gátlásán alapuló megoldását.

A V600E BRAF mutáns és PTEN-t nem vagy kismértékben termelő melanóma sejtekben a preniláció-gátló zoledronsav nagyobb mértékben gátolta a sejtek osztódását és indukált apoptózist, mint a PTEN-t kifejező sejtekben. Továbbá azt találtuk, hogy az EGFR+PI3K/mTOR kombinált gátlás hatékony megoldás lehet a BRAF és EGFR-gátló rezisztens melanómák kezelésben. Megvizsgáltuk a hosszú távú vemurafenib kezelés előtti és utáni V600E BRAF mutáns melanóma sejtvonal párokban a sejtek proliferációját és migrációját. A kezelés utáni sejtvonalak nagyobb sejtmozgást mutattak. A migrációs képesség a MITF, míg a proliferációs képesség a FRA-1 transzkripciós faktorok mRNS szintjével mutatott negatív korrelációt. Továbbá mindkét transzkripciós faktor összefüggést mutatott az EGFR mRNS expressziójával. Eredményeink arra utalhatnak, hogy az EGFR expresszió meghatározhatja a melanóma sejtek migrációs és proliferációs kapacitását a MITF illetve FRA-1 transzkripciós faktorokon keresztül. Végezetül eredményeink alapján a nem-V600 BRAF mutáns daganatok preklinikai modelljeiben a panRAF+MEK kombinált gátlása sorafenibbel/AZ628-al valamint selumetinibbel, nagyobb mértékben csökkentette a sejtek életképességét, indukált apoptózist, csökkentette a migrációt és az Erk aktivációt mind az egyes kezelések.

Összességében a dolgozatban bemutatott eredmények hozzájárulhatnak a BRAF mutáns daganatos betegek terápiájának optimalizálásához.

8. SUMMARY

Targeting BRAF mutant solid tumors still remains challenging. Targeted therapy for V600E BRAF mutant solid tumors already exists but resistance to the treatment is still a serious problem to be solved. Moreover, there are currently no approved targeted therapeutic options against non-V600E BRAF mutant tumors.

Here we studied targeted therapy resistance mechanisms of V600E BRAF mutant melanoma and also explored potential alternative solutions for their treatment. We also investigated effects of combined inhibition of pan-RAF and MEK on preclinical models of non-V600 BRAF mutant tumors.

In V600E BRAF mutant melanoma cells that did not or slightly express PTEN protein, prenylation-inhibitor zoledronic acid inhibited cell proliferation and induced apoptosis more profoundly than in melanoma cells expressing PTEN. Furthermore, we found that in BRAF and EGFR inhibitor resistant melanoma cells EGFR and PI3K/mTOR combination inhibition could be a promising approach. We also investigated the proliferation and migration of pre- and posttreatment isogenic human melanoma cell line pairs. Posttreatment V600E BRAF mutant melanoma cells showed more invasive phenotype. We found that migratory capacity was negatively correlated with MITF expression, while proliferation capacity negatively correlated with FRA-1 mRNA level. Both transcription factors correlated with EGFR mRNA expression. Our results suggests EGFR expression might determine migratory and proliferative capacity of cells via MITF and FRA-1 transcription factors, respectively. Finally, in non-V600 BRAF mutant cell lines combined inhibition of panRAF and MEK with sorafenib/AZ628 and selumetinib significantly stronger inhibited cell growth, cell migration and Erk activation inhibition and also increased apoptosis induction compared to single treatments. Altogether, our novel findings may contribute to the optimization of targeted therapy of BRAF mutant malignancies.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Agnarsdóttir, M., F. Ponten, H. Garmo, G. Wagenius, L. Mucci, K. Magnusson, L. Holmberg and S. Eaker-Fält (2012). "MITF Expression in Cutaneous Malignant Melanoma." *Molecular Biomarkers & Diagnosis* 3(4).

Albanell, J., J. A. Elvin, S. M. Ali, A. B. Schrock, J. Chung, J.-A. Vergilio, J. Suh, S. Ramkissoon, E. A. Severson, S. Daniel, V. A. Miller, P. J. Stephens, L. M. Gay and J. S. Ross (2017). "BRAF: An emerging target for triple-negative breast cancer." *Journal of Clinical Oncology* 35(15_suppl): 1099-1099.

Amaravadi, R. K., K. E. Hamilton, X. Ma, S. Piao, A. D. Portillo, K. L. Nathanson, M. S. Carlino, G. V. Long, I. Puzanov, X. Xu, J. J. Morrisette, K. Y. Tsai, K. T. Flaherty, J. A. Sosman, G. R. Goodman, G. A. McArthur, A. K. Rustgi, D. C. Metz, L. M. Schuchter, P. B. Chapman and A. R. Sepulveda (2015). "Multiple Gastrointestinal Polyps in Patients Treated with BRAF Inhibitors." *Clin Cancer Res* 21(23): 5215-5221.

Araiza-Olivera, D., Y. Feng, G. Semenova, T. Y. Prudnikova, J. Rhodes and J. Chernoff (2018). "Suppression of RAC1-driven malignant melanoma by group A PAK inhibitors." *Oncogene* 37(7): 944-952.

Arozarena, I. and C. Wellbrock (2017). "Overcoming resistance to BRAF inhibitors." *Ann Transl Med* 5(19): 387.

Audrito, V., S. Serra, A. Stingi, F. Orso, F. Gaudino, C. Bologna, F. Neri, G. Garaffo, R. Nassini, G. Baroni, E. Rulli, D. Massi, S. Oliviero, R. Piva, D. Taverna, M. Mandalà and S. Deaglio (2017). "PD-L1 up-regulation in melanoma increases disease aggressiveness and is mediated through miR-17-5p." *Oncotarget* 8(9): 15894-15911.

Baik, C. S., N. J. Myall and H. A. Wakelee (2017). "Targeting BRAF-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: From Molecular Profiling to Rationally Designed Therapy." *Oncologist* 22(7): 786-796.

Beadling, C., M. C. Heinrich, A. Warrick, E. M. Forbes, D. Nelson, E. Justusson, J. Levine, T. L. Neff, J. Patterson, A. Presnell, A. McKinley, L. J. Winter, C. Dewey, A. Harlow, O. Barney, B. J. Druker, K. G. Schuff and C. L. Corless (2011). "Multiplex mutation screening by mass spectrometry evaluation of 820 cases from a personalized cancer medicine registry." *J Mol Diagn* 13(5): 504-513.

Belguise, K., N. Kersual, F. Galtier and D. Chalbos (2005). "FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells." *Oncogene* 24(8): 1434-1444.

Bell, R. J., H. T. Rube, A. Xavier-Magalhaes, B. M. Costa, A. Mancini, J. S. Song and J. F. Costello (2016). "Understanding TERT Promoter Mutations: A Common Path to Immortality." *Mol Cancer Res* 14(4): 315-323.

Bernards, R. (2015). "A price to pay for tumor regression." *Cell Res* 25(7): 763-764.

Bond, C. E., A. Umapathy, I. Ramsnes, S. A. Greco, Z. Zhen Zhao, K. A. Mallitt, R. L. Buttenshaw, G. W. Montgomery, B. A. Leggett and V. L. Whitehall (2012). "p53 mutation is common in microsatellite stable, BRAF mutant colorectal cancers." *Int J Cancer* 130(7): 1567-1576.

Box, N. F., T. O. Vukmer and T. Terzian (2014). "Targeting p53 in melanoma." *Pigment Cell Melanoma Res* 27(1): 8-10.

Boyd, S. C., B. Mijatov, G. M. Pupo, S. L. Tran, K. Gowrishankar, H. M. Shaw, C. R. Goding, R. A. Scolyer, G. J. Mann, R. F. Kefford, H. Rizos and T. M. Becker (2013). "Oncogenic B-RAF(V600E) signaling induces the T-Box3 transcriptional repressor to repress E-cadherin and enhance melanoma cell invasion." *J Invest Dermatol* 133(5): 1269-1277.

Brose, M. S., M. E. Cabanillas, E. E. W. Cohen, L. J. Wirth, T. Riehl, H. Yue, S. I. Sherman and E. J. Sherman (2016). "Vemurafenib in patients with BRAFV600E-positive metastatic or unresectable papillary thyroid cancer refractory to radioactive iodine: a non-randomised, multicentre, open-label, phase 2 trial." *The Lancet Oncology* 17(9): 1272-1282.

Brüner-Kubath, C., W. Shabbir, V. Saferding, R. Wagner, C. F. Singer, P. Valent, W. Berger, B. Marian, C. C. Zielinski, M. Grusch and T. W. Grunt (2011). "The PI3 kinase/mTOR blocker NVP-BEZ235 overrides resistance against irreversible ErbB inhibitors in breast cancer cells." *Breast Cancer Research and Treatment* 129(2): 387-400.

Bucheit, A. D., G. Chen, A. Siroy, M. Tetzlaff, R. Broaddus, D. Milton, P. Fox, R. Bassett, P. Hwu, J. E. Gershenwald, A. J. Lazar and M. A. Davies (2014). "Complete loss of PTEN protein expression correlates with shorter time to brain metastasis and survival in stage IIIB/C melanoma patients with BRAFV600 mutations." *Clin Cancer Res* 20(21): 5527-5536.

Buerger, C., B. DeVries and V. Stambolic (2006). "Localization of Rheb to the endomembrane is critical for its signaling function." *Biochem Biophys Res Commun* 344(3): 869-880.

Caramel, J., E. Papadogeorgakis, L. Hill, G. J. Browne, G. Richard, A. Wierinckx, G. Saldanha, J. Osborne, P. Hutchinson, G. Tse, J. Lachuer, A. Puisieux, J. H. Pringle, S. Ansieau and E. Tulchinsky (2013). "A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma." *Cancer Cell* 24(4): 466-480.

Carlino, M. S., C. Fung, H. Shahheydari, J. R. Todd, S. C. Boyd, M. Irvine, A. M. Nagrial, R. A. Scolyer, R. F. Kefford, G. V. Long and H. Rizos (2015). "Preexisting MEK1P124 mutations diminish response to BRAF inhibitors in metastatic melanoma patients." *Clin Cancer Res* 21(1): 98-105.

Carlo, M. I., A. M. Molina, Y. Lakhman, S. Patil, K. Woo, J. DeLuca, C. H. Lee, J. J. Hsieh, D. R. Feldman, R. J. Motzer and M. H. Voss (2016). "A Phase Ib Study of BEZ235, a Dual Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) and Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), in Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma." *Oncologist* 21(7): 787-788.

Carter, J., L. H. Tseng, G. Zheng, J. Dudley, P. Illei, C. D. Gocke, J. R. Eshleman and M. T. Lin (2015). "Non-p.V600E BRAF Mutations Are Common Using a More Sensitive and Broad Detection Tool." *Am J Clin Pathol* 144(4): 620-628.

Casadei Gardini, A., E. Chiadini, L. Faloppi, G. Marisi, A. Delmonte, M. Scartozzi, C. Loretelli, A. Lucchesi, D. Oboldi, A. Dubini, G. L. Frassinetti and P. Ulivi (2016). "Efficacy of sorafenib in BRAF-mutated non-small-cell lung cancer (NSCLC) and no response in synchronous BRAF wild type-hepatocellular carcinoma: a case report." *BMC Cancer* 16: 429.

Catalanotti, F., D. T. Cheng, A. N. Shoushtari, D. B. Johnson, K. S. Panageas, P. Momtaz, C. Higham, H. H. Won, J. J. Harding, T. Merghoub, N. Rosen, J. A. Sosman, M. F. Berger, P. B. Chapman and D. B. Solit (2017). "PTEN Loss-of-Function Alterations Are Associated With Intrinsic Resistance to BRAF Inhibitors in Metastatic Melanoma." *JCO Precision Oncology*(1): 1-15.

Cheng, L., A. Lopez-Beltran, F. Massari, G. T. MacLennan and R. Montironi (2018). "Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine." *Mod Pathol* 31(1): 24-38.

Chou, T. C. (2010). "Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method." *Cancer Res* 70(2): 440-446.

Cohen, R., P. Cervera, M. Svrcek, A. Pellat, C. Dreyer, A. de Gramont and T. Andre (2017). "BRAF-Mutated Colorectal Cancer: What Is the Optimal Strategy for Treatment?" *Curr Treat Options Oncol* 18(2): 9.

Combe, P., L. Chauvenet, M. A. Lefrere-Belda, H. Blons, C. Rousseau, S. Oudard and E. Pujade-Lauraine (2015). "Sustained response to vemurafenib in a low grade serous ovarian cancer with a BRAF V600E mutation." *Invest New Drugs* 33(6): 1267-1270.

Corcoran, R. B., C. E. Atreya, G. S. Falchook, E. L. Kwak, D. P. Ryan, J. C. Bendell, O. Hamid, W. A. Messersmith, A. Daud, R. Kurzrock, M. Pierobon, P. Sun, E. Cunningham, S. Little, K. Orford, M. Motwani, Y. Bai, K. Patel, A. P. Venook and S. Kopetz (2015). "Combined BRAF and MEK Inhibition With Dabrafenib and Trametinib in BRAF V600-Mutant Colorectal Cancer." *J Clin Oncol* 33(34): 4023-4031.

Corcoran, R. B., J. Settleman and J. A. Engelman (2011). "Potential Therapeutic Strategies to Overcome Acquired Resistance to BRAF or MEK Inhibitors in BRAF Mutant Cancers." *Oncotarget* 2(4): 336-346.

Cordaro, F. G., A. L. De Presbiteris, R. Camerlingo, N. Mozzillo, G. Pirozzi, E. Cavalcanti, A. Manca, G. Palmieri, A. Cossu, G. Ciliberto, P. A. Ascierto, S. Travali, E. J. Patriarca and E. Caputo (2017). "Phenotype characterization of human melanoma cells resistant to dabrafenib." *Oncol Rep* 38(5): 2741-2751.

D'Amato, V., R. Rosa, C. D'Amato, L. Formisano, R. Marciano, L. Nappi, L. Raimondo, C. Di Mauro, A. Servetto, C. Fuscillo, B. M. Veneziani, S. De Placido and R. Bianco (2014). "The dual PI3K/mTOR inhibitor PKI-587 enhances sensitivity to cetuximab in EGFR-resistant human head and neck cancer models." *Br J Cancer* 110(12): 2887-2895.

Dahlman, K. B., J. Xia, K. Hutchinson, C. Ng, D. Hucks, P. Jia, M. Atefi, Z. Su, S. Branch, P. L. Lyle, D. J. Hicks, V. Bozon, J. A. Glaspy, N. Rosen, D. B. Solit, J. L. Netterville, C. L. Vnencak-Jones, J. A. Sosman, A. Ribas, Z. Zhao and W. Pao (2012). "BRAF(L597) mutations in melanoma are associated with sensitivity to MEK inhibitors." *Cancer Discov* 2(9): 791-797.

Dankort, D., D. P. Curley, R. A. Cartlidge, B. Nelson, A. N. Karnezis, W. E. Damsky, Jr., M. J. You, R. A. DePinho, M. McMahon and M. Bosenberg (2009). "Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma." *Nat Genet* 41(5): 544-552.

Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. C. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton and P. A. Futreal (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." *Nature* 417: 949.

Davis, M. J. and J. Schlessinger (2012). "The genesis of Zelboraf: targeting mutant B-Raf in melanoma." *J Cell Biol* 199(1): 15-19.

de Langen, A. J. and E. F. Smit (2017). "Therapeutic approach to treating patients with BRAF-mutant lung cancer: latest evidence and clinical implications." *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 9(1): 46-58.

Dhillon, A. S. and E. Tulchinsky (2015). "FRA-1 as a driver of tumour heterogeneity: a nexus between oncogenes and embryonic signalling pathways in cancer." *Oncogene* 34(34): 4421-4428.

Donia, M., K. Harbst, M. van Buuren, P. Kvistborg, M. F. Lindberg, R. Andersen, M. Idorn, S. Munir Ahmad, E. Ellebaek, A. Mueller, P. Fagone, F. Nicoletti, M. Libra, M. Lauss, S. R. Hadrup, H. Schmidt, M. H. Andersen, P. Thor Straten, J. A. Nilsson, T. N. Schumacher, B. Seliger, G. Jonsson and I. M. Svane (2017). "Acquired Immune Resistance Follows Complete Tumor Regression without Loss of Target Antigens or IFN γ Signaling." *Cancer Res* 77(17): 4562-4566.

Dugo, M., G. Nicolini, G. Tragni, I. Bersani, A. Tomassetti, V. Colonna, M. Del Vecchio, F. De Braud, S. Canevari, A. Anichini and M. Sensi (2015). "A melanoma subtype with intrinsic resistance to BRAF inhibition identified by receptor tyrosine kinases gene-driven classification." *Oncotarget* 6(7): 5118-5133.

Eccles, M. R., S. He, A. Ahn, L. J. Slobbe, A. R. Jeffs, H. S. Yoon and B. C. Baguley (2013). "MITF and PAX3 Play Distinct Roles in Melanoma Cell Migration; Outline of a "Genetic Switch" Theory Involving MITF and PAX3 in Proliferative and Invasive Phenotypes of Melanoma." *Front Oncol* 3: 229.

Eisen, T., T. Ahmad, K. T. Flaherty, M. Gore, S. Kaye, R. Marais, I. Gibbens, S. Hackett, M. James, L. M. Schuchter, K. L. Nathanson, C. Xia, R. Simantov, B. Schwartz, M. Poulin-Costello, P. J. O'Dwyer and M. J. Ratain (2006). "Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis." *Br J Cancer* 95(5): 581-586.

Emery, C. M., K. G. Vijayendran, M. C. Zipser, A. M. Sawyer, L. Niu, J. J. Kim, C. Hatton, R. Chopra, P. A. Oberholzer, M. B. Karpova, L. E. MacConaill, J. Zhang, N. S. Gray, W. R. Sellers, R. Dummer and L. A. Garraway (2009). "MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(48): 20411-20416.

Eroglu, Z. and A. Ribas (2016). "Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy." *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 8(1): 48-56.

Fedorenko, I. V., E. V. Abel, J. M. Koomen, B. Fang, E. R. Wood, Y. A. Chen, K. J. Fisher, S. Iyengar, K. B. Dahlman, J. A. Wargo, K. T. Flaherty, J. A. Sosman, V. K. Sondak, J. L. Messina, G. T. Gibney and K. S. Smalley (2016). "Fibronectin induction abrogates the BRAF inhibitor response of BRAF V600E/PTEN-null melanoma cells." *Oncogene* 35(10): 1225-1235.

Fedorenko, I. V., K. H. Paraiso and K. S. Smalley (2011). "Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E mutant melanoma." *Biochem Pharmacol* 82(3): 201-209.

Flaherty, K. T., I. Puzanov, K. B. Kim, A. Ribas, G. A. McArthur, J. A. Sosman, P. J. O'Dwyer, R. J. Lee, J. F. Grippo, K. Nolop and P. B. Chapman (2010). "Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma." *N Engl J Med* 363(9): 809-819.

Fodstad, O., M. Aamdal S Fau - McMenamin, J. M. McMenamin M Fau - Nesland, A. Nesland Jm Fau - Pihl and A. Pihl (1988). "A new experimental metastasis model in athymic nude mice, the human malignant melanoma LOX." *Int J Cancer* 41(0020-7136 (Print)): 442-449.

Fragni, M., S. A. Bonini, P. Bettinsoli, S. Bodei, D. Generali, A. Bottini, P. F. Spano, M. Memo and S. Sigala (2016). "The miR-21/PTEN/Akt signaling pathway is involved in the anti-tumoral effects of zoledronic acid in human breast cancer cell lines." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 389(5): 529-538.

Freeman, A. K., D. A. Ritt and D. K. Morrison (2013). "The importance of Raf dimerization in cell signaling." *Small GTPases* 4(3): 180-185.

Fritsche-Guenther, R., F. Witzel, S. Kempa, T. Brummer, C. Sers and N. Bluthgen "Effects of RAF inhibitors on PI3K/AKT signalling depend on mutational status of the RAS/RAF signalling axis." (1949-2553 (Electronic)).

Fritsche-Guenther, R., F. Witzel, S. Kempa, T. Brummer, C. Sers and N. Blüthgen (2016). "Effects of RAF inhibitors on PI3K/AKT signalling depend on mutational status of the RAS/RAF signalling axis." *Oncotarget* 7(7): 7960-7969.

Gadaleta-Caldarola, G., R. Divella, A. Mazzocca, S. Infusino, E. Ferraro, G. Filippelli, A. Daniele, C. Sabbà, I. Abbate and M. Brandi (2015). "Sorafenib: the gold standard

therapy in advanced hepatocellular carcinoma and beyond." *Future Oncology* 11(16): 2263-2266.

Garay, T., I. Kenessey, E. Molnar, E. Juhasz, A. Reti, V. Laszlo, A. Rozsas, J. Dobos, B. Dome, W. Berger, W. Klepetko, J. Tovari, J. Timar and B. Hegedus (2015). "Prenylation inhibition-induced cell death in melanoma: reduced sensitivity in BRAF mutant/PTEN wild-type melanoma cells." *PLoS One* 10(2): e0117021.

Garnett, M. J., S. Rana, H. Paterson, D. Barford and R. Marais (2005). "Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization." *Mol Cell* 20(6): 963-969.

Garnock-Jones, K. P. (2015). "Cobimetinib: First Global Approval." *Drugs* 75(15): 1823-1830.

Gautschi, O., J. Milia, B. Cabarro, M. V. Bluthgen, B. Besse, E. F. Smit, J. Wolf, S. Peters, M. Fruh, D. Koeberle, Y. Oulhouir, M. Schuler, A. Curioni-Fontecedro, B. Huret, M. Kerjouan, S. Michels, G. Pall, S. Rothschild, G. Schmid-Bindert, M. Scheffler, R. Veillon, L. Wannesson, J. Diebold, G. Zalcman, T. Filleron and J. Mazieres (2015). "Targeted Therapy for Patients with BRAF-Mutant Lung Cancer: Results from the European EURAF Cohort." *J Thorac Oncol* 10(10): 1451-1457.

Girard, N. (2018). "Optimizing outcomes in EGFR mutation-positive NSCLC: which tyrosine kinase inhibitor and when?" *Future Oncology* 14(11): 1117-1132.

Girrotti, M. R., M. Pedersen, B. Sanchez-Laorden, A. Viros, S. Turajlic, D. Niculescu-Duvaz, A. Zambon, J. Sinclair, A. Hayes, M. Gore, P. Lorigan, C. Springer, J. Larkin, C. Jorgensen and R. Marais (2013). "Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma." *Cancer Discov* 3(2): 158-167.

Glitza, I. C. and M. A. Davies (2014). "Genotyping of cutaneous melanoma." *Chin Clin Oncol* 3(3): 27.

Greger, J. G., S. D. Eastman, V. Zhang, M. R. Bleam, A. M. Hughes, K. N. Smitheman, S. H. Dickerson, S. G. Laquerre, L. Liu and T. M. Gilmer (2012). "Combinations of BRAF, MEK, and PI3K/mTOR inhibitors overcome acquired resistance to the BRAF inhibitor GSK2118436 dabrafenib, mediated by NRAS or MEK mutations." *Mol Cancer Ther* 11(4): 909-920.

Gross, A., A. Niemetz-Rahn, A. Nonnenmacher, J. Tucholski, U. Keilholz and A. Fusi (2015). "Expression and activity of EGFR in human cutaneous melanoma cell lines and influence of vemurafenib on the EGFR pathway." *Targeted Oncology* 10(1): 77-84.

Guo, A., J. Villen, J. Kornhauser, K. A. Lee, M. P. Stokes, K. Rikova, A. Possemato, J. Nardone, G. Innocenti, R. Wetzel, Y. Wang, J. MacNeill, J. Mitchell, S. P. Gygi, J. Rush, R. D. Polakiewicz and M. J. Comb (2008). "Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(2): 692-697.

Hagen, B. and V. A. Trinh (2014). "Managing Side Effects of Vemurafenib Therapy for Advanced Melanoma." *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology* 5(6): 400-410.

Halaban, R. (2015). "RAC1 and melanoma." *Clin Ther* 37(3): 682-685.

Hantschel, O. (2015). "Unexpected off-targets and paradoxical pathway activation by kinase inhibitors." *ACS Chem Biol* 10(1): 234-245.

Hartman, M. L. and M. Czyz (2015). "MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity." *Cell Mol Life Sci* 72(7): 1249-1260.

Hassel, J. C., S. B. Lee, F. Meiss, F. Meier, A. Dimitrakopoulou-Strauss, D. Jager and A. H. Enk (2016). "Vemurafenib and ipilimumab: A promising combination? Results of a case series." *Oncoimmunology* 5(4): e1101207.

Hegedűs, B., J. Zách, A. Czirók, J. Lövey and T. s. Vicsek (2004). "Irradiation and Taxol Treatment Result in Non-Monotonous, Dose-Dependent Changes in the Motility of Glioblastoma Cells." *Journal of Neuro-Oncology* 67(1): 147-157.

Heidorn, S. J., C. Milagre, S. Whittaker, A. Nourry, I. Niculescu-Duvas, N. Dhomen, J. Hussain, J. S. Reis-Filho, C. J. Springer, C. Pritchard and R. Marais (2010). "Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF." *Cell* 140(2): 209-221.

Herkert, B., A. Kauffmann, S. Molle, C. Schnell, T. Ferrat, H. Voshol, J. Juengert, H. Erasmus, G. Marszalek, M. Kazic-Legueux, E. Billy, D. Ruddy, M. Stump, D. Guthy, M. Ristov, K. Calkins, S. M. Maira, W. R. Sellers, F. Hofmann, M. N. Hall and S. M. Brachmann (2016). "Maximizing the Efficacy of MAPK-Targeted Treatment in PTENLOF/BRAF^{MUT} Melanoma through PI3K and IGF1R Inhibition." *Cancer Res* 76(2): 390-402.

Hoeflich, K. P., S. Herter, J. Tien, L. Wong, L. Berry, J. Chan, C. O'Brien, Z. Modrusan, S. Seshagiri, M. Lackner, H. Stern, E. Choo, L. Murray, L. S. Friedman and M. Belvin (2009). "Antitumor efficacy of the novel RAF inhibitor GDC-0879 is predicted by BRAF^{V600E} mutational status and sustained extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway suppression." *Cancer Res* 69(7): 3042-3051.

Holderfield, M., M. M. Deuker, F. McCormick and M. McMahon (2014). "Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond." *Nat Rev Cancer* 14(7): 455-467.

Holderfield, M., H. Merritt, J. Chan, M. Wallroth, L. Tandeske, H. Zhai, J. Tellew, S. Hardy, M. Hekmat-Nejad, D. D. Stuart, F. McCormick and T. E. Nagel (2013). "RAF inhibitors activate the MAPK pathway by relieving inhibitory autophosphorylation." *Cancer Cell* 23(5): 594-602.

Hughes, P. E., S. Caenepeel and L. C. Wu (2016). "Targeted Therapy and Checkpoint Immunotherapy Combinations for the Treatment of Cancer." *Trends Immunol* 37(7): 462-476.

Hyman, D. M., I. Puzanov, V. Subbiah, J. E. Faris, I. Chau, J. Y. Blay, J. Wolf, N. S. Raje, E. L. Diamond, A. Hollebecque, R. Gervais, M. E. Elez-Fernandez, A. Italiano, R. D. Hofheinz, M. Hidalgo, E. Chan, M. Schuler, S. F. Lasserre, M. Makrutzki, F. Sirzen, M. L. Veronese, J. Taberero and J. Baselga (2015). "Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations." *N Engl J Med* 373(8): 726-736.

Ji, Z., Y. Erin Chen, R. Kumar, M. Taylor, C. N. Jenny Njauw, B. Miao, D. T. Frederick, J. A. Wargo, K. T. Flaherty, G. Jonsson and H. Tsao (2015). "MITF Modulates Therapeutic Resistance through EGFR Signaling." *J Invest Dermatol* 135(7): 1863-1872.

Johnson, D. B., E. Pectasides, E. Feld, F. Ye, S. Zhao, R. Johnpulle, R. Merritt, D. F. McDermott, I. Puzanov, D. Lawrence, J. A. Sosman, E. Buchbinder and R. J. Sullivan (2017). "Sequencing Treatment in BRAFV600 Mutant Melanoma: Anti-PD-1 Before and After BRAF Inhibition." *Journal of Immunotherapy* 40(1): 31-35.

Jones, J. C., L. A. Renfro, H. O. Al-Shamsi, A. B. Schrock, A. Rankin, B. Y. Zhang, P. M. Kasi, J. S. Voss, A. D. Leal, J. Sun, J. Ross, S. M. Ali, J. M. Hubbard, B. R. Kipp, R. R. McWilliams, S. Kopetz, R. A. Wolff and A. Grothey (2017). "(Non-V600) BRAF Mutations Define a Clinically Distinct Molecular Subtype of Metastatic Colorectal Cancer." *J Clin Oncol* 35(23): 2624-2630.

Joshi, M., S. J. Rice, X. Liu, B. Miller and C. P. Belani (2015). "Trametinib with or without vemurafenib in BRAF mutated non-small cell lung cancer." *PLoS One* 10(2): e0118210.

Jovanovic, B., S. Egyhazi, M. Eskandarpour, P. Ghiorzo, J. M. Palmer, G. Bianchi Scarra, N. K. Hayward and J. Hansson (2010). "Coexisting NRAS and BRAF mutations in

primary familial melanomas with specific CDKN2A germline alterations." *J Invest Dermatol* 130(2): 618-620.

Kelleher, F. C., G. Callaghan, C. Gallagher and H. O'Sullivan (2017). "BRAF inhibitor treatment of melanoma causing colonic polyps: An alternative hypothesis." *World J Gastroenterol* 23(17): 3022-3029.

Kim, A. and M. S. Cohen (2016). "The discovery of vemurafenib for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma." *Expert Opin Drug Discov* 11(9): 907-916.

Ladanyi, A., J. Timar, J. Bocsi, J. Tovari and K. Lapis (1995). "Sex-dependent liver metastasis of human melanoma lines in SCID mice." *Melanoma Res* 5(2): 83-86.

Ladanyi, A., J. Timar, S. Paku, G. Molnar and K. Lapis (1990). "Selection and characterization of human melanoma lines with different liver-colonizing capacity." *Int J Cancer* 46(3): 456-461.

Lai, F., C. C. Jiang, M. L. Farrelly, X. D. Zhang and P. Hersey (2012). "Evidence for upregulation of Bim and the splicing factor SRp55 in melanoma cells from patients treated with selective BRAF inhibitors." *Melanoma Res* 22(3): 244-251.

Levy, C., M. Khaled and D. E. Fisher (2006). "MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene." *Trends Mol Med* 12(9): 406-414.

Li, F. Z., A. S. Dhillon, R. L. Anderson, G. McArthur and P. T. Ferrao (2015). "Phenotype switching in melanoma: implications for progression and therapy." *Front Oncol* 5: 31.

Li, S. and P. De Souza (2011). "Ras Isoprenylation and pAkt Inhibition by Zoledronic Acid and Fluvastatin Enhances Paclitaxel Activity in T24 Bladder Cancer Cells." *Cancers (Basel)* 3(1): 662-674.

Li, Y., H. S. Cheng, W. J. Chng and V. Tergaonkar (2016). "Activation of mutant TERT promoter by RAS-ERK signaling is a key step in malignant progression of BRAF-mutant human melanomas." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(50): 14402-14407.

Lim, S. Y., A. M. Menzies and H. Rizos (2017). "Mechanisms and strategies to overcome resistance to molecularly targeted therapy for melanoma." *Cancer* 123(S11): 2118-2129.

Lin, W. M., A. C. Baker, R. Beroukhi, W. Winckler, W. Feng, J. M. Marmion, E. Laine, H. Greulich, H. Tseng, C. Gates, F. S. Hodi, G. Dranoff, W. R. Sellers, R. K. Thomas, M. Meyerson, T. R. Golub, R. Dummer, M. Herlyn, G. Getz and L. A. Garraway (2008). "Modeling genomic diversity and tumor dependency in malignant melanoma." *Cancer Res* 68(3): 664-673.

Litvak, A. M., P. K. Paik, K. M. Woo, C. S. Sima, M. D. Hellmann, M. E. Arcila, M. Ladanyi, C. M. Rudin, M. G. Kris and G. J. Riely (2014). "Clinical characteristics and course of 63 patients with BRAF mutant lung cancers." *J Thorac Oncol* 9(11): 1669-1674.

Liu, R., J. Bishop, G. Zhu, T. Zhang, P. W. Ladenson and M. Xing (2016). "Mortality Risk Stratification by Combining BRAF V600E and TERT Promoter Mutations in Papillary Thyroid Cancer: Genetic Duet of BRAF and TERT Promoter Mutations in Thyroid Cancer Mortality." *JAMA Oncol*.

Long, G. V., D. Stroyakovskiy, H. Gogas, E. Levchenko, F. de Braud, J. Larkin, C. Garbe, T. Jouary, A. Hauschild, J. J. Grob, V. Chiarion Sileni, C. Lebbe, M. Mandala, M. Millward, A. Arance, I. Bondarenko, J. B. Haanen, J. Hansson, J. Utikal, V. Ferraresi, N. Kovalenko, P. Mohr, V. Probachai, D. Schadendorf, P. Nathan, C. Robert, A. Ribas, D. J. DeMarini, J. G. Irani, M. Casey, D. Ouellet, A. M. Martin, N. Le, K. Patel and K. Flaherty (2014). "Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma." *N Engl J Med* 371(20): 1877-1888.

Macerola, E., B. Loggini, R. Giannini, G. Garavello, M. Giordano, A. Proietti, C. Niccoli, F. Basolo and G. Fontanini (2015). "Coexistence of TERT promoter and BRAF mutations in cutaneous melanoma is associated with more clinicopathological features of aggressiveness." *Virchows Arch* 467(2): 177-184.

Manca, A., A. Lissia, M. Capone, P. A. Ascierto, G. Botti, C. Caraco, I. Stanganelli, M. Colombino, M. Sini, A. Cossu and G. Palmieri (2015). "Activating PIK3CA mutations coexist with BRAF or NRAS mutations in a limited fraction of melanomas." *J Transl Med* 13: 37.

Mavrakis, K. J., H. Zhu, R. L. Silva, J. R. Mills, J. Teruya-Feldstein, S. W. Lowe, W. Tam, J. Pelletier and H. G. Wendel (2008). "Tumorigenic activity and therapeutic inhibition of Rheb GTPase." *Genes Dev* 22(16): 2178-2188.

Merat, R. (2017). "The Many Faces of the Paradoxical Response to BRAF Inhibitors." *Clinical Skin Cancer* 2(1-2): 39-43.

Molnar, E., D. Rittler, M. Baranyi, M. Grusch, W. Berger, B. Dome, J. Tovari, C. Aigner, J. Timar, T. Garay and B. Hegedus (2018). "Pan-RAF and MEK vertical inhibition enhances therapeutic response in non-V600 BRAF mutant cells." *BMC Cancer* 18(1): 542.

Montagut, C., S. V. Sharma, T. Shioda, U. McDermott, M. Ulman, L. E. Ulkus, D. Dias-Santagata, H. Stubbs, D. Y. Lee, A. Singh, L. Drew, D. A. Haber and J. Settleman (2008). "Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma." *Cancer Res* 68(12): 4853-4861.

Muller, J., O. Krijgsman, J. Tsoi, L. Robert, W. Hugo, C. Song, X. Kong, P. A. Possik, P. D. Cornelissen-Steijger, M. H. Geukes Foppen, K. Kemper, C. R. Goding, U. McDermott, C. Blank, J. Haanen, T. G. Graeber, A. Ribas, R. S. Lo and D. S. Peeper (2014). "Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma." *Nat Commun* 5: 5712.

Myall, N. J., J. W. Neal, C. D. Cho-Phan, L. Y. Zhou, H. Stehr, L. Zhou, M. Diehn and H. A. Wakelee (2016). "Long-Term Survival of a Patient With Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring a V600E Mutation in the BRAF Oncogene." *Clin Lung Cancer* 17(2): e17-21.

Nagaria, T. S., C. Shi, C. Leduc, V. Hoskin, S. Sikdar, W. Sangrar and P. A. Greer (2017). "Combined targeting of Raf and Mek synergistically inhibits tumorigenesis in triple negative breast cancer model systems." *Oncotarget* 8(46): 80804-80819.

Nathanson, K. L., A. M. Martin, B. Wubbenhorst, J. Greshock, R. Letrero, K. D'Andrea, S. O'Day, J. R. Infante, G. S. Falchook, H. T. Arkenau, M. Millward, M. P. Brown, A. Pavlick, M. A. Davies, B. Ma, R. Gagnon, M. Curtis, P. F. Lebowitz, R. Kefford and G. V. Long (2013). "Tumor genetic analyses of patients with metastatic melanoma treated with the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436)." *Clin Cancer Res* 19(17): 4868-4878.

Nazarian, R., H. Shi, Q. Wang, X. Kong, R. C. Koya, H. Lee, Z. Chen, M. K. Lee, N. Attar, H. Sazegar, T. Chodon, S. F. Nelson, G. McArthur, J. A. Sosman, A. Ribas and R. S. Lo (2010). "Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation." *Nature* 468(7326): 973-977.

Noeparast, A., P. Giron, S. De Brakeleer, C. Eggermont, U. De Ridder, E. Teugels and J. De Grève (2018). "Type II RAF inhibitor causes superior ERK pathway suppression compared to type I RAF inhibitor in cells expressing different BRAF mutant types recurrently found in lung cancer." *Oncotarget* 9(22): 16110-16123.

Noeparast, A., E. Teugels, P. Giron, G. Verschelden, S. De Brakeleer, L. Decoster and J. De Grève (2017). "Non-V600 BRAF mutations recurrently found in lung cancer predict sensitivity to the combination of Trametinib and Dabrafenib." *Oncotarget* 8(36): 60094-60108.

Obeid, J. M., G. Erdag, M. E. Smolkin, D. H. Deacon, J. W. Patterson, L. Chen, T. N. Bullock and C. L. Slingluff (2016). "PD-L1, PD-L2 and PD-1 expression in metastatic melanoma: Correlation with tumor-infiltrating immune cells and clinical outcome." *Oncoimmunology* 5(11): e1235107.

Obenauf, A. C., Y. Zou, A. L. Ji, S. Vanharanta, W. Shu, H. Shi, X. Kong, M. C. Bosenberg, T. Wiesner, N. Rosen, R. S. Lo and J. Massague (2015). "Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression." *Nature* 520(7547): 368-372.

Okimoto, R. A., L. Lin, V. Olivas, E. Chan, E. Markegard, A. Rymar, D. Neel, X. Chen, G. Hemmati, G. Bollag and T. G. Bivona "Preclinical efficacy of a RAF inhibitor that evades paradoxical MAPK pathway activation in protein kinase BRAF-mutant lung cancer." (1091-6490 (Electronic)).

Okimoto, R. A., L. Lin, V. Olivas, E. Chan, E. Markegard, A. Rymar, D. Neel, X. Chen, G. Hemmati, G. Bollag and T. G. Bivona (2016). "Preclinical efficacy of a RAF inhibitor that evades paradoxical MAPK pathway activation in protein kinase BRAF-mutant lung cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(47): 13456-13461.

Paik, P. K., M. E. Arcila, M. Fara, C. S. Sima, V. A. Miller, M. G. Kris, M. Ladanyi and G. J. Riely (2011). "Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations." *J Clin Oncol* 29(15): 2046-2051.

Paluncic, J., Z. Kovacevic, P. J. Jansson, D. Kalinowski, A. M. Merlot, M. L. Huang, H. C. Lok, S. Sahni, D. J. Lane and D. R. Richardson (2016). "Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling." *Biochim Biophys Acta* 1863(4): 770-784.

Paraiso, K. H., Y. Xiang, V. W. Rebecca, E. V. Abel, Y. A. Chen, A. C. Munko, E. Wood, I. V. Fedorenko, V. K. Sondak, A. R. Anderson, A. Ribas, M. D. Palma, K. L. Nathanson,

J. M. Koomen, J. L. Messina and K. S. Smalley (2011). "PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression." *Cancer Res* 71(7): 2750-2760.

Park, S. J., H. I. Cheong and J. I. Shin (2013). "Antibody depletion by bortezomib through blocking of antigen presentation." *N Engl J Med* 368(14): 1364-1365.

Pearlman, R. L., M. K. Montes de Oca, H. C. Pal and F. Afaq (2017). "Potential therapeutic targets of epithelial-mesenchymal transition in melanoma." *Cancer Lett* 391: 125-140.

Penna, I., A. Molla, G. Grazia, L. Cleris, G. Nicolini, F. Perrone, B. Picciani, M. Del Vecchio, F. de Braud, R. Mortarini and A. Anichini (2016). "Primary cross-resistance to BRAFV600E-, MEK1/2- and PI3K/mTOR-specific inhibitors in BRAF-mutant melanoma cells counteracted by dual pathway blockade." *Oncotarget* 7(4): 3947-3965.

Pervere, L. M., S. Rakshit, A. B. Schrock, V. A. Miller, S. M. Ali and V. Velcheti (2017). "Durable Response to Combination of Dabrafenib and Trametinib in BRAF V600E-Mutated Non-small-cell Lung Cancer." *Clin Lung Cancer* 18(3): e211-e213.

Planchard, D., B. Besse, H. J. M. Groen, P.-J. Souquet, E. Quoix, C. S. Baik, F. Barlesi, T. M. Kim, J. Mazieres, S. Novello, J. R. Rigas, A. Upalawanna, A. M. D'Amelio, P. Zhang, B. Mookerjee and B. E. Johnson (2016). "Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF V600E -mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial." *The Lancet Oncology* 17(7): 984-993.

Planchard, D., T. M. Kim, J. Mazieres, E. Quoix, G. Riely, F. Barlesi, P.-J. Souquet, E. F. Smit, H. J. M. Groen, R. J. Kelly, B. C. Cho, M. A. Socinski, L. Pandite, C. Nase, B. Ma, A. D'Amelio, B. Mookerjee, C. M. Curtis and B. E. Johnson (2016). "Dabrafenib in patients with BRAFV600E-positive advanced non-small-cell lung cancer: a single-arm, multicentre, open-label, phase 2 trial." *The Lancet Oncology* 17(5): 642-650.

Poulikakos, P. I., Y. Persaud, M. Janakiraman, X. Kong, C. Ng, G. Moriceau, H. Shi, M. Atefi, B. Titz, M. T. Gabay, M. Salton, K. B. Dahlman, M. Tadi, J. A. Wargo, K. T. Flaherty, M. C. Kelley, T. Misteli, P. B. Chapman, J. A. Sosman, T. G. Graeber, A. Ribas, R. S. Lo, N. Rosen and D. B. Solit (2011). "RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E)." *Nature* 480(7377): 387-390.

Prager, G. W., O. Koperek, M. E. Mayerhoefer, L. Muellauer, F. Wrba, B. Niederle, C. C. Zielinski and M. Raderer (2016). "Sustained Response to Vemurafenib in a BRAF(V600E)-Mutated Anaplastic Thyroid Carcinoma Patient." *Thyroid* 26(10): 1515-1516.

Prahallad, A., C. Sun, S. Huang, F. Di Nicolantonio, R. Salazar, D. Zecchin, R. L. Beijersbergen, A. Bardelli and R. Bernards (2012). "Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR." *Nature* 483(7387): 100-103.

Rahman, M. A., A. Salajegheh, R. A. Smith and A. K. Lam (2014). "BRAF inhibitors: From the laboratory to clinical trials." *Crit Rev Oncol Hematol* 90(3): 220-232.

Rebocho, A. P. and R. Marais (2013). "ARAF acts as a scaffold to stabilize BRAF:CRAF heterodimers." *Oncogene* 32(26): 3207-3212.

Richtig, G., E. Richtig, K. Kashofer, L. Koch, G. Winter, G. Hoefler, M. Pichler, B. Ehall, M. R. Grubler, A. Heinemann and A. Aigelsreiter (2017). "Testing and clinical implications for non-V600 BRAF mutations in metastatic NRAS(mt) melanoma." *Br J Dermatol* 177(3): 860-861.

Rizos, H., A. M. Menzies, G. M. Pupo, M. S. Carlino, C. Fung, J. Hyman, L. E. Haydu, B. Mijatov, T. M. Becker, S. C. Boyd, J. Howle, R. Saw, J. F. Thompson, R. F. Kefford, R. A. Scolyer and G. V. Long (2014). "BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: spectrum and clinical impact." *Clin Cancer Res* 20(7): 1965-1977.

Samatar, A. A. and P. I. Poulikakos (2014). "Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges." *Nat Rev Drug Discov* 13(12): 928-942.

Santarpia, L., S. M. Lippman and A. K. El-Naggar (2012). "Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 16(1): 103-119.

Sereno, M., V. Moreno, J. Moreno Rubio, C. Gomez-Raposo, S. Garcia Sanchez, R. Hernandez Jusdado, S. Falagan, F. Zambrana Tebar and E. Casado Saenz (2015). "A significant response to sorafenib in a woman with advanced lung adenocarcinoma and a BRAF non-V600 mutation." *Anticancer Drugs* 26(9): 1004-1007.

Seth, R., S. Crook, S. Ibrahim, W. Fadhil, D. Jackson and M. Ilyas (2009). "Concomitant mutations and splice variants in KRAS and BRAF demonstrate complex perturbation of the Ras/Raf signalling pathway in advanced colorectal cancer." *Gut* 58(9): 1234-1241.

Shah, M. H., L. Wei, L. J. Wirth, G. A. Daniels, J. A. D. Souza, C. D. Timmers, J. L. Sexton, M. Beshara, D. Nichols, N. Snyder, C. E. Devine, B. Konda and N. L. Busaidy (2017). "Results of randomized phase II trial of dabrafenib versus dabrafenib plus trametinib in BRAF-mutated papillary thyroid carcinoma." *Journal of Clinical Oncology* 35(15_suppl): 6022-6022.

Shi, H., W. Hugo, X. Kong, A. Hong, R. C. Koya, G. Moriceau, T. Chodon, R. Guo, D. B. Johnson, K. B. Dahlman, M. C. Kelley, R. F. Kefford, B. Chmielowski, J. A. Glaspy, J. A. Sosman, N. van Baren, G. V. Long, A. Ribas and R. S. Lo (2014). "Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy." *Cancer Discov* 4(1): 80-93.

Shirsat, N. V. and S. A. Shaikh (2003). "Overexpression of the immediate early gene fra-1 inhibits proliferation, induces apoptosis, and reduces tumourigenicity of c6 glioma cells." *Experimental Cell Research* 291(1): 91-100.

Smalley, K. S., M. Lioni, M. Dalla Palma, M. Xiao, B. Desai, S. Egyhazi, J. Hansson, H. Wu, A. J. King, P. Van Belle, D. E. Elder, K. T. Flaherty, M. Herlyn and K. L. Nathanson (2008). "Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas." *Mol Cancer Ther* 7(9): 2876-2883.

Smalley, K. S., M. Xiao, J. Villanueva, T. K. Nguyen, K. T. Flaherty, R. Letrero, P. Van Belle, D. E. Elder, Y. Wang, K. L. Nathanson and M. Herlyn (2009). "CRAF inhibition induces apoptosis in melanoma cells with non-V600E BRAF mutations." *Oncogene* 28(1): 85-94.

Smith, M. P., H. Brunton, E. J. Rowling, J. Ferguson, I. Arozarena, Z. Miskolczi, J. L. Lee, M. R. Girotti, R. Marais, M. P. Levesque, R. Dummer, D. T. Frederick, K. T. Flaherty, Z. A. Cooper, J. A. Wargo and C. Wellbrock (2016). "Inhibiting Drivers of Non-mutational Drug Tolerance Is a Salvage Strategy for Targeted Melanoma Therapy." *Cancer Cell* 29(3): 270-284.

Smith, M. P., E. J. Rowling, Z. Miskolczi, J. Ferguson, L. Spoerri, N. K. Haass, O. Sloss, S. McEntegart, I. Arozarena, A. von Kriegsheim, J. Rodriguez, H. Brunton, J. Kmarashev, M. P. Levesque, R. Dummer, D. T. Frederick, M. C. Andrews, Z. A. Cooper, K. T. Flaherty, J. A. Wargo and C. Wellbrock (2017). "Targeting endothelin receptor signalling overcomes heterogeneity driven therapy failure." *EMBO Mol Med* 9(8): 1011-1029.

Sullivan, R. J. and K. T. Flaherty (2013). "Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma." *Eur J Cancer* 49(6): 1297-1304.

Sun, C., L. Wang, S. Huang, G. J. Heynen, A. Prahallad, C. Robert, J. Haanen, C. Blank, J. Wesseling, S. M. Willems, D. Zecchin, S. Hobor, P. K. Bajpe, C. Liefink, C. Mateus, S. Vagner, W. Gernrum, I. Hofland, A. Schlicker, L. F. Wessels, R. L. Beijersbergen, A. Bardelli, F. Di Nicolantonio, A. M. Eggermont and R. Bernards (2014). "Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma." *Nature* 508(7494): 118-122.

Tai, W. M., W. P. Yong, C. Lim, L. S. Low, C. K. Tham, T. S. Koh, Q. S. Ng, W. W. Wang, L. Z. Wang, S. Hartano, C. H. Thng, H. Huynh, K. T. Lim, H. C. Toh, B. C. Goh and S. P. Choo (2016). "A phase Ib study of selumetinib (AZD6244, ARRY-142886) in combination with sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma (HCC)." *Ann Oncol* 27(12): 2210-2215.

Timar, J., B. Hegedus and E. Raso (2010). "KRAS Mutation Testing of Colorectal Cancer for Anti-EGFR Therapy: Dogmas Versus Evidence." *Current Cancer Drug Targets* 10(8): 813-823.

Tissot, C., S. Couraud, R. Tanguy, P. P. Bringuier, N. Girard and P. J. Souquet (2016). "Clinical characteristics and outcome of patients with lung cancer harboring BRAF mutations." *Lung Cancer* 91: 23-28.

Tulchinsky, E., J. H. Pringle, J. Caramel and S. Ansieau (2014). "Plasticity of melanoma and EMT-TF reprogramming." *Oncotarget* 5(1): 1-2.

Turski, M. L., S. J. Vidwans, F. Janku, I. Garrido-Laguna, J. Munoz, R. Schwab, V. Subbiah, J. Rodon and R. Kurzrock (2016). "Genomically Driven Tumors and Actionability across Histologies: BRAF-Mutant Cancers as a Paradigm." *Mol Cancer Ther* 15(4): 533-547.

Tutuka, C. S. A., M. C. Andrews, J. M. Mariadason, P. Ioannidis, C. Hudson, J. Cebon and A. Behren (2017). "PLX8394, a new generation BRAF inhibitor, selectively inhibits BRAF in colonic adenocarcinoma cells and prevents paradoxical MAPK pathway activation." *Mol Cancer* 16(1): 112.

Van Allen, E. M., N. Wagle, A. Sucker, D. J. Treacy, C. M. Johannessen, E. M. Goetz, C. S. Place, A. Taylor-Weiner, S. Whittaker, G. V. Kryukov, E. Hodis, M. Rosenberg, A. McKenna, K. Cibulskis, D. Farlow, L. Zimmer, U. Hillen, R. Gutzmer, S. M. Goldinger, S. Ugurel, H. J. Gogas, F. Egberts, C. Berking, U. Trefzer, C. Loquai, B. Weide, J. C. Hassel, S. B. Gabriel, S. L. Carter, G. Getz, L. A. Garraway, D. Schadendorf and G.

Dermatologic Cooperative Oncology Group of (2014). "The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma." *Cancer Discov* 4(1): 94-109.

Villanueva, J., A. Vultur, J. T. Lee, R. Somasundaram, M. Fukunaga-Kalabis, A. K. Cipolla, B. Wubbenhorst, X. Xu, P. A. Gimotty, D. Kee, A. E. Santiago-Walker, R. Letrero, K. D'Andrea, A. Pushparajan, J. E. Hayden, K. D. Brown, S. Laquerre, G. A. McArthur, J. A. Sosman, K. L. Nathanson and M. Herlyn (2010). "Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K." *Cancer Cell* 18(6): 683-695.

Volpe, V. O., D. M. Klufas, U. Hegde and J. M. Grant-Kels (2017). "The new paradigm of systemic therapies for metastatic melanoma." *J Am Acad Dermatol* 77(2): 356-368.

Vuong, H. G., A. M. A. Altibi, U. N. P. Duong and L. Hassell (2017). "Prognostic implication of BRAF and TERT promoter mutation combination in papillary thyroid carcinoma-A meta-analysis." *Clin Endocrinol (Oxf)* 87(5): 411-417.

Wagle, N., C. Emery, M. F. Berger, M. J. Davis, A. Sawyer, P. Pochanard, S. M. Kehoe, C. M. Johannessen, L. E. Macconail, W. C. Hahn, M. Meyerson and L. A. Garraway (2011). "Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling." *J Clin Oncol* 29(22): 3085-3096.

Wagle, N., E. M. Van Allen, D. J. Treacy, D. T. Frederick, Z. A. Cooper, A. Taylor-Weiner, M. Rosenberg, E. M. Goetz, R. J. Sullivan, D. N. Farlow, D. C. Friedrich, K. Anderka, D. Perrin, C. M. Johannessen, A. McKenna, K. Cibulskis, G. Kryukov, E. Hodis, D. P. Lawrence, S. Fisher, G. Getz, S. B. Gabriel, S. L. Carter, K. T. Flaherty, J. A. Wargo and L. A. Garraway (2014). "MAP kinase pathway alterations in BRAF-mutant melanoma patients with acquired resistance to combined RAF/MEK inhibition." *Cancer Discov* 4(1): 61-68.

Wan, P. T. C., M. J. Garnett, S. M. Roe, S. Lee, D. Niculescu-Duvaz, V. M. Good, C. G. Project, C. M. Jones, C. J. Marshall, C. J. Springer, D. Barford and R. Marais (2004).

"Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF." *Cell* 116(6): 855-867.

Wang, J., S. K. Huang, D. M. Marzese, S. C. Hsu, N. P. Kawas, K. K. Chong, G. V. Long, A. M. Menzies, R. A. Scolyer, S. Izraely, O. Sagi-Assif, I. P. Witz and D. S. B. Hoon (2015). "Epigenetic changes of EGFR have an important role in BRAF inhibitor-resistant cutaneous melanomas." *J Invest Dermatol* 135(2): 532-541.

Watson, I. R., L. Li, P. K. Cabeceiras, M. Mahdavi, T. Gutschner, G. Genovese, G. Wang, Z. Fang, J. M. Tepper, K. Stemke-Hale, K. Y. Tsai, M. A. Davies, G. B. Mills and L. Chin (2014). "The RAC1 P29S hotspot mutation in melanoma confers resistance to pharmacological inhibition of RAF." *Cancer Res* 74(17): 4845-4852.

Weeraratna, A. T. (2012). "RAF around the edges--the paradox of BRAF inhibitors." *N Engl J Med* 366(3): 271-273.

Wei, F., Y. Zhang, L. Geng, P. Zhang, G. Wang and Y. Liu (2015). "mTOR inhibition induces EGFR feedback activation in association with its resistance to human pancreatic cancer." *Int J Mol Sci* 16(2): 3267-3282.

Weiss, M. B., E. V. Abel, M. M. Mayberry, K. J. Basile, A. C. Berger and A. E. Aplin (2012). "TWIST1 is an ERK1/2 effector that promotes invasion and regulates MMP-1 expression in human melanoma cells." *Cancer Res* 72(24): 6382-6392.

Wellbrock, C. and I. Arozarena (2015). "Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy." *Pigment Cell Melanoma Res* 28(4): 390-406.

Wellbrock, C., M. Karasarides and R. Marais (2004). "The RAF proteins take centre stage." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(11): 875-885.

Wellbrock, C., S. Rana, H. Paterson, H. Pickersgill, T. Brummelkamp and R. Marais (2008). "Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF." *PLoS One* 3(7): e2734.

Welsh, S. J., H. Rizos, R. A. Scolyer and G. V. Long (2016). "Resistance to combination BRAF and MEK inhibition in metastatic melanoma: Where to next?" *Eur J Cancer* 62: 76-85.

White, P. S., A. Pudusseri, S. L. Lee and O. Eton (2017). "Intermittent Dosing of Dabrafenib and Trametinib in Metastatic BRAF(V600E) Mutated Papillary Thyroid Cancer: Two Case Reports." *Thyroid* 27(9): 1201-1205.

Whittaker, S. R., J. P. Theurillat, E. Van Allen, N. Wagle, J. Hsiao, G. S. Cowley, D. Schadendorf, D. E. Root and L. A. Garraway (2013). "A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition." *Cancer Discov* 3(3): 350-362.

Won, J. K., H. W. Yang, S. Y. Shin, J. H. Lee, W. D. Heo and K. H. Cho (2012). "The crossregulation between ERK and PI3K signaling pathways determines the tumoricidal efficacy of MEK inhibitor." *J Mol Cell Biol* 4(3): 153-163.

Wong, K.-K., D. Gershenson and C.-C. Tsai (2015). "BRAF mutational analysis in ovarian tumors: recent perspectives." *Pathology and Laboratory Medicine International*: 75.

Wongchenko, M. J., A. Ribas, B. Dreno, P. A. Ascierto, G. A. McArthur, J. D. Gallo, I. A. Rooney, J. Hsu, H. Koeppen, Y. Yan and J. Larkin (2017). "Association of programmed death ligand-1 (PD-L1) expression with treatment outcomes in patients with BRAF mutation-positive melanoma treated with vemurafenib or cobimetinib combined with vemurafenib." *Pigment Cell Melanoma Res.*

Wood, K. and J. J. Luke (2016). "Optimal Use of BRAF Targeting Therapy in the Immunotherapy Era." *Curr Oncol Rep* 18(11): 67.

Xing, M., R. Liu, X. Liu, A. K. Murugan, G. Zhu, M. A. Zeiger, S. Pai and J. Bishop (2014). "BRAF V600E and TERT promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with highest recurrence." *J Clin Oncol* 32(25): 2718-2726.

Yadav, V., S. H. Chen, Y. G. Yue, S. Buchanan, R. P. Beckmann and S. B. Peng (2015). "Co-targeting BRAF and cyclin dependent kinases 4/6 for BRAF mutant cancers." *Pharmacol Ther* 149: 139-149.

Yeh, T. C., V. Marsh, B. A. Bernat, J. Ballard, H. Colwell, R. J. Evans, J. Parry, D. Smith, B. J. Brandhuber, S. Gross, A. Marlow, B. Hurley, J. Lyssikatos, P. A. Lee, J. D. Winkler, K. Koch and E. Wallace (2007). "Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor." *Clin Cancer Res* 13(5): 1576-1583.

Yoshida, A., E. K. Lee and J. A. Diehl (2016). "Induction of Therapeutic Senescence in Vemurafenib-Resistant Melanoma by Extended Inhibition of CDK4/6." *Cancer Res* 76(10): 2990-3002.

Yu, H., R. McDaid, J. Lee, P. Possik, L. Li, S. M. Kumar, D. E. Elder, P. Van Belle, P. Gimotty, M. Guerra, R. Hammond, K. L. Nathanson, M. Dalla Palma, M. Herlyn and X. Xu (2009). "The role of BRAF mutation and p53 inactivation during transformation of a subpopulation of primary human melanocytes." *Am J Pathol* 174(6): 2367-2377.

Yuen, J. S., M. Y. Sim, H. G. Sim, T. W. Chong, W. K. Lau, C. W. Cheng, R. W. Ong and H. Huynh (2012). "Combination of the ERK inhibitor AZD6244 and low-dose sorafenib in a xenograft model of human renal cell carcinoma." *Int J Oncol* 41(2): 712-720.

Zekri, J., M. Mansour and S. M. Karim (2014). "The anti-tumour effects of zoledronic acid." *J Bone Oncol* 3(1): 25-35.

Zhang, W. (2015). "BRAF inhibitors: the current and the future." *Curr Opin Pharmacol* 23: 68-73.

Zheng, G., L. H. Tseng, G. Chen, L. Haley, P. Illei, C. D. Gocke, J. R. Eshleman and M. T. Lin (2015). "Clinical detection and categorization of uncommon and concomitant mutations involving BRAF." *BMC Cancer* 15: 779.

Zito, C. R., L. B. Jilaveanu, V. Anagnostou, D. Rimm, G. Bepler, S. M. Maira, W. Hackl, R. Camp, H. M. Kluger and H. H. Chao (2012). "Multi-level targeting of the phosphatidylinositol-3-kinase pathway in non-small cell lung cancer cells." *PLoS One* 7(2): e31331.

Zou, M., E. Y. Baitei, A. S. Alzahrani, F. S. BinHumaid, D. Alkhafaji, R. A. Al-Rijjal, B. F. Meyer and Y. Shi (2014). "Concomitant RAS, RET/PTC, or BRAF mutations in advanced stage of papillary thyroid carcinoma." *Thyroid* 24(8): 1256-1266.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

10.1 Disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

Molnar, E., D. Rittler, M. Baranyi, M. Grusch, W. Berger, B. Dome, J. Tovari, C. Aigner, J. Timar, T. Garay and B. Hegedus (2018). "Pan-RAF and MEK vertical inhibition enhances therapeutic response in non-V600 BRAF mutant cells." *BMC Cancer* 18(1): 542.

Garay, T., I. Kenessey, **E. Molnar**, E. Juhasz, A. Reti, V. Laszlo, A. Rozsas, J. Dobos, B. Dome, W. Berger, W. Klepetko, J. Tovari, J. Timar and B. Hegedus (2015). "Prenylation inhibition-induced cell death in melanoma: reduced sensitivity in BRAF mutant/PTEN wild-type melanoma cells." *PLoS One* 10(2): e0117021.

10.2 Disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk:

1. Špírek, M., J. Mlcoušková, O. Belán, M. Gyimesi, G. M. Harami, **E. Molnár**, J. Novacek, M. Kovács and L. Krejci (2018). "Human RAD51 rapidly forms intrinsically dynamic nucleoprotein filaments modulated by nucleotide binding state." *Nucleic acids research* 46(8): 3967-3980.

2. Hegedus, L., T. Garay, **E. Molnar**, K. Varga, A. Bilecz, S. Torok, R. Padanyi, K. Paszty, M. Wolf, M. Grusch, E. Kallay, B. Dome, W. Berger, B. Hegedus and A. Enyedi (2017). "The plasma membrane Ca(2+) pump PMCA4b inhibits the migratory and metastatic activity of BRAF mutant melanoma cells." *Int J Cancer* 140(12): 2758-2770.

3. Tátrai, E., A. Barta, A. Gacs, S. Paku, I. Kenessey, T. Garay, B. Hegedus, **E. Molnár**, M. T. Cserepes, Z. Hegedus, N. Kucsma, G. Szakács and J. Tóvári (2017). "Cell type-dependent HIF1 α -mediated effects of hypoxia on proliferation, migration and metastatic potential of human tumor cells." *Oncotarget* 8(27): 44498-44510.

4. Garay, T*., **E. Molnár***, É. Juhász, V. László, T. Barbai, J. Dobos, K. Schelch, C. Pirker, M. Grusch, W. Berger, J. Tímár and B. Hegedűs (2015). "Sensitivity of Melanoma Cells to EGFR and FGFR Activation but Not Inhibition is Influenced by Oncogenic BRAF and NRAS Mutations." *Pathology & Oncology Research* 21(4): 957-968.

5. Garay, T., E. Juhasz, **E. Molnar**, M. Eisenbauer, A. Czirok, B. Dekan, V. Laszlo, M. A. Hoda, B. Dome, J. Timar, W. Klepetko, W. Berger and B. Hegedus (2013). "Cell migration or cytokinesis and proliferation?--revisiting the "go or grow" hypothesis in cancer cells in vitro." *Exp Cell Res* 319(20): 3094-3103.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Doktori munkám alatt rengeteg segítséget és támogatást kaptam, amiért köszönettel tartozom. Elsősorban Dr. Hegedűs Balázsnak, témavezetőmnek a közvetlen szakmai irányításért és a sok támogatásért, amit mind szakmailag mind emberileg kaptam tőle. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Tímár Józsefnek, aki biztosította a munkához szükséges háttérrel. Hálával és köszönettel tartozom a munkacsoportunk minden jelenlegi és volt dolgozójának Dr. Garay Tamásnak, Baranyi Marcellnek, Rittler Dominikának, Gaál Anikónak és Dr. Bilecz Ágnesnek, akik biztosították azt a szakmailag inspiráló és baráti hangulatú légkört, ahol mindig öröm volt dolgozni. Köszönök minden segítséget a II. számú Patológiai Intézet dolgozóinak. Külön köszönettel tartozom a Kalcium munkacsoport tagjainak, elsősorban Szendefyné Lőr Krisztinának az immunblot esszékhez nyújtott segítségével, és hogy mindig készségesen rendelkezésünkre állt a rengeteg felmerülő kérdés megválaszolásában. Köszönök Dr. Tóvári Józsefnek, Hídvégi Anitának és Bodrogi-Mayer Irénnek az Országos Onkológiai Intézetből, akik nélkülözhetetlen segítséget nyújtottak az állatkísérletekhez. Köszönök Karianne Risberg-et és Oystein Fodstadt-ot az Institute for Cancer Research Oslo University Hospitalból, és Marco Donia-t az University of Copenhagen Herlev Hospitalból, amiért rendelkezésünkre bocsátották a melanóma sejtvonal párokat. A PhD képzésem alatt egy négy hónapos bécsi tanulmányúton is részt vehettem a Bécsi Orvostudományi Egyetemen, amiért külön köszönettel tartozom a fogadó intézményben dolgozó témavezetőmnek Dr. Michael Grushnak és kollégáinak. Köszönöm továbbá minden szerzőtársamnak, hogy munkájával hozzájárult publikációink elkészüléséhez.

Végül, de nem utolsósorban hálás köszönettel tartozom szüleimnek, családomnak, páromnak és barátaimnak a rengeteg támogatásért és áldozatért, ami nélkül ez a munka nem készülhetett volna el.