

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

Doktori tézisek

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. Kőhidai László, PhD, egyetemi docens
Dr. Vellainé Takács Krisztina, PhD,
egyetemi docens

Budapest
2018

1. BEVEZETŐ

A BRAF aminosav cserélődéssel járó mutációi számos daganattípusban előfordulnak. A szolid daganatok közül gyakori melanómában (40-60%), pajzsmirigyrákban, (30-80%), kolorektális tumorokban, (5-15 %), ovárium daganatokban (10-60%) és tüdő adenokarcinómában (2-3%). A BRAF mutációi közül leggyakrabban a V600E mutáció fordul elő. Azonban bizonyos tumor típusokban (melanóma, tüdő adenokarcinóma, kolorektális daganatok) a nem-V600 BRAF mutációk jelentősége sem elhanyagolható. A V600 BRAF mutáns daganatok ellen már létezik célzott terápia, azonban a fellépő rezisztencia mechanizmusok miatt a betegek teljes túlélésének jelentős javítása még nem valósult meg. A nem-V600 BRAF mutációt hordozó szolid tumorok kezelésére jelenleg nem létezik célzott terápia. PhD munkám során a BRAF mutáns szolid tumorok célzott terápia érzékenységét meghatározó molekuláris faktorokat vizsgáltam. Dolgozatomban három vizsgálat eredményeit dolgozom fel részletesen: elsőként a V600E BRAF mutáció mellett PTEN társ- mutációt hordozó melanómák egy lehetséges, preniláció-gátláson alapuló terápiás lehetőségét mutatom be, majd a vemurafenibre (specifikus V600E BRAF mutációt célzó inhibitor) érzékeny valamint rezisztens melanóma sejtvonal párokon a rezisztencia kialakulása során fellépő molekuláris és fenotípusos változásokat térképezem fel. Végül nem-V600 BRAF mutációt hordozó szolid tumorok preklinikai modelljein a pan-RAF és a MEK kombinált gátlásának tumor ellenes hatását vizsgáló kísérleteink

eredményeit ismertetem. Eredményeink hozzájárulhatnak a BRAF mutáns szolid tumoros betegek terápiájának optimalizálásához.

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 tumorelles 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 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 tumorellenes hatásának vizsgálata.

3. MÓDSZEREK

3.1. Sejtvonalak

Tíz melanóma, két tüdő adenokarcinoma és egy emlő eredetű sejtvonalat, valamint hat vemurafenibbel hosszú távon kezelt melanóma sejtvonal párt használtunk kísérleteink során.

3.2 Gátlószer

A kísérletek során a preniláció gátlására zoledronsavat, V600E BRAF gátlására vemurafenibet, a MEK gátlására selumetinibet, a RAF fehérjék gátlására sorafenibet és AZ628 vegyületet, az EGFR gátlására erlotinibet, a PI3K/mTOR kettős gátlására pedig a BEZ235 molekulát használtunk fel.

3.3 Életképességi tesztek

A letapadó sejtkultúrákat kezelés után 4% triklórecetsavval fixáltuk. A teljes fehérje mennyiséget SRB festés segítségével kolorimetrikusan meghatároztuk, majd a kapott adatokból következtettünk a sejtek életképességére. Két inhibitor gátló hatása közti szinergia meglétét

kombinációs index segítségével állapítottuk meg. A kombinációs indexet a Chou-Talalay módszerrel, a CompuSyn program segítségével számoltuk ki.

3.4 Videomikroszkópos mérések

A sejtek migrációjának mérését sejt kultúrákról készült fáziskontraszt mikroszkóppal készített felvételek alapján végeztük el.

3.5 TUNEL esszé

Paraformaldehid fixált sejteken végzett TUNEL festés segítségével azonosítottuk az apoptotikus sejteket.

3.6 Immunblot

Az Erk1/2, S6, Akt, CRAF fehérjék aktivációját valamint az EGFR, PTEN fehérjék szintjét és PARP/hasított PARP fehérjék mennyiségét immunblot analízissel határoztuk meg.

3.7 Sejtciklus vizsgálatok

A sejtek sejtciklus arányainak változását Nucleocounter készülék segítségével mértük meg.

3.8 Kvantitatív PCR

Totál RNS izolálást követően reverz transzkripciót végeztünk, majd kvantitatív valós idejű PCR segítségével meghatároztuk a hosszú távon vemurafenibbel kezelt melanóma sejtvonal párokban az Epiteiális-Mezenchimális Átmenet (EMT) markerek, immun checkpoint fehérjék és a MITF és FRA-1 transzkripciós faktorok mRNS expresszióját.

3.9 *In vivo* ortotopikus xenograft modell

A sorafenib és selumetinib kombinációs kezelés hatásának *in vivo* vizsgálatához humán emlő sejteket injektáltunk nőstény NSG egerek emlőjébe, majd napi intraperitoneális kezeléseket követően a tumor térfogatát meghatároztuk. Az egerek eutanizálása után a tumorokat kioperáltuk és tömegüket megmértük.

3.10 Statisztikai analízis

Minden statisztikai analízist a GraphPad Prism 5 programmal végeztünk el.

4. EREDMÉNYEK

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

A vizsgálat során felhasznált hét V600E BRAF mutáns melanóma sejt vonal PTEN expresszióját immunblot módszerrel határoztuk meg. Az életképességi tesztet mind rövid (72 óra), mind hosszú távon (10 nap) elvégeztük. A rövid távú életképességi tesztek eredményei azt mutatták, hogy a csak BRAF mutációt hordozó sejtek a vemurafenibre, míg a BRAF mutáns és a PTEN fehérjét nem vagy csökkent szinten expresszáló sejtek a zoledronsavra voltak érzékenyebbek. A hosszú távú életképességi esszék eredményei is megerősítették a rövid távú esszék eredményeit. A sejteken apoptózis vizsgálatot is végeztünk TUNEL és hasított PARP immunblot esszé segítségével. Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a zoledronsav kezelés a BRAF mutáns és PTEN fehérjét nem vagy kis mértékben expresszáló sejtekben apoptózist indukálhat. A fenti eredményeket további hat vemurafenibbel hosszú távon kezelt V600E BRAF mutáns melanóma sejt vonal páron is megerősítettük.

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. Első lépésben megvizsgáltuk a sejtek vemurafenib IC50 értékét. 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. A sejtvonal párok proliferációs képességét SRB esszé segítségével határoztuk meg. A hat sejtvonal párból négyben a kezelés utáni sejtekben csökkent (Mel KD, Mel JL, MM90911, MM040111), míg két párnál (Mel JR, MM90906) nőtt a proliferáció. A sejtvonal párok migrációs képességét videomikroszkópos módszerrel vizsgáltuk. Minden sejtvonal pár esetében megnőtt a kezelés utáni sejtekben a migrációs képesség. Következő lépésben a megnövekedett migrációs képesség molekuláris hátterét szeretnénk volna felderíteni. Kvantitatív PCR segítségével vizsgáltuk különböző klasszikus EMT markerek (SNAIL, MMP-3, MMP-1, ZEB-1, vimentin, N-cadherin, E-cadherin) transzkripció faktorok (MITF, FRA-1), növekedési faktor receptorok (EGFR) és immun checkpoint fehérjék (PDL-1, PD-1, PDL-2, B7-1) mRNS szintjének változásait a sejtvonal párokban. 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. Azonban az egyes sejtvonal párok nem mutattak egységes mintázatot a vizsgált faktorok mennyiségi változásában. E-cadherin mRNS expressziót nem találtunk egyik sejtben sem. Az immun checkpoint fehérjék közül a PD-L1 mRNS szintje növekedett, nem változott vagy csökkent, míg a PD-L2 mRNS szintjének csökkenése vagy növekedése volt megfigyelhető a sejtvonal párokban. A vizsgált faktorok mRNS expressziós szintjeit összevetettük a migrációs és proliferációs képességgel (Spearman-korreláció). A migrációval a MITF transzkripciós faktor, míg a proliferációval a FRA-1 transzkripciós faktor mutatott negatív korrelációt. Az EGFR mRNS szintje a MITF mRNS expressziójával negatív, míg a FRA-1 mRNS expressziójával pozitív korrelációt mutatott. Továbbá negatív korrelációt találtunk a MITF és a FRA-1 mRNS szintje között. Megvizsgáltuk az Akt aktiváció és a PTEN expresszió valamint az Erk aktiváció és EGFR expresszió közti összefüggést is. Azt találtuk, hogy a PTEN fehérjét csökkentett mennyiségben tartalmazó sejtekben az Akt aktiváció szignifikánsan nagyobb, mint a PTEN-t expresszáló sejtekben. Továbbá, az alacsony EGFR-szintű sejtekben az Erk aktiváció szignifikánsan kisebbnek adódott, mint az EGFR-t magas szinten expresszáló sejtekben. Az EGFR fehérje expresszióját a sejtek IC50 értékének függvényében is megvizsgáltuk. A vemurafenibre szenzitív sejtek ($IC_{50} < 3 \mu M$) alacsony, míg a rezisztens sejtek ($IC_{50} > 3 \mu M$) többnyire magas szinten fejezték ki

az EGFR-t. Mivel az EGFR szint az Erk aktivációval pozitív, míg a PTEN szint az Akt aktivációval negatív korrelációt mutatott, teszteltük az EGFR-inhibitor erlotinib és PI3K/mTOR kettős inhibitor BEZ235 hatását a sejtvonal párokon. Érdekes módon, az EGFR-t kis mértékben expresszáló vonalak mutattak nagyobb érzékenységet az erlotinibre. A PTEN expresszió nem mutatott jelentős összefüggést a BEZ235 érzékenységgel, mindegyik sejtvonalban nagymértékben gátolta a növekedést a gátlószer. Továbbá a BEZ235 és erlotinib kombinációs kezelés a tumor növekedést a legtöbb kezelési koncentrációban szinergista vagy additív módon gátolta.

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 elemeztük a RAF és MEK kombinált gátlásának hatását. Általános RAF-inhibitoroként sorafenibet, MEK-inhibitoroként selumetinibet használtunk. Mivel a sorafenib pan-RAF gátló hatása mellett más kinázokat is gátolhat ezért egy specifikusabb pan-RAF inhibitorral, az AZ628 nevű vegyülettel is elvégeztük az életképességi és apoptózis indukciót vizsgáló kísérleteket. A szinergista gátló hatás vizsgálatához a sejteket selumetinib és sorafenib/AZ628 kombinációjával kezeltük, majd Compusyn program segítségével számoltuk ki a kombinációs index (CI) értékeket. Minden sejtvonal esetén 1-nél kisebb

CI értéket kaptunk, tehát a pan-RAF és MEK-gátlószer között szinergista hatás áll fent a vizsgált nem-V600 BRAF mutáns sejtvonalak esetében. A sejtciklus analízis során kimutattuk, hogy a sejtek a G0/G1 fázisban rekednek meg a kombinációs kezelés hatására. A selumetinib és sorafenib kombinációs gátlás CRAF, Erk1/2, Akt és S6 expressziójára és aktivációra gyakorolt hatását immunblot esszével vizsgáltuk. A p-Erk1/2 szintje 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 deaktiválást okozott. A kombinációs kezelés hatására a WM3629 és CRL5922 sejtvonalakban a p-Akt szint megemelkedett, míg a többi sejtvonalban csökkent vagy nem változott a kontrollhoz képest. A p-S6 szint csökkent vagy nem változott a sejtvonalakban a kombinációs kezelésre. Érdekes módon a WM3629 és a WM3670 melanóma vonalakban az egyes selumetinib kezelés az Akt aktivációját okozta. Továbbá a WM3629 sejtvonalban a migráció is megnövekedett a selumetinib kezelés hatására. A kombinációs kezelés minden esetben csökkentette a sejtek migrációs képességét, azonban nem okozott szignifikánsan nagyobb hatást, mint az egyes kezelések. Az apoptózis tesztek eredményei alapján elmondhatjuk, hogy a pan-RAF és MEK kombinált gátlása növeli az apoptotikus sejtek arányát az egyes kezelésekhez képest. Meghatároztuk a selumetinib és sorafenib kombinációs kezelés hatását 14 hetes NSG egerek MDAMB231

sejtvonallal oltott ortotopikus modelljében is. 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. A nagyobb tumor csökkentő hatás a DMSO kontroll és a sorafenib csoporthoz viszonyítva szignifikáns volt a kombinációs csoportban, míg a selumetinib csoporthoz viszonyítva a különbség nem adódott szignifikánsnak.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

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

1. A V600E BRAF mutáns és PTEN fehérjét nem vagy csak kis mértékben termelő melanóma sejtekben a zoledronsav kezelés növekedésgátló és apoptózist indukáló hatást mutatott. Ezzel szemben a V600E BRAF mutáns és normális PTEN szintű sejtek esetében nem tapasztaltunk jelentős tumorelles hatást a zoledronsav kezelés során.

2. Az általunk vizsgált V600E BRAF mutáns hosszú távú vemurafenib kezelés előtti és utáni melanóma sejtvonal párokban a sejtek migrációs képessége növekedett, míg növekedésük 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 tumorelles választ mutatott.

3. A nem-V600 BRAF mutációt hordozó szolid daganatok (melanóma, tüdő, emlő sejtvonalak) preklinikai modelljein a RAF (sorafenib, AZ628) és a MEK (selumetinib) kombinációs gátlás fokozott tumorelles hatást mutatott az egykomponensű kezelések hatásához képest.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1 Disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

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

IF=3.288

Garay T, Kenessey I, **Molnar E**, Juhasz E, Reti A, Laszlo V, Rozsas A, Dobos J, Dome B, Berger W, Klepetko W, Tovari J, Timar J, Hegedus B Prenylation Inhibition-Induced Cell Death in Melanoma: Reduced Sensitivity in BRAF Mutant/PTEN Wild-Type Melanoma Cells. PLOS ONE 10:(2) Paper e0117021. 18 p. (2015)

IF=3.057

6.2 Disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk:

1. Spirek M, Mlcouskova J, Belan O, Gyimesi M, Harami GM, **Molnar E**, Novacek J, Kovacs M, Krejci L Human RAD51 rapidly forms intrinsically dynamic nucleoprotein filaments modulated by nucleotide binding state. NUCLEIC ACIDS RESEARCH epub ahead of print Feb 22: p. 1. (2018)

IF=11.561

2. Hegedűs L, Garay T, **Molnár E**, Varga K, Bilecz A, Török S, Padányi R, Pászty K, Wolf M, Grusch M, Kállay E, Döme B, Berger W, Hegedűs B, Enyedi A The plasma membrane Ca²⁺ pump PMCA4b inhibits the migratory and metastatic activity of BRAF mutant melanoma cells INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER 140:(12) pp. 2758-2770. (2017)
IF=7.360

3. Tatrai E, Bartal A, Gacs A, Paku S, Kenessey I, Garay T, Hegedus B, **Molnar E**, Cserepes MT, Hegedus Z, Kucsma N, Szakacs G, Tovari J Cell type-dependent HIF1 alpha-mediated effects of hypoxia on proliferation, migration and metastatic potential of human tumor cells ONCOTARGET 8: pp. 44498-44510. (2017)
IF=0

4. Garay T*, **Molnar E***, Juhasz E, Laszlo V, Barbai T, Dobos J, Schelch K, Pirker C, Grusch M, Berger W, Timar J, Hegedus B Sensitivity of Melanoma Cells to EGFR and FGFR Activation but Not Inhibition is Influenced by Oncogenic BRAF and NRAS Mutations PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 21:(4) pp. 957-968. (2015)
IF=1.94

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

IF=3.378