

BRAF mutáns tumorok gátlása: a PI3K jelátvitel szerepe és kombinációs terápiák

Doktori értekezés

dr. Rittler Dominika

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Hegedűs Balázs, PhD, tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Vas Virág, PhD, tudományos főmunkatárs
Dr. Kőhidai László, PhD, egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Ligeti Erzsébet, MTA rendes tagja, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Moldvay Judit, PhD, tudományos főmunkatárs
Dr. Budai Barna, PhD, tudományos főmunkatárs

Budapest
2020

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	9
1.1 A RAS/RAF jelpálya legfontosabb elemei és onkogén mutációi.....	10
1.1.1 A RAS/RAF jelpálya működése	10
1.1.2 A RAS fehérjecsald és onkogén mutációi	12
1.1.3 RAS mutáns daganatok lehetséges terápiás megközelítései	13
1.1.4 RAF (BRAF) fehérje, mutációi és terápiák	15
1.1.5 A BRAF mutáció szerepe és célzott terápiája melanómában.....	16
1.1.6 A BRAF mutáció szerepe a tüdő-, vastagbél-, és pajzsmirigyrákban és a terápiás lehetőségek.....	17
1.1.7 A RAS/RAF jelpálya egyéb fehérjéinek mutációi és terápiás lehetőségek...	19
1.2 PI3K/Akt jelpálya fontosabb elemei, mutációik és szerepük a daganatos megbetegedésekben	20
1.2.1 PI3K/Akt jelpálya működése.....	20
1.2.2 PI3K és PTEN fehérjék daganatokban betöltött szerepe.....	21
1.2.3 További fontos fehérjék a PI3K/Akt jelpályán, mutációik és lehetséges támadáspontok.....	22
1.3 A két jelpálya egymás közötti kommunikációja; a horizontális és vertikális kombinációs terápiák	23
2. Célkitűzések	26
3. Módszerek	27
3.1 Sejtvonalak	27
3.2 Kezelőanyagok	28
3.3 Rövidtávú életképességi (SRB) teszt.....	30
3.4 Hosszútávú klonogenitási teszt.....	30
3.5 Kombinációs kezelések és a kombinációs index (CI)	31
3.6 Háromdimenziós (3D) szferoid vizsgálatok	31
3.7 Sejtmozgás vizsgálat.....	32
3.8 Immunoblot vizsgálatok	33
3.9 Sejtciklus vizsgálatok	34
3.10 <i>In vivo</i> kísérletek.....	34

3.11 Statisztika.....	35
4. Eredmények	36
4.1 MEK és PI3K/mTOR egyidejű gátlásának vizsgálata BRAF és BRAF+PI3K/PTEN mutációt hordozó sejtvonalakon	36
4.1.1 Selumetinib és BEZ235 életképességre kifejtett hatásának vizsgálata rövid- és hosszútávon	36
4.1.2 A hosszútávú kombinációs kezelés hatása	38
4.1.3 Kettős mutáns sejtek egymáshoz viszonyított fehérje alapaktivációs szintje	40
4.1.4 Egyszeres és kombinációs kezelés apoptózis indukcióra, proliferációra, valamint jelátviteli fehérjék aktivitására kifejtett hatásának vizsgálata	41
4.1.5 Kezelőanyagok egyszeres és kombinációs hatásának vizsgálata 3D szferoid növekedés méréssel	43
4.1.6 Kombinációs kezelés tesztelése <i>in vivo</i> kísérletben SW1417 sejtvonalon....	46
4.2 Egy újonnan alapított BRAF mutáns anaplasztikus pajzsmirigy-rák sejtvonal (PF49) vizsgálata	47
4.2.1 Betegtörténet és sejtvonal karakterizálás.....	48
4.2.2 RAS/RAF útvonal egyedüli és kombinációs gátlásának hatása a PF49 sejt életképességére	48
4.2.3 A PF49 sejtvonal alapmotilitása és annak gátlási lehetőségei.....	50
4.3 A lipofil biszfoszfonát BPH tumorellenes hatása melanóma sejtvonalakon.....	51
4.3.1 A lipofil BPH és a hidrofil ZA melanóma sejtek életképességére kifejtett hatásának vizsgálata rövid- és hosszútávon	52
4.3.2 Sejtciklus eloszlás változás 72 óra alatt ZA és BPH kezelés hatására	55
4.3.3 Biszfoszfonátokkal való kezelés apoptózis indukáló hatásának vizsgálata sejtciklus eloszlás elemzés és western blot segítségével	57
4.3.4 Preniláció gátlás hatása az Erk, Akt, S6 és Rheb fehérjék aktivációjára.....	58
4.3.5 A sejtek alap motilitása meghatározza az BPH kezeléssel szembeni érzékenységüket a mozgás gátlás tekintetében.....	60
4.3.6 Biszfoszfonátok szferoid növekedés gátlására kifejtett hatásának vizsgálata	61
4.3.7 ZA és BPH tumorellenes hatása M24met xenograft modelljén	63
5. Megbeszélés	65

5.1 BRAF mellett PI3K vagy PTEN mutációt hordozó daganatos sejtek RAS/RAF és PI3K/Akt jelpályák kombinációs gátlással szembeni érzékenysége	65
5.2 BRAF mutáns anaplasztikus pajzsmirigyrák sejtek kezelése BRAF és MEK inhibitorokkal.....	68
5.3 BRAF vagy NRAS mutáns melanóma sejtek érzékenysége lipofil és hidrofil biszfoszfonátokkal szemben	70
5.4 A PI3K/Akt jelpálya szerepe a lipofil biszfoszfonát hatásmechanizmusában	72
6. Következtetések.....	75
7. Összefoglalás	76
8. Summary.....	77
9. Irodalomjegyzék	78
10. Saját publikációk jegyzéke	106
10.1 Disszertációhoz kapcsolódó publikációk listája	106
10.2 Disszertációtól független publikációk listája.....	106
11. Köszönetnyilvánítás	107

Rövidítések jegyzéke

4E-BP1	4E-kötő fehérje (4E binding protein)
AKT	Protein kináz B (Protein kinase B)
ANOVA	Variancia analízis (Analysis of variance)
ARAF	Szerin/teronin protein kináz A-Raf (Serine/threonine-protein kinase A-Raf)
ATC	Anaplasztikus pajzsmirigyrák (anaplastic thyroid cancer)
ATCC	Amerikai sejtbank (American type culture collection)
ATP	Adenozin trifoszfát (Adenosine triphosphate)
BRAF	v-raf murin szarkóma virális onkogén homológ B1 (V-raf ((viral rapidly accelerated fibrosarcoma)) murine sarcoma viral oncogene homolog B1)
CCK8	Sejtszámoló kit 8 (cell counting kit 8)
CCLE	Tumor sejtvonallal enciklopédia (Cancer cell line encyclopedia)
CI	Kombinációs index (combinatory index)
CK18	Citokeratin 18 (Cytokeratin 18)
COSMIC	Szomatikus mutációk katalógusa daganatokban adatbázis (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer)
CRAF	RAF proto-onkogén szerin/teronin protein kináz (RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase)
CTLA4	Citotoxikus T-limfocita fehérje 4 (Cytotoxic T-lymphocyte protein 4)
DAPI	Fluoreszcens magfestés (4',6-diamidino-2-phenylindole)
DEPTOR	DEP domént tartalmazó mTOR-ral kapcsolatban levő fehérje (DEP domain-containing mTOR-interacting protein)
DMEM	Dulbecco módosította Eagle médium (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMSO	Dimetil-szulfoxid (Dimethylsulfoxide)
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav (Ethylenediaminetetraacetic acid)
EGF/EGFR	Epidermális növekedési faktor / receptor (Epidermal growth factor / receptor)
ERBB	Receptor tirozin kináz erbB (Receptor tyrosine-protein kinase erbB)

ERK	Extracelluláris szignál útvonal szabályozta kináz (Extracellular signal pathway regulated kinase)
EXPASY	Bioinformatikai adatbázis (Bioinformatics Resource Portal)
FBS	Fötális borjú savó (Fetal bovine serum)
FDA	Amerikai Élelmiszer és Gyógyszer Ügynökség (Food and Drug Administration)
FPPS	Farnezil pirofoszfát szintáz (Farnesyl pyrophosphate synthase)
FT/FTI	Farnezil transzferáz / inhibitor (Farnesyl transferase / inhibitor)
GAP	GTPáz aktiváló fehérje (GTPase activating protein)
GAPDH	Gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
GDP/GTP	Guanozin difoszfát / trifoszfát (Guanosine diphosphate / triphosphate)
GEF	Guanin-nukleotid kicserélő faktor (Guanine nucleotide exchange factor)
GGPS	Geranylgeranil pirofoszfát szintáz (Geranylgeranyl pyrophosphate synthase)
GGT/GGTI	Geranylgeranil transzferáz / inhibitor (Geranylgeranyl transferase / inhibitor)
GRB2	Növekedési faktor receptor kötő fehérje 2 (Growth factor receptor-bound protein 2)
HMG-CoA	3-hirdoxi-3-metil-glutaril koenzim A (3-hydroxy-3-metilglutaryl coenzyme A)
HRAS	Harvey patkány szarkóma vírus onkogén homológ (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog)
IC50	50%-os gátlási koncentráció (Half maximal inhibitory concentration)
IGF/IGFR	Inzulin-szerű növekedési faktor / receptor (Insulin-like growth factor 1 / receptor)
KRAS	Kirsten patkány szarkóma onkogén homológ (Kirsten rat sarcoma oncogene homolog)
MEK	Mitogén aktivált protein kináz-kináz (Mitogen-activated protein kinase kinase)
MET	HGF receptor (Receptor of hepatocyte growth factor (HGF))

MLST8	TOR komplex LST8 alegysége (Target of rapamycin complex subunit LST8)
MNK	MAPK-al kölcsönható kináz (MAPK-interacting Kinase)
MSIN1	Stressz aktivált MAPK-al kölcsönható fehérje 1 (Stress-activated map kinase-interacting protein 1)
mTOR	Emlős rapamicin célpont (mammalian target of rapamycin)
mTORC1/2	mTOR komplex 1/2 (mTOR complex 1/2)
NF1	Neurofibromin-1 (Neurofibromin-1)
NFKB1	NF kappa B 1 (Nuclear Factor Kappa B Subunit 1)
NMP	N-metil-2-pirrolidon (N-methyl-2-pyrrolidone)
NOD	Nem elhízott cukorbeteg (Non-obese diabetic)
NRAS	neuroblasztóma v-ras onkogén homológ (Oncogen/protein; neuroblastoma v-ras (viral rat sarcoma) oncogene homolog)
PARP	PoliADP-ribózpólimeráz (Poly (ADP-ribose) polymerase)
PAX8	Pajzsmirigy szövetspecifikus transzkripciós faktor (Paired-box gene 8)
PD1	Programozott sejthalál fehérje 1 (Programmed cell death protein 1)
PEG300	Polietilén-glikol 300 (Polyethylene glycol 300)
PIP2	Foszfatidil-inozitol 4,5 bifoszfát (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)
PIP3	Foszfatidil-inozitol 3,4,5 trifoszfát (Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate)
PBS	Foszfát-só puffer (Phosphate-buffered saline)
PCNA	Proliferációs sejtmag antigén (Proliferating cell nuclear antigen)
PDGF/PDGFR	Vérlemezke-eredetű növekedési faktor / receptor (Platelet-derived growth factor / receptor)
PKD1	3-foszfinozid-függő protein kináz-1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1)
PI3K	Foszfatidil-inozitol 3 kináz (Phosphatidylinositol-3-kinase)
PRAS40	40 kDa tömegű prolin gazdag Akt szubsztrát (40 kDa proline-rich AKT substrate)
PROTOR	Rictorral együtt megfigyelt fehérje (Protein observed with Rictor)
PTEN	Foszfátáz és tenzin homológ (Phosphatase and tensin homolog)

PVDF	Polivinilidén-fluorid (Polyvinilidene fluoride)
RAB	Ras szupercsalád tagja (Ras-related protein)
RAC	Ras szupercsalád tagja (Ras-related C3 botulinum toxin substrate)
RAPTOR	mTOR szabályozással kapcsolatos fehérje (Regulatory-associated protein of mTOR)
RHEB	Agyban gyakori Ras homológ (Ras homolog enriched in brain)
RHO	Ras szupercsalád tagja (Rho-related GTP-binding protein)
RICTOR	mTOR rapamicin érzéketlen társa (Rapamycin-insensitive companion of mTOR)
RSK	Riboszómális protein S6 kináz (Ribosomal protein S6 kinase)
RTK	Tirozin-kináz receptor (Receptor tyrosine kinase)
S6	Riboszómális protein S6 (Ribosomal protein S6)
SCID	Súlyos kombinált immunhiány (Severe Combined Immunodeficiency)
SDS	Nátrium-dodecil szulfát (Sodiumdodecylsulfate)
SOS	Ras GEF fehérjéje (Son of sevenless)
SRB	Szulforodamin-B (Sulforodamine-B)
TCA	Triklórecetsav (Trichloroacetic acid)
TERT	Telomeráz reverz transzkriptáz (Telomerase reverse transcriptase)
TP53	Tumor protein 53 (Tumor protein p53)
TSC1/2	Tuberóza szklerózis komplex 1/2 (Tuberous sclerosis complex 1/2)
TTF1	Pajzsmirigy transzkripció faktor 1 (Thyroid transcription factor1)
ULA	Rendkívül alacsony rögzítés (Ultra low attachment)
ZA	Zoledronsav (Zoledronic acid)

1. Bevezetés

A RAS/RAF és PI3K/Akt jelpályákon előforduló mutációk kulcsfontosságú szerepet játszanak a daganatok kialakulásában és fenntartásában. A célzott terápiák hatékonyságának gátat szabnak a jelpályák visszacsatolási folyamatai, valamint az egymás közötti intenzív kommunikáció, melyek menekülő utakként szolgálhatnak célzott gátlás esetén. Két párhuzamos jelpályán egyszerre jelen lévő mutációk (például BRAF+PI3K/Akt pálya mutáció), valamint a monoterápiák gyakori hatástalansága megnövelte a horizontális és vertikális kombinációs kezeléseket, valamint az alternatív terápiák kutatásának jelentőségét. PhD munkám során a BRAF mutáns tumorok gátlásának különböző aspektusait vizsgáltam, különös tekintettel a PI3K jelpálya szerepére, valamint a kombinációs terápiák lehetőségeire. Értekezésemben három vizsgálat eredményeit dolgoztam fel. Elsőként BRAF és BRAF+PI3K/PTEN mutáns sejtvonalak érzékenységét hasonlítottam össze a RAS/RAF és PI3K/Akt jelpályák egyidejű, horizontális gátlásának hatására. Ezután egy újonnan alapított BRAF V600E mutáns anaplasztikus pajzsmirigy-rák sejtvonal célzott terápiával szembeni érzékenységét mutattam be mind mono-, mind pedig vertikális kombinációs terápiával szemben. Végül különböző mutációs státuszú melanóma sejtvonalakon két preniláció-gátló vegyület hatékonyságát vettem össze, figyelembe véve azok eltérő lipofilitásának hatékonyságra gyakorolt befolyását. Mindezen eredmények hozzájárulhatnak a RAS/RAF és PI3K/Akt jelpályán mutációt hordó daganatos betegek terápiájának fejlesztéséhez.

1.1 A RAS/RAF jelpálya legfontosabb elemei és onkogén mutációi

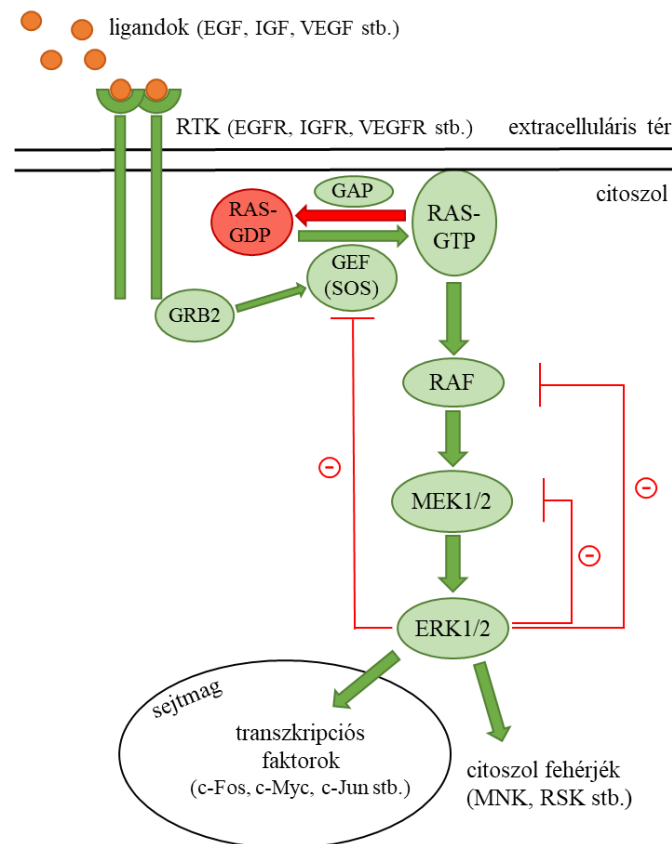
Emlős sejtekben a növekedési faktor jelátviteli utak rendkívül bonyolult, egymással szorosan összefüggő és kölcsönható hálózatot alkotnak. Ezek közül a RAS/RAF/MEK/ERK és a PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonalaknak kritikus és átfogó szabályozó szerepe van a sejtekben a növekedés, osztódás, differenciáció, fehérje szintézis, mozgás, metabolizmus és túlélés területén (Zhang és mtsai 2002, Yap és mtsai 2008). Ennélfogva ezen jelpályák kulcsfontosságú tagjainak onkogén mutációi környezettől független konstitutív aktivációt eredményezhetnek, melyek hozzájárulnak a daganatok kialakulásához, fenntartásához és progressziójához (Satyamoorthy és mtsai 2003, Steinmetz és mtsai 2004, Stemke-Hale és mtsai 2008).

Daganatokban leggyakrabban a RAS/RAF és PI3K/Akt útvonalakon mutathatók ki onkogén mutációk, melyek prediktív faktorok lehetnek a hatékony célzott terápia tervezésében, ezért munkám során ezen jelpályákon mutációt hordozó sejt vonalak vizsgálatával foglalkoztam. A disszertációban RAS/RAF és/vagy PI3K/PTEN mutáns melanóma, tüdő-, vastagbél- és pajzsmirigyrák sejt vonalakon végzett kísérleti eredményimet mutatom be, így a bevezetőben elsősorban az ezen jelpályákkal kapcsolatos legfontosabb információkat ismertetem.

1.1.1 A RAS/RAF jelpálya működése

A RAS/RAF jelpályát extracelluláris ligandumok (legtöbbször növekedési faktorok: EGF, IGF, VEGF stb.) aktiválják a sejtmembránon található tirozin kináz receptorokhoz való kötődésével (RTK: EGFR, IGFR, VEGFR stb.) (McCubrey és mtsai 2007, Kim és mtsai 2015) (1. ábra). Az aktív receptor intracelluláris része foszforilálja a membránhoz horgonyzott RAS fehérjét aktiváló faktorokat, melyek a RAS-hoz kötött GDP-t GTP-re cserélik. Ezután a GTP kötött RAS stimulálja a RAF megfelelő aktivitásához szükséges homo-, vagy heterodimerek kialakulását (Roskoski 2018). Ezen dimerek elsősorban a BRAF és CRAF között jönnek létre. A heterodimerek (BRAF:CRAF) nagyobb aktivitással bírnak, mint a homodimerek (BRAF:BRAF, CRAF:CRAF) (Rushworth és mtsai 2006, Freeman és mtsai 2013). Következő lépésként a RAF a MEK (MEK1/2) fehérjét a Ser218 és Ser222 aminosavak foszforilálása révén aktiválja. A MEK is

dimereket alkot, amihez kapcsolódik a RAF, és így tetramereket hoznak létre (MEK:RAF:RAF:MEK) (Haling és mtsai 2014). A MEK ezután aktiválja az ERK (ERK1/2) fehérjét, amely a citoplazmában számos fehérje aktiválásában, inaktiválásában játszik szerepet (kinázok, foszfatázok, citoszkeleton fehérjék pl.: MNK, RSK stb.) amely kulcsfontosságú a jelpályák közötti kommunikációban (Na és mtsai 2010). A normálisan működő szignalizációs út végén az ERK negatív visszacsatolással leállítja a jelátvitelt azáltal, hogy gátolja upstream elemeit (MEK, RAF, RAS (SOS)) (Ramos 2008, Unal és mtsai 2017). Továbbá az ERK a sejtmagban számos transzkripciós faktort aktivál (pl.: c-Fos, c-Myc, c-Jun), melyek a proliferációhoz, életben maradáshoz, differenciálódáshoz szükséges fehérjék gyártásához járulnak hozzá (Unal és mtsai 2017). A jelpálya linearitását biztosítja, hogy a RAF egyedül a MEK1/2-t aktiválja, a MEK1/2 pedig egyedül az ERK1/2-t foszforilálja (Caunt és mtsai 2015). Azonban a visszacsatolási szabályozási folyamatok és a más jelpályákkal való intenzív kommunikáció nagyon megnehezíti a lezajló mechanizmusok pontos feltérképezését és megértését.



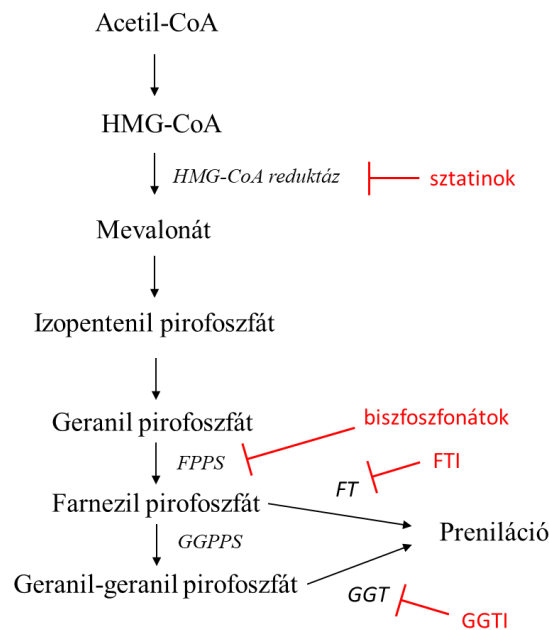
1. ábra A RAS/RAF jelpálya sematikus ábrája (Caunt és mtsai 2015, Sanchez és mtsai 2018) alapján.

1.1.2 A RAS fehérjecsalád és onkogén mutációi

Emberben három klasszikus RAS gén (KRAS, NRAS, HRAS) kódolja a négyféle RAS fehérjét (KRAS4A, KRAS4B, NRAS, HRAS), melyek mutációi a daganatok egyharmadában kimutathatók (Li és mtsai 2018). A RAS túlzott aktivitását többek között okozhatja a tőle upstream elhelyezkedő tirozin kináz receptorok (RTK) fokozott működése vagy megnövekedett mennyisége (Quilliam és mtsai 1999), továbbá a RAS fehérjét inaktiváló GAP (GTPáz aktiváló fehérje) fehérjék funkcióvesztéssel járó mutációja (Maertens és mtsai 2013). Ugyanakkor a fokozott aktivitás leggyakoribb oka a RAS génen bekövetkező mutáció, amely legtöbbször a 12-es és 13-as pozícióban található glicin (G12, G13), illetve a 61-es pozícióban levő glutamin (Q61) aminosavak cseréje (Scheffzek és mtsai 1997). Daganatokban leggyakrabban a KRAS mutáció mutatható ki (85%), ezt követi az NRAS (12%) illetve a HRAS (3%) (Forbes és mtsai 2017). A RAS gének expressziója szövet specifikus, így a KRAS leggyakrabban hasnyálmirigy daganatokban, az NRAS melanómában, a HRAS pedig mellékvese daganatokban fordul elő (Simanshu és mtsai 2017). Ezen kívül a KRAS mutációk hasnyálmirigy daganatokban 90%-ban G12, míg a melanómákban kimutatható NRAS 90%-ban Q61 mutáció. Vastagbélrákban a KRAS onkogén mutációja az esetek 30-40%-ban, a tüdő adenokarcinómák között 20-35%-ban mutatható ki, míg a melanómában NRAS mutáció 15-30%-ban azonosítható. Érdekes módon, az anaplasztikus pajzsmirigyrákok esetében az NRAS, KRAS és HRAS mutációja egyaránt kimutatható, mindösszesen az esetek körülbelül 10-25%-ban (Cabanillas és mtsai 2016, Forbes és mtsai 2017, Chen és mtsai 2018).

A RAS fehérje a kis G fehérjék közé tartozik, tehát aktív állapotában GTP-t köt (Li és mtsai 2018). A fehérjecsalád tagjainak egyik közös tulajdonsága, hogy feladataikat a sejtmembránhoz kötve végzik, melyhez szükségük van a poszttranszlációs módosítások (preniláció, palmitoiláció) során kapott lipid láncokra (Ahearn és mtsai 2011). A preniláció során a mevalonát bioszintetikus útvonalon keletkező farnezil (C15) és geranilgeranil (C20) lipid láncokat farnezil transzferáz (FT) és geranilgeranil transzferáz (GGT) enzimek kötik a fehérjék C-terminálisának úgynevezett hipervariábilis régiójára (CAAX) (Ahearn és mtsai 2011) (2. ábra). A poszttranszlációs módosítások nem teljesen egyformák a RAS fehérjéken. A KRAS és az NRAS normál esetben farnezilálódik, de

ennek gátlása esetén képesek alternatívaként gernalilgeranilálódni, míg a HRAS esetén ez utóbbi folyamat nem játszik szerepet (Whyte és mtsai 1997). Fontos megjegyezni, hogy a kis G fehérjék közé tartoznak a RAS mellett többek között a RHEB, RHO, RAB, RAC stb fehérjék is, melyeknek egy része a RAS/RAF és PI3K/Akt jelpályákon tölt be kulcsfontosságú szerepet, továbbá mutációikat daganatos megbetegedésekkel összefüggésben is leírták (Amin és mtsai 1992, Green és mtsai 2002).



2. ábra Mevalonát útvonal és a lehetséges gátlási pontok sematikus ábrája (Thurnher és mtsai 2012) alapján

1.1.3 RAS mutáns daganatok lehetséges terápiás megközelítései

RAS mutáns daganatok kezelése napjainkban is igen nagy nehézséget okoz a hatékony terápia intenzív kutatása ellenére. A fehérje direkt gátlása sokáig lehetetlennek tűnt, mivel igen nagy az affinitása a GTP-hez, rendkívül kompakt a szerkezete és a felszíne nem alkalmas gátlószer bekötéséhez (Cox és mtsai 2014). Fejlesztettek ígéretes anyagokat, melyek a RAS-hoz kötődve gátolják a GEF (SOS) általi aktivációt, azonban a várt sikert nem hozták meg (Sun és mtsai 2012). Nemrégiben azonban áttörést értek el, és bemutatottak két kovalens gátlószert (AMG510, MRTX1257), melyek bizonyos KRAS G12C mutáns daganatok ellen hatékonyan bizonyultak (Canon és mtsai 2019, Hallin és

mtsai 2020). Azonban sajnos esetükben is fennáll a kialakuló rezisztencia kockázata, továbbá a G12C mutáció csak igen kis hányada a RAS mutációknak. A túlaktivált RAS gátlásának lehetőségei közé tartoznak még a downstream elemek (MEK, PI3K, Akt) inhibíciója önállóan vagy kombinációban (Van Dort és mtsai 2015, Dong és mtsai 2018, Ragon és mtsai 2019). Továbbá a RAS aktiváló fehérje (SOS) támadása, melynek egyik legsikeresebb képviselőjét, a BI 1701963 jelű vegyületet jelenleg már klinikai fázis 1 vizsgálatban is tesztelik önállóan és a MEK gátló trametinibbel kombinálva KRAS mutáns daganatos betegeken (Gort és mtsai 2020) (clinicaltrials.gov: NCT04111458). Valamint ide tartozik még a RAS poszttranszlációs módosításainak megakadályozása, melyek közül az egyik legintenzívebben kutatott terület a preniláció gátlás.

A preniláció gátló szerek csoportjába tartoznak a HMG-CoA reduktáz gátló sztatinek (atorvasztatin, rozuvasztatin, szimvasztatin stb.), a farnezil pirofoszfát szintáz (FPPS) gátló biszfoszfonátok (aledronsav, pamidronsav, zoledronsav stb.), valamint a farnezil transzferáz (FTI: tipifarnib, lorafarnib) és geranil-geranil transzferáz (GGTI: P3-E5, P5-H6) gátlók (2. ábra) (Manaswiyoungkul és mtsai 2020).

A biszfoszfonátokat kezdetben a csontszövet különböző betegségeiben (Paget kór, osteoporózis) használták (Roux és mtsai 1999, Sambrook 2002), később pedig csontmetasztázisok kezelésére is (Hegemann és mtsai 2017, Kozyrakis és mtsai 2018, Goldvaser és mtsai 2019). Nemrégiben azonban kimutatták a nitrogén tartalmú, aminoszfoszfonátok direkt daganatellenes hatását is mielóma multiplex, emlőrák, prosztaták és melanóma sejteken, ahol sikeresen gátolták a sejtek mozgását, osztódását és apoptózist indukáltak (Denoyelle és mtsai 2003, Yamagishi és mtsai 2004, Santini és mtsai 2006, Tsubaki és mtsai 2013). Leírták, hogy a nitrogén tartalmú biszfoszfonátok csökkentették a RAS/RAF jelátviteli MEK és Erk fehérjéinek, valamint a PI3K/Akt pályán Akt és az mTOR fehérjéinek aktivitását és növelték a PTEN expressziót is (Hanker és mtsai 2010, Tsubaki és mtsai 2013, Fragni és mtsai 2016, Kim és mtsai 2016).

A zoledronsav (ZA) az egyik leghatékonyabb aminoszfoszfonát, melynek *in vitro* daganatellenes hatását számos sejttípuson, köztük melanómán is leírták (Forsea és mtsai 2004, Hirbe és mtsai 2009, Garay és mtsai 2015, Fragni és mtsai 2016). Azonban *in vivo* alkalmazása limitált a csontszövethez való magas affinitása és a rossz biohasznosulása miatt (Nancollas és mtsai 2006, Weiss és mtsai 2008). Emiatt különféle fejlesztésekkel próbálkoztak a biohasznosulás növelése érdekében, úgy mint különböző szállító

rendszerek (nanopartikulum, lipofil szendvics) alkalmazása, vagy az eredeti vegyület prodrug formába alakítása (Chen és mtsai 2013, Schilrreff és mtsai 2014, Webster és mtsai 2014). Mindezek mellett kémiai lipofillé tett biszfoszfonátokat is teszteltek, melyek közül az egyik legígéretesebbnek, a ZA analóg BPH1222 (BPH) adódott. Egy nyolc szénatomos lipofil oldalláncot csatoltak a ZA alapvázhoz, mely megnövelte a plazma felezési időt és lecsökkentette a csontszövethez való affinitását a vegyületnek (Zhang és mtsai 2009, Xia és mtsai 2014, Boulmier és mtsai 2017). A hidrofíl biszfoszfonáthoz hasonlóan lipofil analógokról is megmutatták a direkt antitumor hatását emlőrák, tüdőrák, vastagbélrák és glioblasztóma sejteken (Zhang és mtsai 2009, Xia és mtsai 2014, Boulmier és mtsai 2017, Baranyi és mtsai 2020).

1.1.4 RAF (BRAF) fehérje, mutációi és terápiák

A RAF az egyik legfontosabb végrehajtója a RAS fehérjének és az egyik legjobban tanulmányozott fehérje ezen a jelpályán. Három gén kódol RAF fehérjét amelyek expressziója szövetspecifikus: ARAF, BRAF és CRAF, melyek közül a BRAF a legaktívabb és ennek a mutációja fordul elő leggyakrabban daganatokban (Rezaei Adariani és mtsai 2018). A melanómák 50-60%-a, vastagbélrákok 5-15%-a, tüdő adenokarcinómák 3-5%-a, pajzsmirigyrákoknak pedig 10-45%-a hordoz BRAF mutációt (Bonhomme és mtsai 2017, Forbes és mtsai 2017, Chen és mtsai 2018). A CRAF közepes aktivitással bír, de a RAS mutáns daganatokban, továbbá BRAF gátlás esetén kialakuló paradox RAS/RAF útvonal aktivációban is jelentős szerepet játszik (Blasco és mtsai 2011, Holderfield és mtsai 2014). Végül, az ARAF a legkevésbé aktív és nagyon ritkán mutatható ki mutációja daganatokban.

A RAF gén három jól elkülöníthető régióból áll. Az első a RAS-kötő régiót és egy ciszteinben gazdag domént tartalmaz. A második egy szerin/treonin gazdag szakasz, míg a harmadik szakasz tartalmazza a kináz domént a savas N-terminállal és a regulációs C-terminállal (Degirmenci és mtsai 2020). Megjegyzendő, hogy a BRAF mutációk többsége a kináz domént kódoló régióban, a 11-es és 15-ös exonon található meg (Davies és mtsai 2002).

A BRAF V600E mutációja a leggyakoribb elváltozás, amely egy valin glutaminsav szubsztitúció a 600-as pozícióban. A BRAF mutáns melanómás esetek 80-90%-a, a

vastagbélrákok 90%-a, a tüdő adenokarcinómák 50%-a, míg a pajzsmirigyrákok nagyjából 90%-a tartozik ide (Davies és mtsai 2002, Xing 2005, Holderfield és mtsai 2014, Turski és mtsai 2016). Ez a mutáció jelentősen, mintegy 500-700-szoros mértékben megnöveli a kináz aktivitását (Wan és mtsai 2004). A V600E/D mutációk következtében a BRAF fehérje RAS-tól függetlenül aktív állapotba kerül és az aktív konformációja stabilizálódik (Wan és mtsai 2004, Lavoie és mtsai 2015).

A RAF gátlók között egyes inhibitorok hatékonyak az ARAF, BRAF és CRAF ellen egyaránt, és emellett más célfehérjéi is vannak (például VEGFR2, PDGFR). Az egyik legjelentősebb képviselőjük a sorafenib, mely már klinikai használatban van vese, máj és pajzsmirigy daganatok bizonyos csoportjaiban (Cabanillas és mtsai 2019). Az ún. pan-RAF inhibitorok (RAF265, AZ628, MLN2480 stb.) gátolják az ARAF, BRAF és CRAF fehérjéket, de nem szelektívek a mutáns fehérjékre. Közülük a legjelentősebbeket klinikai vizsgálatokba is bevonták melanóma, glioma és egyéb szolid tumorok ellen (Izar és mtsai 2017) (clinicaltrials.gov: NCT03429803, NCT02327169). A szelektív mutáns BRAF gátló hatóanyagok legjelentősebb képviselői közé tartoznak a kis molekulású vemurafenib (PLX4032), dabrafenib (GSK2118436) és encorafenib (LGX818). Ezek reverzibilis ATP kompetitív gátlók, melyek a kinázt aktív állapotában stabilizálják azáltal, hogy elfoglalják az ATP kötő zsebet. Mindhárom vegyület klinikai alkalmazásban van 2011 (vemurafenib), 2013 (dabrafenib) és 2018 (encorafenib) óta BRAF V600E/K/D/R mutáns daganatok terápiájában (Dummer és mtsai 2018, Garbe és mtsai 2018, Puszkiel és mtsai 2019, Savoia és mtsai 2019).

1.1.5 A BRAF mutáció szerepe és célzott terápiája melanómában

A melanoma malignum a legagresszívebb típusú bőrrák, melynek igen magas a mortalitása (Perera és mtsai 2014). A RAS/RAF útvonal esszenciális a melanóma kialakulásához és fejlődéséhez, így a leggyakoribb mutációk a melanóma genézisben ennek a pályának az aktiváló mutációi (Nikolaou és mtsai 2012). A BRAF mutációja a melanóma kialakulásának korai szakaszában, már a neviusokban is igen magas arányba (60-80%) kimutatható (Pollock és mtsai 2003, Yeh és mtsai 2013, Roh és mtsai 2015). Továbbá a szolid tumorok között a melanómában a legmagasabb a BRAF mutáció aránya (50-60%) (Forbes és mtsai 2017).

Melanómában több mint 20 féle BRAF mutációt írtak le, de a V600E a leggyakoribb, 80-90% (Forbes és mtsai 2017). A BRAF mutáció gyakorisága változik a daganat hisztológiai alcsoportjai között, az anatómiai elhelyezkedése, valamint a Nap károsító hatásának mértéke függvényében, továbbá etnikai és geográfiai különbségeket is leírtak (Akslen és mtsai 2005, Akslen és mtsai 2008, Candido és mtsai 2014). Melanómában a BRAF V600E mutáció jelenlétében NRAS mutáció nem fordul elő, mert kölcsönösen kizárják egymást. Ha mégis kimutatják egy mintából a két mutációt, az feltételezhetően a különböző szubklónokkal magyarázható (Zheng és mtsai 2015, Raaijmakers és mtsai 2016).

2011 óta a szinte gyógyíthatatlan betegség kezelése napjainkra nagyon sokat fejlődött. A BRAF mutáció bár rossz prognózissal jár, lehetőséget ad a célzott terápiás kezelésnek. Így a BRAF mutáns melanómás betegek elsővonalban BRAF/MEK gátlószereket vagy immunterápiát (CTLA-4 elleni antitest: ipilimumab; PD1 elleni antitest: pembrolizumab, nivolumab) kapnak (clinicaltrials.gov: NCT02224781). Továbbá a célzott- és immunterápia kombinációjának lehetőségeit is tanulmányozzák (Ribas és mtsai 2019, Sullivan és mtsai 2019). Hogy melyik beteg melyik terápiát kapja, függ a daganat tulajdonságaitól (műthetőség, előrehaladottság, metasztázis, mutációk stb), de a betegek egyéb paramétereitől is (társbetegségek, általános egészségi állapot, gyógyszerallergia stb), amit egy szakértő onkológiai munkacsoport (onkoteam) mérlegel és ezek alapján hoz döntést (Pavlick és mtsai 2019).

1.1.6 A BRAF mutáció szerepe a tüdő-, vastagbél-, és pajzsmirigyrákban és a terápiás lehetőségek

A vastagbélrák a harmadik leggyakoribb daganattípus, és a második leggyakoribb rákkal kapcsolatos halálok világszerte (Bray és mtsai 2018). A BRAF mutáció az esetek 5-15%-ban található meg, gyakrabban idősebb betegeknél, többnyire nők esetében, a vastagbél jobb oldali szarán, valamint rossz prognózissal és a standard terápia elleni rezisztenciával jár (Sinicrope és mtsai 2015, Forbes és mtsai 2017). Ellentétben a melanómával, vastagbélrákok esetén a BRAF V600 gátló monoterápia nagyon gyorsan rezisztencia kialakulásához vezet, így sikertelennek bizonyult (Hyman és mtsai 2015, Kopetz és mtsai 2015). A vastagbélrákok esetén a negatív visszacsatolás csökkenése, az EGFR fokozott

hatása, illetve más jelpályák, mint például a PI3K/Akt, aktiválódása egyaránt hozzájárulhatott a sikertelenséghez (Prahallad és mtsai 2012, Mao és mtsai 2013, Cohen és mtsai 2017). Számos klinikai vizsgálat folyik és folyt a BRAF gátlók kombinációjáról EGFR, MEK és/vagy PI3K gátlókkal valamint kemoterápiás szerekkel (Corcoran és mtsai 2015, Tabernero és mtsai 2016)(clinicaltrials.gov: NCT03727763). Jelenlegi standard terápia első vonalban BRAF mutáns vastagbélrákos betegeknek a kemoterápia és bevacizumab (monoklonáris anti-VEGF antitest) kombinációja.

A tüdő adenokarcinóma a leggyakoribb és leggyakrabban halálos kimenetelű daganattípus (Bray és mtsai 2018). A BRAF mutáció viszonylag alacsony, 3-5%-os valószínűséggel található meg a betegekben, melyeknek nagyjából 50%-a hordoz BRAF V600E mutációt (Forbes és mtsai 2017). A többi mutáció egy része aktiváló mutáció (G469A, G469V, K601E stb.), míg a másik részének alacsonyabb a kináz aktivitása (D594G, G466V stb.), mint a vad típusú BRAF-nak (Wan és mtsai 2004, Leonetti és mtsai 2018). Utóbbiak esetében viszont a vad típusú RAF nagyobb affinitással dimerizálódik és aktiválja a jelpályát, és ez a folyamat már nem RAS független aktiváció (Wan és mtsai 2004, Noeparast és mtsai 2017). BRAF gátlószer (vemurafenib, dabrafenib, encorafenib, sorafenib) hatékonyan mutatkoztak BRAF V600E mutáns betegek kezelésekor a rezisztencia kialakulásáig (kb 5 hónap), azonban a nem V600E mutáns daganatokra kisebb hatékonyságuk volt (Gautschi és mtsai 2015, Hyman és mtsai 2015). A BRAF V600E mutáns tüdő daganatok kezelésére 2017-ben törzskönyvezték a trametinib+dabrafenib kombinációt (Odogwu és mtsai 2018). A BRAF nem V600E mutáns esetekben azonban jelenleg nincs egységes álláspont, esetükben a nem V600E specifikus szerek (pl sorafenib), MEK+EGFR gátlószer kombinációja, vagy immunterápia alkalmazása jöhet szóba (Serenó és mtsai 2015, Kotani és mtsai 2018).

Az anaplasztikus pajzsmirigyrák (ATC) egy ritka, de magas halálozási aránnyal bíró daganattípus, ami a pajzsmirigyrákok 1-2%-át adja, de a pajzsmirigyrákkal kapcsolatos halálozás 30%-áért felelős (Ragazzi és mtsai 2014, Dal Maso és mtsai 2017). BRAF mutáció az esetek 10-45%-ában fordul elő (Bonhomme és mtsai 2017, Chen és mtsai 2018). Habár a BRAF V600E mutáns ATC kezelésében a BRAF gátló vemurafenib, dabrafenib, encorafenib monoterápia biztató eredményeket mutatott (Hyman és mtsai 2015), az elsődleges kezelés legtöbbször nem célzott terápia, hanem sebészi eltávolítás, radioaktív jód és/vagy kemoterápia alkalmazása. Azonban bizonyos esetekben

(műthetetlen vagy metasztatikus daganatnál) alkalmazható 2018 óta a dabrafenib+trametinib kombináció a klinikumban (Subbiah és mtsai 2018).

1.1.7 A RAS/RAF jelpálya egyéb fehérjéinek mutációi és terápiás lehetőségek

További mutációk a RAS/RAF jelpályán ritkábbak. A MEK1/2 és ERK1/2 mutációk a melanómák 4-8%-ában, a kolorektális daganatok 3-4%-ában, a tüdő daganatok 0,5-1,5%-ában fordulnak elő (Forbes és mtsai 2017). A MEK1/2 mutáció nem mutatható ki RAS vagy RAF mutációval együtt (Brown és mtsai 2014). A MEK1/2 mutációk növelik a fehérje kináz aktivitását a regulációs hurok gátló hatásának megakadályozásával, vagy a homodimerizáció megnövelésével (Yuan és mtsai 2018). Az Erk1/2 mutációkról leírták, hogy a defoszforiláció gátlása révén megnövelik a fehérje féléletidejét (Brenan és mtsai 2016). Annak ellenére, hogy ezen jelpálya elemek mutációi igen ritkák, számos specifikus gátlószert teszteltek és tesztelnek jelenleg is ERK1/2 és MEK1/2 ellen, a jelpálya linearitásában betöltött kulcsszerepük miatt (Caunt és mtsai 2015, Liu és mtsai 2018).

Számos MEK1 vagy MEK1/2 gátló hatóanyag közül, melyek preklinikai vagy klinikai vizsgálatok alatt állnak, jelenleg három vegyületet törzskönyveztek különböző típusú, BRAF V600E/K mutációt hordozó daganatok kezelésére: trametinib, cobimetinib (GDC-0973) és binimetinib (Shirley 2018). Továbbá a selumetinib (AZD6244, ARRY-142886) egy szelektív allosztérikus gátlószere a MEK1/2 fehérjéknek (Akinleye és mtsai 2013). Preklinikai vizsgálatok megmutatták, hogy erős daganatellenes hatást fejt ki tumorsejteken, különösen a BRAF és/vagy RAS mutációt hordozó vonalakon (Davies és mtsai 2007, Huynh és mtsai 2007, Yeh és mtsai 2007, Bartholomeusz és mtsai 2015, Ryu és mtsai 2017). Számos klinikai vizsgálatban is szerepel a hatóanyag önállóan vagy kombinációs terápia részeként (Seto és mtsai 2018, Brown és mtsai 2019, Melosky és mtsai 2019). Nemrégiben az amerikai gyógyszerügynökség (FDA) jóváhagyta a selumetinib alkalmazását gyerekkori I-es típusú neurofibromatózis I (NF1) megbetegedések kezelésére (Gross és mtsai 2020).

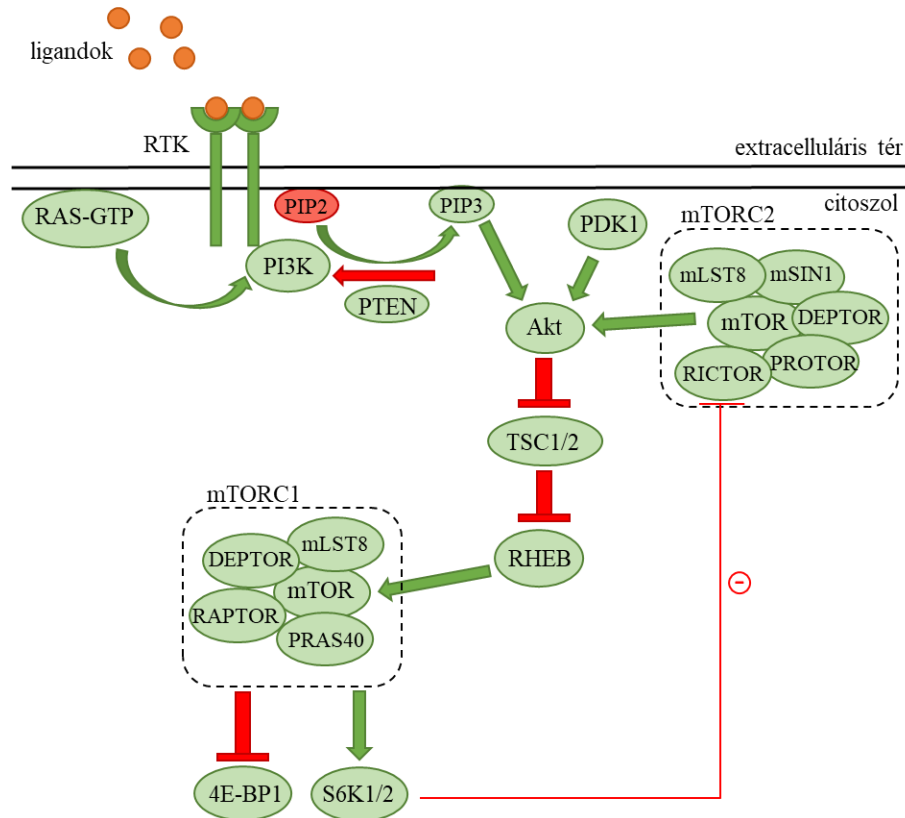
Az ERK inhibitorok alkalmazása esetében nem figyelték meg a paradoxikus útvonal aktiválódást, ugyanakkor a normál sejtekben is gátolják az útvonalat, ezért igen alacsony terápiás index-szel bírnak. Az ERK gátlószerek monoterápiában és kombinációban MEK vagy RAF inhibitorokkal való alkalmazása jelenleg klinikai vizsgálatok alatt áll (Liu és

mtsai 2018). Egyik legjobban tanulmányozott vegyület az ulixertinib (BVD-523), ami sajnos szintén igen toxikusnak bizonyult (Sullivan és mtsai 2018).

1.2 PI3K/Akt jelpálya fontosabb elemei, mutációik és szerepük a daganatos megbetegedésekben

1.2.1 PI3K/Akt jelpálya működése

Extracelluláris faktorok által aktivált tirozin kináz receptorokon (RTK), vagy akár a GTP kötött RAS fehérjén keresztül is aktiválódhat a PI3K, a PI3K/Akt jelpálya első eleme (Skolnik és mtsai 1991, Rodriguez-Viciano és mtsai 1994) (3. ábra). Az aktív PI3K foszforilálja a PIP2-t PIP3-á a plazmamembránánál. A PIP3 egy fontos másodlagos hírvivő, melynek citoplazmatikus koncentrációját a PTEN szigorúan szabályozza, mivel a PI3K direkt antagonistája lévén defoszforilálja a PIP3-at PIP2-vé (Lee és mtsai 2018). A PIP3 többek között szerepet játszik az Akt aktiválódásában, hiszen hozzá kapcsolódva zajlik le az Akt foszforilációja a Thr308-on a PDK1 által. Ugyanakkor az Akt teljes aktivitásának eléréséhez szükséges az mTORC2 általi foszforilálás is (Ser473) (Cole és mtsai 2019). Az Akt-nak több száz célfehérjéje van, melyek közé tartozik az mTORC1, amit közvetlenül és közvetetten is aktiválhat. Utóbbit a TSC1/TSC2 komplex Rheb-re (kis G fehérje) gyakorolt gátlásának megszüntetésével ér el (Laplante és mtsai 2012, Cole és mtsai 2019). Az mTOR két komplexet alkot, az mTORC1 és mTORC2-t. Előbbi tagjai az mTOR mellett az mLST8, DEPTOR, RAPTOR és PRAS40 fehérjék, míg utóbbit az mTOR mellett mLST8, DEPTOR, RICTOR, PROTOR és mSIN1 komponensek alkotják (Yu és mtsai 2016, Chamcheu és mtsai 2019). Az mTORC1 legfontosabb célfehérjéi közé tartoznak az S6K1/2 és a 4E-BP1, melyek a megfelelő transzkripciós faktorok aktiválásával folytatják a jelátvitelt a DNS átírással, fehérjeszintézissel. Az S6K1/2 fehérjéről kimutatták, hogy foszforilálja az mTORC2 RICTOR elemét, ezáltal negatív visszacsatolással leállítja a jelátviteli folyamatot (Julien és mtsai 2010). A jelpálya összességében szerepet játszik a sejt fehérje és lipidszintézisében, valamint a proliferáció, sejtnövekedés, metabolizmus és a sejtmozgás szabályozásában is (Janku és mtsai 2018).



3. ábra PI3K/Akt jelátvitel sematikus ábrája (Vanhaesebroeck és mtsai 2010, Yu és mtsai 2016, Chamcheu és mtsai 2019) alapján.

1.2.2 PI3K és PTEN fehérjék daganatokban betöltött szerepe

A PI3K/Akt jelpályához köthető leggyakoribb elváltozások a PTEN és PI3K fehérjéket érintik (Papa és mtsai 2019). A lipid kináz PI3K, a jelpálya első eleme, melynek nyolc izoformáját három osztályba sorolták, melyek közül onkogén mutációk szempontjából az IA osztály a legfontosabb. Az IA. osztály tagjai reguláló (pl.: p85 α) és katalitikus (pl.: p110 α , p110 β , p110 δ) alegységekből álló heterodimerként aktiválódnak, melyek közül daganatokban elsődlegesen a PI3KCA (p110 α) mutációit írták le, de a PI3KR1 (p85 α) tumorszupresszor szerepét is megmutatták (Vanhaesebroeck és mtsai 2010, Thorpe és mtsai 2017). A PI3KCA és PI3KR1 mutációk a kolorektális daganatok mintegy 10-20%-ában detektálhatóak, míg a melanómákban és a tüdő adenokarcinómákban 5% alatti az előfordulási gyakoriság (Lawrence és mtsai 2014, Forbes és mtsai 2017).

A PTEN az egyik leggyakrabban mutált tumorszupresszor a daganatokban. Melanómák 17-, a vastagbélrákok 10-, míg a tüdődaganatok 4%-ában található meg a mutált gén

(Forbes és mtsai 2017). A PTEN mutáció vagy deléción hatására a fehérje jelpálya gátló funkciója részben vagy teljesen kiesik, aminek hatására megemelkedik a jelpálya aktivitása (Carracedo és mtsai 2011, Hollander és mtsai 2011). Akár a PTEN-, akár a PI3K mutáció van jelen a pályán, mindkettő a PIP3 másodlagos hírvívő mennyiségét növeli meg, mely hozzájárul az Akt és az egész pálya túlzott aktivitásához.

1.2.3 További fontos fehérjék a PI3K/Akt jelpályán, mutációik és lehetséges támadáspontok

A PI3K és PTEN alterációin kívül a jelpálya további képviselőinek (Akt, TSC1/2, mTOR, Rheb) mutációit is leírták különböző daganatos megbetegedésekben, bár jóval alacsonyabb előfordulási gyakorisággal. Ezen mutációk hozzájárulhatnak a daganatok kialakulásához, fenntartásához illetve befolyásolhatják a terápiás szerekre adott választ (Ghosh és mtsai 2015, Kwiatkowski és mtsai 2016, Yi és mtsai 2016, Ho és mtsai 2017, Murugan és mtsai 2019).

A PI3K/Akt jelpálya fontosabb elemei ellen fejlesztettek és tesztelnek számos különböző gátlószert preklinikai és klinikai szinten egyaránt. A PI3K inhibitorokon belül pan-PI3K és izoforma specifikus gátlószereket lehet elkülöníteni. A számtalan tesztelt hatóanyag közül jelenleg három van törzskönyvezve különböző típusú daganatok kezelésére: idelalizib (PI3K δ), copanlisib (PI3K α , PI3K δ) és duvelisib (PI3K δ , PI3K γ) (Alzahrani 2019). Az Akt gátló szerek közül számos vegyület áll klinikai vizsgálat alatt (MK2206, preifosine, ARQ092 stb), azonban jelenleg nincs még törzskönyvezett hatóanyag ebben a csoportban. Az mTOR gátlók közül vannak allosztérikus és nem allosztérikus (kompetitív) gátlószerek. Utóbbiak mind az mTORC1-et, mind pedig az mTORC2-t képesek gátolni. Ide tartozik például a vistusertib (AZD2014), AZD8055 vagy a CC-223 (Janku és mtsai 2018). Az allosztérikus gátlószerek közé tartoznak a már klinikai használatra elfogadott hatóanyagok, mint a sirolimus, everolimus vagy temsirolimus (Li és mtsai 2014). Megjegyzendő azonban, hogy ezek a vegyületek az mTOR komplexek közül csak az mTORC1-et gátolják, az mTORC2-t nem, így a gátlás paradoxikus Akt aktivitás növekedéssel járhat (Jacinto és mtsai 2004, O'Reilly és mtsai 2006). Továbbá vizsgálnak kettős inhibitorokat is, melyek egyszerre gátolják a PI3K összes vagy legtöbb izoformáját és az mTORC1 és mTORC2-t. Ide tartoznak például a gedatolisib,

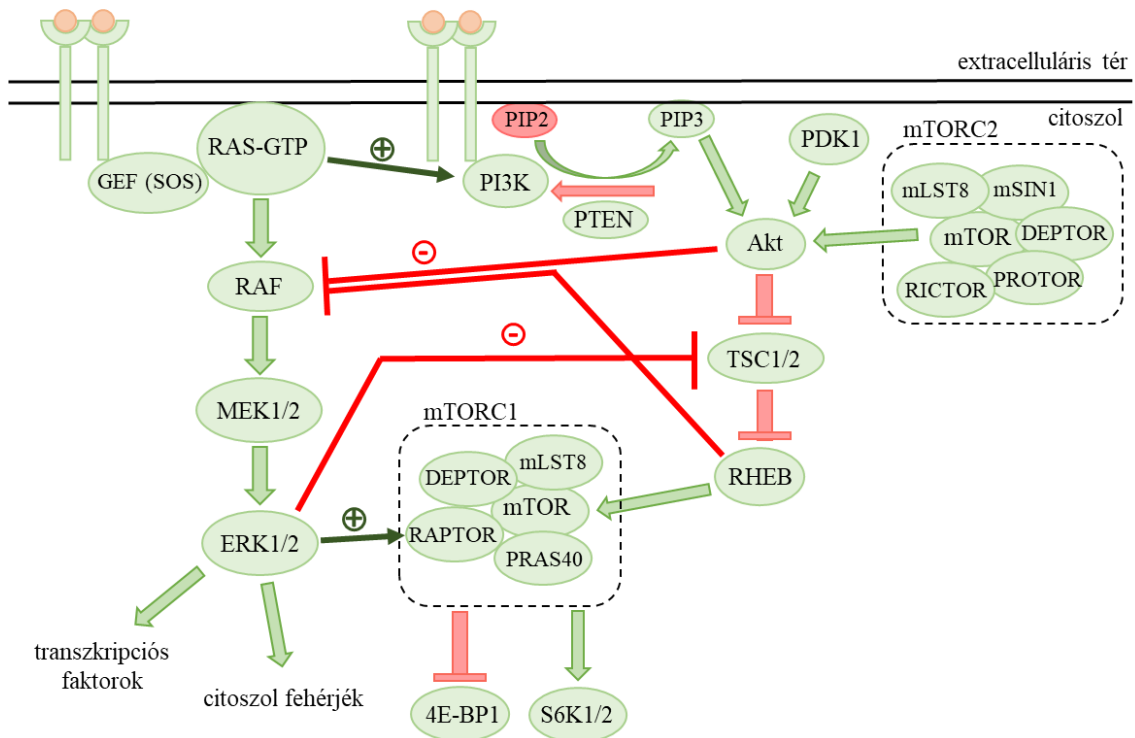
LY3023414 és BEZ235 (Janku és mtsai 2018). A BEZ235 (dactolicib) a célfehérjék ATP-kötő zsebéhez kapcsolódik ezáltal gátolja a katalitikus aktivitásukat (Maira és mtsai 2008, Serra és mtsai 2008). Számos preklinikai vizsgálatban hatékonyak találták különböző daganatok gátlásában a BEZ235-t, többek között melanóma, vastagbélrák és tüdődaganatokon is (Aziz és mtsai 2010, Martinelli és mtsai 2013, Yang és mtsai 2016). Azonban sajnos a legtöbb klinikai vizsgálatban a BEZ235 hatékonyságát erősen korlátozta annak alacsony tolerálhatósága és a rendkívül szűk terápiás ablak (Fazio és mtsai 2016, Salazar és mtsai 2018). Ez a probléma a legtöbb PI3K/Akt jelpályát gátló hatóanyagra fennáll. Jelenleg különböző kombinációs terápiákba vonják be a vegyületeket és vizsgálják hatékonyságukat (clinicaltrials.gov: NCT01480154, NCT03386162, NCT02583542, NCT02057133).

1.3 A két jelpálya egymás közötti kommunikációja; a horizontális és vertikális kombinációs terápiák

A két útvonal (RAS/RAF és PI3K/Akt), melyek a leggyakrabban meghibásodott jelpályák a daganatos megbetegedésekben, számos ponton képesek egymást szabályozni, akár gátolni, akár aktiválni (Mendoza és mtsai 2011) (4. ábra). A legfontosabbak közé tartozik a PI3K aktivációja a RAS fehérje révén (Rodriguez-Viciano és mtsai 1994), valamint az ERK serkentő hatása a PI3K/Akt pályára a TSC2 gátlása (Ma és mtsai 2005), illetve a RAPTOR (mTORC1) aktiválása révén (Carriere és mtsai 2011). Továbbá ismert az Akt és a Rheb fehérjék közvetlen RAF gátló hatása is (Zimmermann és mtsai 1999, Karbowniczek és mtsai 2006).

A RAS/RAF jelpálya gátlása MEK vagy BRAF inhibitorok segítségével egyrészt a pálya negatív visszacsatolásának csökkenése miatt az upstream elemek (RAS, RTK) túlaktiválódásához, következésképpen a jelátvitel újraaktiválásához vezethet (Nazarian és mtsai 2010, Rossi és mtsai 2019). Másrészt, a MEK/BRAF gátlás kompenzatorikus PI3K/Akt jelpálya aktivitáshoz is vezethet a megnövekedett ERBB3, PDGFR β vagy IGF1R expresszió révén (Gopal és mtsai 2010, Turke és mtsai 2012, Molnár és mtsai 2018). A PI3K/Akt jelpálya gátlása PI3K vagy Akt inhibitorokkal szintén vezethet az ERBB és más RTK-okat érintő negatív visszacsatolás megszűnéséhez és így a jelpálya újraaktiválódhat (Chandarlapaty és mtsai 2011). Valamint PI3K és mTORC1

gátlószerekről megmutatták, hogy ERBB2 receptor aktiválás és más mechanizmusok révén fokozzák a RAS/RAF jelpálya aktivitását (Carracedo és mtsai 2008, Serra és mtsai 2011). Ezen mechanizmusok összességében nagymértékben hozzájárulhatnak a jelpályák gátlószerei ellen kialakult vagy eleve fennálló rezisztenciákhoz (Nazarian és mtsai 2010, Rossi és mtsai 2019).



4. ábra RAS/RAF és PI3K/Akt jelpályák egymással való kommunikációjának néhány példája (Mendoza és mtsai 2011, Britten 2013) alapján. Piros vonalak a gátló, zöldek a serkentő hatást jelölik.

Fontos kiemelni, hogy a RAS/RAF és PI3K/Akt jelpályán előfordulhat a mutációk együttes jelenléte is. Leírták, hogy a KRAS vagy BRAF mutáció mellett megjelenő PI3KCA mutáció kimutatható a vastagbélrákok 7-9, illetve 1-12%-ában (Baldus és mtsai 2010, Janku és mtsai 2011, Zheng és mtsai 2015, Forbes és mtsai 2017). Továbbá, BRAF mutáció mellett PI3KCA mutáció tüdő adenokarcinómában (3-6%) és melanómákban (0,14-3%) is ismert (Zheng és mtsai 2015, Forbes és mtsai 2017). Valamint megmutatták melanómákban a PI3K/Akt jelpálya egyéb fehérjéinek (PTEN, mTOR, PI3KR1, NFKB1) mutációját BRAF (17-20%) vagy NRAS (9%) mutáció mellett is (Tsao és mtsai 2004, Dankort és mtsai 2009, Shull és mtsai 2012).

Összességében elmondható, hogy bizonyos körülmények között mindkét jelpálya vagy egy adott pálya több ponton való gátlására elengedhetetlen a sikeres terápia eléréséhez (Gopal és mtsai 2010, She és mtsai 2010, Mendoza és mtsai 2011, Turke és mtsai 2012). Számos preklinikai és klinikai vizsgálatban tanulmányozták és tanulmányozzák a mai napig is a kombinációs terápia hatékonyát, alkalmazhatóságát figyelembe véve a több gyógyszer együttes használatából adódó toxicitás növekedést és terápia ablak csökkenést (Li és mtsai 2019, Rossi és mtsai 2019). Fontos szempont ezért, hogy a két vegyület lehetőség szerint erősítse egymás hatását, vagyis szinergizmus álljon fenn a kombinálandó szerek között. Vizsgálatok alatt áll a RAS/RAF jelpálya kettős gátlása RAF és MEK vagy MEK és ERK gátlószerek kombinációjával. Ide tartoznak például a binimetinib (MEKi) + encorafenib (BRAFi), cobimetinib (MEKi) + vemurafenib (BRAFi), GSK1120212 (MEKi) + SCH772984 (ERKi), valamint cobimetinib + GDC-0994 (ERKi) hatóanyagok kombinációi (Hatzivassiliou és mtsai 2012, Morris és mtsai 2013, Larkin és mtsai 2014, Whittaker és mtsai 2015, Merchant és mtsai 2017, Niessner és mtsai 2017). Valamint a két jelpálya együttes, horizontális gátlása is vizsgálatok tárgyát képezi. Néhány ezek közül a selumetinib (MEKi) / vemurafenib (BRAFi) + ZSTK474 (PI3Ki) / BEZ235 (PI3K/mTORi), selumetinib + MK2206 (Akti) + AZD8055 (mTORi) (Ewald és mtsai 2014, Sweetlove és mtsai 2015). Napjainkra már számos kombinációt törzskönyveztek és használnak klinikai gyakorlatban. Metasztatikus melanóma kezelésre dabrafenib+trametinib (2014), (Long és mtsai 2014, Long és mtsai 2017), vemurafenib+cobimetinib (2015) (Larkin és mtsai 2014, Ascierto és mtsai 2016) valamint encorafenib+binimetinib (2018) (Dummer és mtsai 2018) kombinációkat alkalmazzák, hasonló hatékonysággal (Consoli és mtsai 2020). Ezekkel a terápiaikkal nemcsak a rezisztencia kialakulásának esélyét lehet csökkenteni, de a monoterápia mentén kialakuló másodlagos daganatokét is. BRAF V600E mutáns tüdő adenokarcinóma betegek kezelésére is elfogadták 2017-ben a dabrafenib+trametinib kombinációs terápiát (Planchard és mtsai 2016). Továbbá dabrafenib+trametinib kombinációt BRAF V600E mutációt hordozó ATC betegek kezelésére is törzskönyvezték 2018-ban (Subbiah és mtsai 2018).

2. Célkitűzések

Munkám során a BRAF mutáns daganatok gátlási lehetőségeit vizsgáltam monoterápia és kombinációs terápia segítségével, valamint a PI3K/Akt jelpálya szerepét a terápia választásban. A következőket tűztem ki célul.

1. A BRAF és BRAF mellett PI3K/PTEN mutációt hordozó daganatos sejtvonalak érzékenységének összehasonlítása a két jelpálya egyidejű gátlása esetén annak meghatározására, hogy a kettős mutáns sejteken a kombinációs gátlás terápia előnyt jelent-e.
2. Egy újonnan alapított, BRAF mutáns anaplasztikus pajzsmirigyák sejtvonal érzékenységének vizsgálata a RAS/RAF jelpálya gátlószereire egyszeres és kombinációs terápia alkalmazásával.
3. Két preniláció gátló vegyület, a hidrofil zoledronsav és a lipofil BPH1222 hatékonyságának összehasonlító vizsgálata különböző mutációs státuszú (BRAF-, BRAF+PTEN-, NRAS mutáns, vad) melanóma sejtvonalakon. Annak feltérképezése, hogy a lipofilabb karakterű hatóanyag kedvezőbb fizikai-kémiai tulajdonsági nagyobb tumor ellenes hatással járnak-e.

3. Módszerek

3.1 Sejtvonalak

A dolgozatban felhasznált humán daganatos sejtvonalak neve, szövettani eredete és származása az 1. táblázatban van összefoglalva. A táblázat továbbá tartalmazza a sejtek mutációs státuszát a RAS/RAF (RAS, BRAF) és PI3K/Akt (PI3K, PTEN) jelátviteli útvonalakra nézve a CCLE, COSMIC, ExPaSy adatbázisok alapján.

1. táblázat A dolgozatban felhasznált sejtvonalak adatai

Név	Szövettani eredet	Származás	Mutációk
BRAF mutáns sejtvonalak			
A375 (CRL-1619)	melanóma	ATCC	BRAF V600E
WM35	melanóma	Wistar	BRAF V600E
CRL5885 (NCI-H1666)	tüdő	ATCC	BRAF G466V
PF49	pajzsmirigy	Mellkassebészeti Osztály, Essen, Németország	BRAF V600E
BRAF+PI3K/PTEN kettős mutáns sejtvonalak			
SKMEL28 (HTB-72)	melanóma	ATCC	BRAF V600E PTEN T167A
A2058 (CRL-11147)	melanóma	ATCC	BRAF V600E PTEN null
WM239	melanóma	Wistar	BRAF V600D PTEN null
HT29 (HTB-38)	vastagbél	ATCC	BRAF V600E PI3K P449T
SW1417 (CCL-238)	vastagbél	ATCC	BRAF V600E delPI3KR1

NRAS mutáns sejtvonalak			
M24met	melanóma	Mueller et al. 1991	NRAS Q61R
WM3060	melanóma	Wistar	NRAS Q61K
RAS/BRAF/PI3K/PTEN vad sejtvonalak			
MEWO (HTB-65)	melanóma	ATCC	vad típus
VM47	melanóma	Rákkutató Intézet, Bécs, Ausztria	vad típus

A sejtvonalak normál légköri nyomáson, 37°C-on, 5%-os CO₂ koncentráció mellett, sejtenyésztő flasksokban voltak tartva. Továbbá, 10% FBS-el (Gibco-BRL Life Technologies, Egyesült Királyság) és 1% penicillin/sztreptomycin/amfotericin B antibiotikum kombinációval (Lonza, Bazel, Svájc) kiegészített, piruvát, L-glutamin és 4,5% glükóz tartalmú DMEM (Lonza) tápoldatban voltak tenyésztve. A sejtek mikoplazma mentességét MycoSensor PCR Assay Kit (#302108, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) segítségével ellenőriztük ABI PRISM 7000 Sequence Detection System műszeren (Thermo Scientific, Waltham, USA).

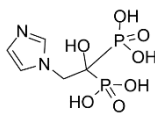
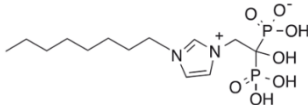
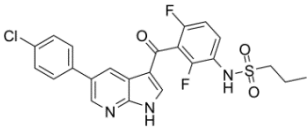
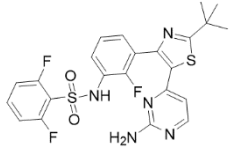
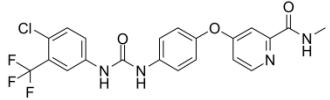
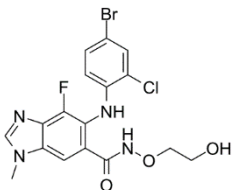
PF49 sejt vonal egy pajzsmirigyrákkal diagnosztizált 70 éves férfi beteg mellkasi folyadékgyüleméből lett alapítva. Röviden, 5ml folyadék minta 10 perc 1000×g centrifugálással való szétválasztása után a pellet 10 % FBS és 100 U/ml penicillin-sztreptomycin antibiotikumokat tartalmazó RPMI1640 médiummal lett felszuszpendálva, majd sejtenyésztő flasksóban 37°C-on, 5%-os CO₂ szint mellett lett inkubálva. A letapadt sejtek hatszor lettek passzálva a kísérletek elindítása előtt a nem tumoros sejtek kizárása céljából. A sejt vonal alapítását kollégáim a Duisburg-Essen Egyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával (#18-8208-BO), a Helsinki Nyilatkozattal összhangban hajtották végre.

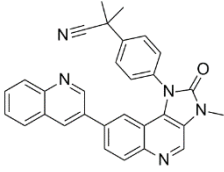
3.2 Kezelőanyagok

Kísérleteink során felhasznált kezelőanyagokat, tulajdonságait és származását a 2. táblázat foglalja össze. A vegyületeket, zoledronsav kivételével DMSO-ban (Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO) oldottuk 0,1-10 mM koncentrációban és -80°C-on tároltuk. A kísérletek során a sejteket ért legnagyobb DMSO terhelés 0,2% (*in vitro*) illetve 0,77% (*in vivo*) volt. A zoledronsav 4 mg/ml koncentrációban fiziológiás sóoldatban oldva volt tárolva 4°C-on.

2. táblázat Vizsgálatok során alkalmazott kezelőanyagok, célpontjaik, szerkezetük és származásuk.

Név	Célpont	Szerkezet	Származás
Zoledronsav (ZA)	fehérje preniláció		Novartis (Bázel, Svájc)
BPH1222 (BPH)	fehérje preniláció		szintézis: ELTE, Szerves Kémiai Intézet, (Budapest, Magyarország)
Vemurafenib	BRAF V600E		Selleck Chemicals (Houston, TX)
Dabrafenib	BRAF V600E		Selleck Chemicals
Sorafenib	pan-RAF		LC Laboratories (Woburn, MA)
Selumetinib	MEK1/2		Selleck Chemicals

BEZ235	PI3K/mTOR		Selleck Chemicals
--------	-----------	--	-------------------

3.3 Rövidtávú életképességi (SRB) teszt

A hatóanyagok sejtleletképességre kifejtett gátló hatását rövidtávon (72h) szulforodamin B (SRB) teszt segítségével vizsgáltuk meg. Röviden, 1000-6000 sejtet tettünk lyukanként egy 96 lyukú plate középső 60 lyukába, míg a szélső helyeket PBS-el töltöttük fel, a párolgás csökkentése céljából. A sejtek 24 óra alatt letapadtak, majd kezeltük őket az adott anyag meghatározott koncentrációival. 72 óra inkubálás után a kezelést leállítottuk: a médiumot eltávolítottuk, a sejteket az edény aljára fixáltuk 10%-os TCA (triklórecetsav) segítségével, majd megfestettük 0,4%-os SRB festékekkel. A nem kötődött festék 1%-os ecetsavval való eltávolítása után a sejtek fehérjéihez kapcsolt festéket 10 mM-os Tris-HCl pufferrel (pH=7,4) oldottuk be. Az oldat optikai denzitását 570 nm-en egy mikroplate leolvasó (EL800, Bio-Tec Instruments, Winooski, USA) segítségével mértük meg. Az így kapott abszorbancia értékek egyenesen arányosak a kezelés után életben maradt sejtek számával, így meghatározható az életképesség csökkenés, valamint az IC50 érték. Eredményeinket legalább három független mérés alapján határoztuk meg.

3.4 Hosszútávú klonogenitási teszt

A hatóanyagok sejtkolónia képződést gátló hatását 10 napos mérések segítségével határoztuk meg. Röviden, 6 lyukú edényekbe tettünk ki 1000-10000 sejtet lyukanként, majd a letapadt sejtekre, 24 óra elteltével, a hatóanyagokat megfelelő koncentrációban tartalmazó tápoldatot tettünk, amit 3-4 naponta cseréltünk friss oldatra. A kísérlet végén, 10 nap elteltével, a sejteket metanol:ecetsav 3:1 arányú elegyével az edény aljára rögzítettük, majd megfestettük 0,1%-os kristályibolya oldattal. A megkötött festéket 2%-os SDS (nátrium-dodecil szulfát) oldatba beoldottuk, majd 570 nm-en leolvastuk az optikai denzitás értékeket a mikro plate leolvasó segítségével, amiből meghatároztuk a

kolóniaképződés csökkenését kezelés hatására. Kísérleteinket legalább háromszor, egymástól függetlenül megismételtük.

3.5 Kombinációs kezelések és a kombinációs index (CI)

Kísérleteink során rövid- és hosszútávon is végeztünk kombinációs kezeléseket. A 4.1 fejezetben tárgyalt eredményeinket a selumetinib és BEZ235 30 különböző koncentrációjú kombinációjából, 10 napos kezelés után kaptuk. A vizsgálatok során 24 lyukú platekre tettünk ki lyukanként 250-4000 sejtet, melyet letapadás után megkezeltünk a kezelőanyagok 5 (BEZ235) és 6 (selumetinib) különböző koncentrációjának összes lehetséges (30 féle) kombinációjával. 10 nap után a 3.3 fejezetben leírtak alapján nyertük ki az életképességre vonatkozó adatokat.

A 4.2 fejezetben tárgyalt, selumetinib + vemurafenib kombinációra vonatkozó adatokat az alábbiak szerint kaptuk. 96 lyukú plate közepső 72 lyukába 2000-2000 sejtet tettünk ki, melyeket letapadás után vemurafenib és selumetinib 6-6 különböző koncentrációjának összes kombinációjával (36 féle) kezeltük 72 óráig, majd a 3.3 fejezetben leírtak alapján állítottuk le a kísérletet.

Életképességi adatokból, a Chou és Talalay által leírtak (Chou 2010) alapján a CompuSyn szoftver (ComboSyn Inc) segítségével számítottuk ki minden egyes koncentrációnál a kombinációs index (CI) értékeket. Röviden, a vakkal korrigált abszorbancia értékeket a mindenkori kontrollhoz viszonyítottuk. A legalább 3 független mérésből származó adatokat átlagoltuk, majd meghatároztuk a gátló hatást minden koncentrációnál, ami egy 0-1 közé eső szám volt. A nagyobb hatás 1 körüli, a kisebb 0 körüli értéknek adódott. Ezen adatokat tápláltuk a programba, mely kiszámította a CI értékeket. Szinergistának mondunk egy kombinációs hatást, ha $CI < 1$, additívnek, ha $CI \approx 1$, és antagonistának, ha $CI > 1$.

3.6 Háromdimenziós (3D) szferoid vizsgálatok

Háromdimenziós szferoid vizsgálatokhoz előzetesen felületkezelt U aljú 96 lyukú platet használtunk, melynek aljára nem tapadnak le a sejtek és így nem képeznek egyrétegű sejt kultúrát. A 4.1 fejezetben polyHEMA-val (5 mg/ml) (Sigma-Aldrich) vontuk be az U

aljú 96 lyukú plate alját (Sarstedt, Nümbrecht, Németország), majd 1000-1000 sejtet tettünk az edény középső 60 lyukába, a külsőkbe pedig PBS-t, a párolgás csökkentése érdekében. WM239 sejtvonala esetén 1% Matrigel (Growth Factor Reduced, Corning, USA, New York), a HT29 esetén pedig 1% Matrigel és 10 μ g/ml kollagén (Corning) hozzáadásával segítettük a szferoid képződését. 96 óra után, a kialakult szferoidokhoz a hatóanyagok megfelelő koncentrációját tartalmazó tápoldatot adtuk. Hat nap után a kísérletet leállítottuk és 10 μ l/lyuk CCK8-at adtunk (Dojindo, Kumamoto, Japan), majd a megváltozott optikai denzitást 4 óra inkubálás után 450 nm-en olvastuk le és meghatároztuk a szferoid sejtjeinek életképesség változását. A szferoidokról a 0., 3. és 6. napon fényképeket készítettünk 4x objektívvel, melyeket ImageJ program segítségével értékeltünk ki. A képekről meghatároztuk a szferoidok átmérőjét, amiből a $4/3 \times \pi \times \text{sugár}^3$ képlet segítségével kiszámítható a szferoidokkal egyenértékű gömb térfogata.

A 4.3 fejezetben szereplő háromdimenziós kísérletekhez ULA (Ultra Low Attachment) (Corning Incorporated, Corning, NY) plateket használtunk. Az itt alkalmazott függőcseppe módszer lényege, hogy 50-200 sejtet tettünk egy-egy 6 μ l méretű cseppbe a 96 lyukú edény fedelének belső 60 lyukára, majd megfordítva a fedelet a plate fölé helyeztük. A tetőről függő cseppekben a sejtek nem tapadtak aljzathoz, csak egymáshoz így kialakítva a szferoidokat 4-7 nap alatt. A megfelelő méretű szferoidokat az ULA platekbe helyeztük át oly módon, hogy a 96 lyukú edény belső 60 lyukát feltöltöttük médiummal, így a ráhelyezett fedő szferoid tartalmú cseppei összeolvadtak a lyukakban levő folyadékkal. Miután a szferoidok lesüllyedtek az edény aljára, 100 μ l tápot eltávolítottunk a lyukakból. A kezelés 100 μ l felülúszó eltávolítása után 100 μ l kétszeres koncentrációjú hatóanyag tartalmú táp hozzáadásával történt minden harmadik napon 6-12 napon keresztül. A szferoidokat minden harmadik napon lefényképeztük és a fényképeket értékeltük a fent leírtak szerint. Kísérleteinket minden esetben legalább háromszor, egymástól függetlenül elvégeztük.

3.7 Sejtmozgás vizsgálat

A hatóanyagok sejtek mozgására kifejtett hatását egy egyedi tervezésű videomikroszkóp (World Precision Instruments, Sarasota, FL) segítségével mértük meg. Röviden, egy 24 lyukú plate középső 12 lyukába tettünk ki sejteket, majd 24 óra inkubálás után a tápot

lecsereeltük CO₂ független médiumra (Gibco), melyet 10% FBS-el és 4 mM glutaminnal egészítettünk ki. A mérés során a sejtek 37°C-on, normál légköri nyomáson voltak inkubálva a megfelelő hatóanyag tartalmú médiumban. A kezelést követően 10 percenként készült fénykép a sejtekről, lyukanként három, előre kiválasztott, nem átfedő látótérből. Az elkészült képeket egy sejt követő program (PPKE ITK, Budapest, Magyarország) segítségével értékeltük ki, látóterenként körülbelül 30 sejt mozgását követve a kezelést követő első 24 órában. A sejtek nettó elmozdulását legalább két független mérésből, három független látótér adatainak átlagából határoztuk meg.

3.8 Immunoblot vizsgálatok

Kezelés hatására a sejtekben megváltozott fehérje kifejeződést immunoblot segítségével határoztuk meg. Vizsgáltuk a RAS/RAF, valamint a PI3K/Akt jelátviteli útvonalak fontos fehérjéit (Erk, S6, Akt, Rheb), valamint az apoptózis marker hasított-PARP/PARP és a proliferációs marker PCNA fehérjéket is. Továbbá vizsgáltuk a 4.1 fejezetben tárgyalt kettős mutáns sejtek PTEN, EGFR, MET, Erk, Akt és S6 fehérjéinek alapaktivációját. Kísérletek során $1-3 \times 10^5$ sejtet tettünk ki 6 lyukú edényekbe, melyeket célnak megfelelően 4 vagy 48 óráig kezeltünk. A selumetinib és BEZ235 jelátviteli fehérjék aktivációjára kifejtett hatását 4 óra kezelés után vizsgáltuk meg, míg a PCNA és PARP fehérjékre való befolyását 48 óra után detektáltuk. Ugyanakkor a hatásukat lassabban kifejtő biszfoszfonátok (ZA és BPH) jelátviteli és PARP fehérjékre való hatását egyaránt 48 óra kezelés után vizsgáltuk. A sejtekben levő fehérjéket a kezelés után 1 órán keresztül alkalmazott 4°C-os 6%-os TCA segítségével csaptuk ki, majd a plate aljáról felkapartuk a fixált mintát és Eppendorf csövekbe gyűjtöttük. A 48 óráig kezelt minták esetében a felülúszót, és így a médiumban úszó sejteket is begyűjtöttük, a bennük levő fehérjéket kicsaptuk. Az Eppendorf csövekben a kicsapott fehérje mintákat 4°C-on 15 percig 3500 rpm-en centrifugáltuk, a felülúszó TCA-t eltávolítottuk, a pelletet pedig SSP pufferben oldottuk be (10% glicerin, 2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl (pH=6,8), 125 mg/ml karbamid, 5 mM EDTA, 0,14 mg/ml brómfenol kék és 10 mM ditiotritol). A fehérje oldatok koncentrációját Qubit protein assay kit (Thermo Scientific) segítségével határoztuk meg, majd 25 µg fehérjét töltöttünk 10%-os poliakrilamid gélekbe. A fehérjéket gélelektroforézissel választottuk el egymástól méretük alapján, majd PVDF

membránokra (Thermo Scientific) vittük át őket. A következő elsődleges antitesteket alkalmaztuk 1:1000 hígításban 4 °C-on, egy éjszakán át: PARP, PCNA, p-Akt (Ser473)/Akt, p-Erk1/2(Thr202/Tyr204)/Erk1/2, p-S6(Ser235/236)/S6, Rheb, PTEN, p-MET(Tyr1234/1235), MET és EGFR (Cell Signaling; sorban: #9542, #13110, #4058, #9272, #9101, #9102, #2215, #2217, #13879, #9188, #3077, #8198, #4267). Kontrollként β -tubulin és GAPDH ellenanyagokat használtunk (sorban: (Abcam, ab6046, Cell Signaling #5174. Ezután HRP-kötött nyúl ellenes másodlagos antitestet (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) használtunk 1:10000 arányban hígítva szobahőmérsékleten 1 órán keresztül. A fehérjéket Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) segítségével tettük láthatóvá CL-XPosure Film (Thermo Scientific), valamint alkalmanként G-Box Chemi XR5 (Synoptics Group, Cambridge, Egyesült Királyság) műszer felhasználásával. A nyert jeleket ImageJ program segítségével kvantifikáltuk a kontrollhoz vagy Ponceau festéshez viszonyítva. Eredményinket legalább három független kísérletből határoztuk meg.

3.9 Sejtciklus vizsgálatok

A sejteknek a sejtciklus különböző szakaszaiban (subG1, G0/G1, S, G2/M) való eloszlásának kezelés hatására bekövetkező változását vizsgáltuk DNS tartalom alapján. Röviden, 6 lyukú edényekbe tettünk $1-2 \times 10^5$ /lyuk sejtet, majd 72 óráig kezeltük őket. A kísérlet végén mind a letapadt, mind a médiumban levő sejteket begyűjtöttük, majd 5 percig 37 °C-on DAPI tartalmú lízispuffer segítségével lizáltuk. Ezután stabilizáló pufferrel állítottuk le a folyamatot, és a mintákat a NucleoCounter NC-3000™ műszerrel analizáltuk. Vizsgálatainkat egymástól függetlenül legalább 2-3 alkalommal elvégeztük.

3.10 *In vivo* kísérletek

Állatkísérleteinket az Országos Onkológiai Intézet Kísérletes Farmakológia osztályán végeztük el, összhangban az állatkísérletek iránymutató szabályzatával (engedélyszám: PEI/001/2574–6/2015). A kísérletek során szubkután xenograft modelleket hoztunk létre a sejtek nőstény egerekbe oltásával. A 4.1 fejezetben 2×10^6 SW1417 sejtet NOD-SCID egerekbe oltottunk, majd 13 nappal később megkezdtük a kezelést. Az egereket 4

csoportba osztottuk (n=9-10): kontroll (vivőanyagok), selumetinib 25mg/kg, BEZ235 15mg/kg, kombináció. A hatóanyagokat a gyártó ajánlása alapján oldottuk be (selumetinib: DMSO, PEG300, H₂O – 5:72:23; BEZ235: NMP, PEG300 – 10:90), majd hétköznaponként, naponta egyszer, szájon át adagoltuk az egereknek 17 napig. Az egerek testtömege heti kétszer, a tumorok mérete heti háromszor lett mérve, utóbbi kaliper segítségével. A leírt hosszúsági és szélességi adatok alapján kiszámoltuk a tumorok térfogatát a forgási ellipszoidra vonatkozó képlet alapján (szélesség² × hosszúság × π / 6). A kísérlet végén az egereket termináltuk, a kimetszett tumorok tömegét pedig lemértük. A 4.3 fejezetben 1,5×10⁶ M24met sejtet oltottunk SCID egerekbe, majd 7 nap múlva megkezdtük a kezelést, amely 23 napig tartott. Az egereket 3 csoportba osztottuk (n=10) és kezeltük őket 0,9% NaCl (kontroll), ZA 1,47 μmol/kg és BPH 1,47 μmol/kg anyagokkal intraperitoneálisan. A testtömeget és a tumorok méretének meghatározását a kezelések napján, hetente kétszer végeztük. A tumor térfogatot a fent leírtak alapján számítottuk ki, a tumorok tömegét pedig a kezelés utolsó napján mértük le az állatok terminálása után.

3.11 Statisztika

Statisztikai vizsgálatainkat minden esetben a GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA) program segítségével végeztük el. Statisztikailag szignifikáns különbségeket a következőképpen jelöltük: * p < 0,05, ** p < 0,01 és *** p < 0,001. Kétutas ANOVA, valamint nem parametrikus Kruskal-Wallis tesztek és Bonferroni, illetve Dunn féle poszt-hoc vizsgálatokat alkalmaztunk biszfoszfonátok rövid- és hosszútávú életképességre való hatásának összehasonlítására. Egy mintás t-próbával határoztuk meg a statisztikai szignifikanciát a kombinációs kezelések additív és szinergista hatása között. Egyutas ANOVA tesztet használtunk Dunnett és Tukey féle poszt-hoc vizsgálatokkal a sejtmozgásra, sejtciklusra és fehérje expresszióra kifejtett hatások összehasonlítására. Nem parametrikus, valamint egyutas, ismétlődő mérések ANOVA tesztet használtunk Tukey poszt-hoc tesztel háromdimenziós és *in vivo* kísérleteink értékelésénél.

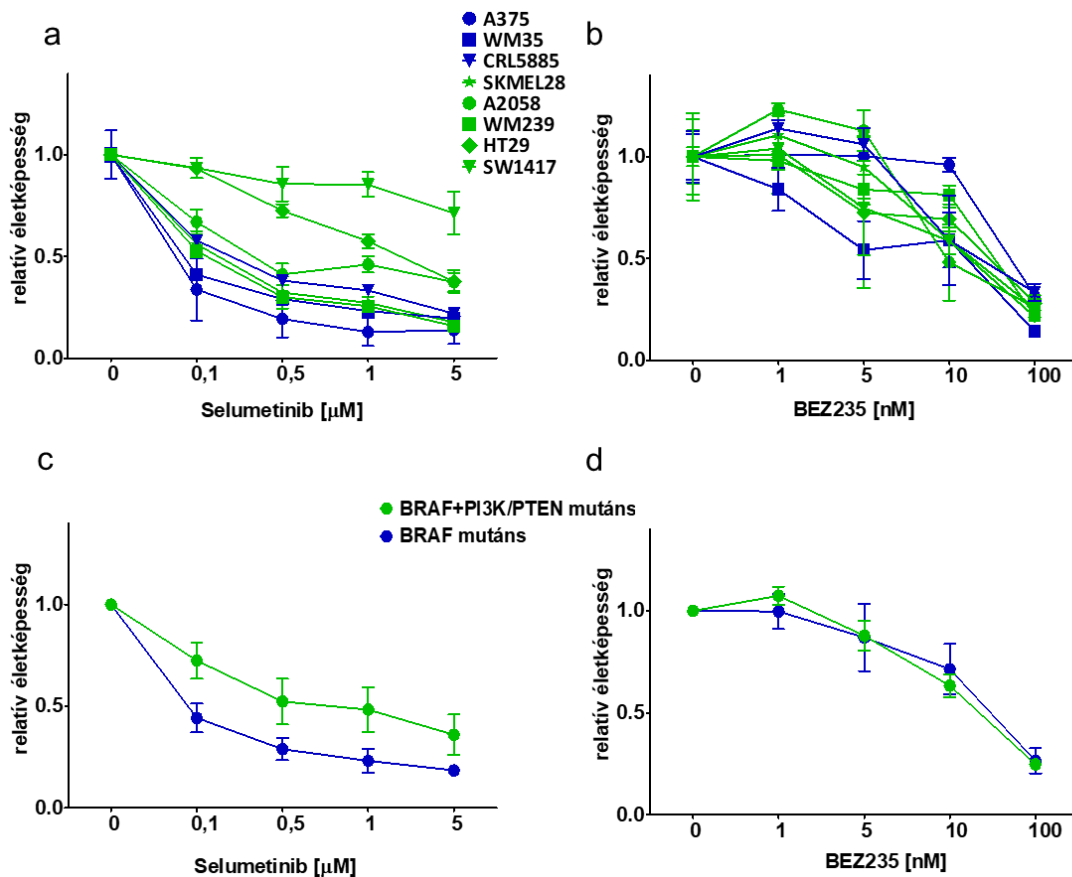
4. Eredmények

4.1 MEK és PI3K/mTOR egyidejű gátlásának vizsgálata BRAF és BRAF+PI3K/PTEN mutációt hordozó sejtvonalakon

Vizsgálatainkba nyolc humán daganatos sejtkultúrát vontunk be, melyek közül három BRAF mutáns (A375, WM35, CRL5885), három BRAF+PTEN mutáns (SKMEL28, A2058, WM239) és kettő BRAF+PI3K (HT29, SW1417) mutációt hordoz. Kísérleteinkben összehasonlítottuk sejteink érzékenységét a MEK gátló selumetinib és a PI3K/mTOR gátló BEZ235 anyagok egyszeres és kombinációs kezelésével szemben, hogy megvizsgáljuk a kombinációs terápia kettős mutáns sejtekre vonatkozó előnyeit.

4.1.1 Selumetinib és BEZ235 életképességre kifejtett hatásának vizsgálata rövid- és hosszútávon

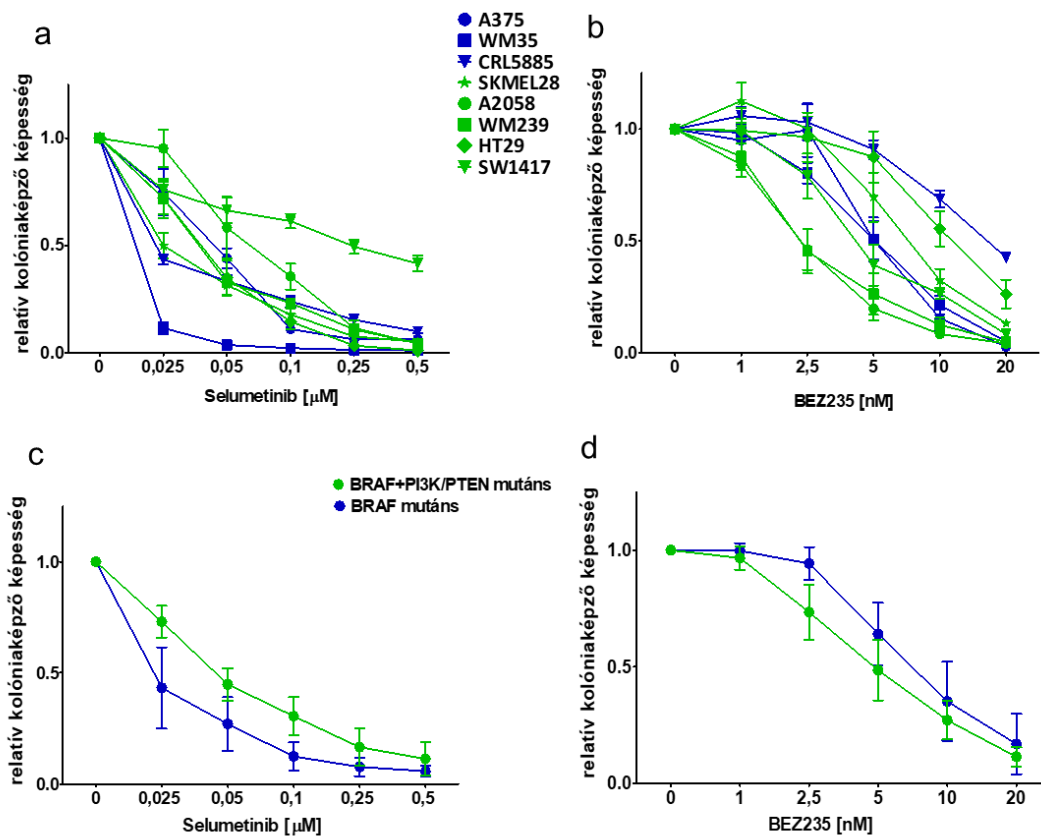
Rövidtávú (72h) SRB- és hosszútávú (10 nap) klonogenitási tesztek végeztünk a sejtvonalak hatóanyagokkal szembeni érzékenységének meghatározására. Eredményeink megmutatják, hogy a MEK inhibitor selumetinib nagyobb gátló hatást fejtett ki rövidtávon a csak BRAF mutációt hordozó sejteken, szemben a BRAF mellett PI3K/PTEN mutációt is hordozó vonalakkal (5. ábra a, c). Érdekes, hogy a kettős mutáns sejtek közül a BRAF mellett PTEN mutációt hordozó sejtek sokkal érzékenyebbek adódtak a kezelésre, mint a BRAF+PI3K mutációt hordozó HT29 és SW1417 sejtvonalak. Ugyanakkor a BEZ235 kezelésre a mutációs státusztól független választ figyeltünk meg (5. ábra b, d), ahogy az az IC₅₀ értékeken is látszik (3. táblázat). Selumetinib hosszútávú kezelésének eredményei megmutatták, hogy a csak BRAF mutáns sejtek érzékenyebbek voltak a kettős mutánsokkal szemben, valamint, hogy az SW1417 sejtvonal adódott legrezisztensebbnek a vizsgált vonalak közül (6. ábra a, c). Továbbá hosszútávú BEZ235 kezelésre nagyobb érzékenységet mutattak a kettős mutáns sejtvonalak a csak BRAF mutánsokhoz képest (6. ábra b, d).



5. ábra (a,b) Selumetinib és BEZ235 hatóanyagok rövidtávú (72h) kezelésének hatása a vizsgált sejtvonalakon. (c,d) BRAF és BRAF+PI3K/PTEN mutáns sejtek átlagos érzékenysége selumetinib illetve BEZ235 hatóanyagokkal szemben 72 óra kezelés után. A csak BRAF mutáns sejtek kékkel, a kettős mutáns sejtek zölddel vannak jelölve. Az adatok átlagokat jelölnek \pm SEM.

3. táblázat Kezelőanyagokra vonatkozó IC₅₀ értékek 72 óra életképességi értékek alapján

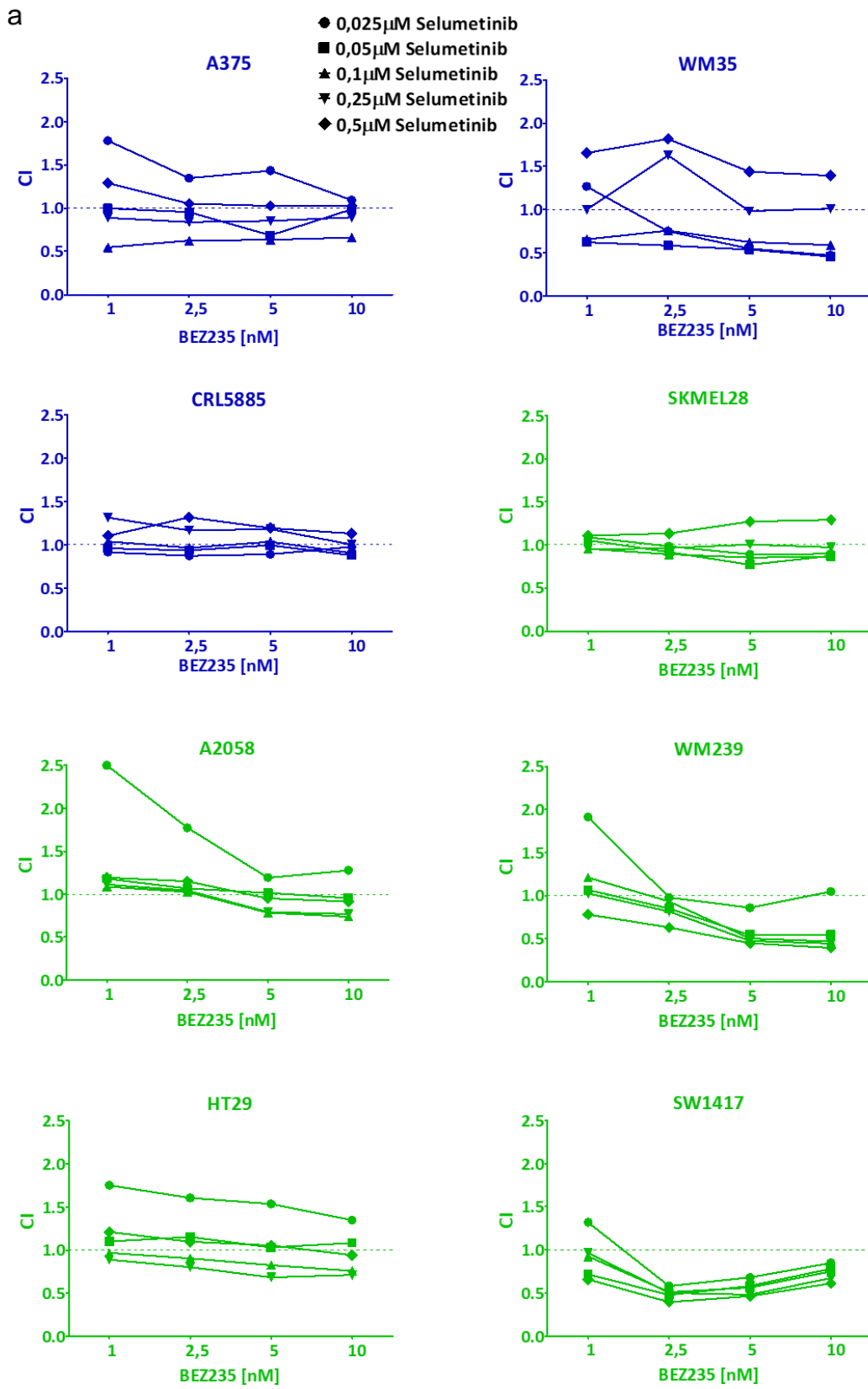
IC ₅₀	A375	WM35	CRL 5885	SKMEL28	A2058	WM239	HT29	SW1417
Selumetinib (μM)	0,05	0,09	0,23	0,17	0,58	0,14	2,03	>5
BEZ235 (nM)	62,4	10,3	25,2	19,3	9,0	32,4	26,4	16,1

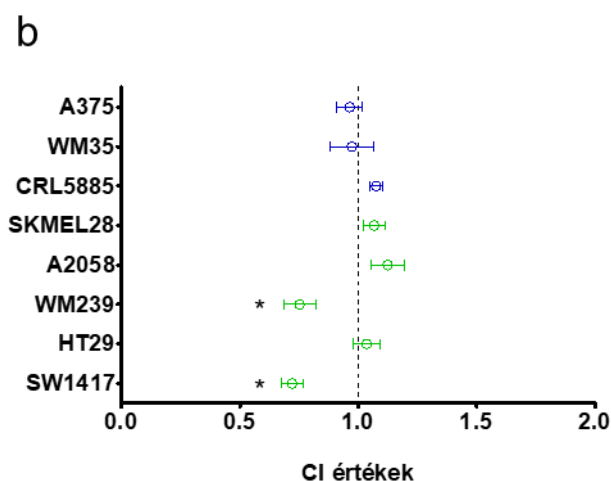


6. ábra (a, b) Selumetinib és BEZ235 hosszútávú (10 nap) kolóniaképződés gátló hatása a sejtvonalakra. (c, d) Selumetinib és BEZ235 átlagos hatása a két mutációs csoportba sorolt sejtekre. A csak BRAF mutáns sejtek kézzel, a kettős mutáns sejtek zölddel vannak jelölve. Az adatok átlag \pm SEM jelölik.

4.1.2 A hosszútávú kombinációs kezelés hatása

Megvizsgáltuk a selumetinib és BEZ235 anyagok kombinációjának hatását hosszútávon (10 nap) 30 különböző koncentrációnál és az életképességi eredményekből a CompuSyn program segítségével kombinációs indexeket (CI) számoltunk (7. ábra). Az eredmények megmutatták, hogy a legtöbb sejtre a két hatóanyag kombinációja additív hatást fejtett ki ($\text{CI} \approx 1$). Kivételt képeznek a WM239 és az SW1417 sejtvonalak, melyek esetében számos kombinációs koncentrációnál szinergista hatás volt mérhető ($\text{CI} < 1$). Utóbbi sejtek esetén az átlagos kombinációs index érték szignifikánsan kisebb volt egynél ($p < 0,05$) (7. ábra b).

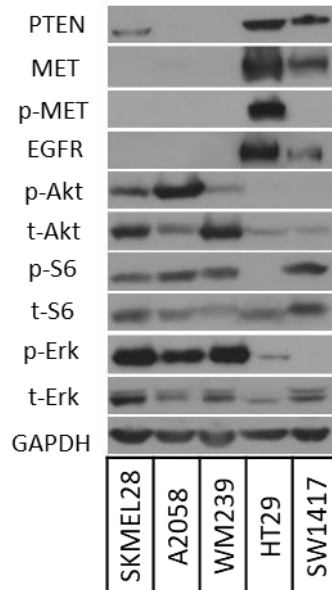




7. ábra (a) Kombinációs index (CI) értékek a jelölt koncentrációknál hosszútávú kezelés után a vizsgált sejtvonalakon. (b) Átlagos kombinációs index (CI) értékek \pm SEM. A csillagok szignifikáns különbséget jelölnek a szinergista ($CI < 1$) és additív ($CI \approx 1$) hatás között, * $p < 0,05$.

4.1.3 Kettős mutáns sejtek egymáshoz viszonyított fehérje alapaktivációs szintje

Megvizsgáltuk immunoblot segítségével az öt kettős mutáns sejt (SKMEL28, A2058, WM239, HT29, SW1417) egymáshoz viszonyított fehérje aktivációs szintjét az alábbi fehérjékre vonatkoztatva: EGFR, MET, PTEN, Akt, Erk, S6. Eredményeink megmutatták, hogy az EGFR szint a BRAF+PI3K mutáns vastagbélrák daganatsejtekben magasabb, mint a BRAF+PTEN mutáns melanóma sejtvonalakban (8. ábra). A MET expressziója szintén a két vastagbélrák vonalban volt markánsabb, míg az aktivált MET szintje a sejtek közül a HT29-ben volt jelentős. Ezen eredményekhez hozzájárulhat részben a sejtek mutációs státusza (BRAF+PTEN vagy BRAF+PI3K), részben pedig a szövettani eredetük (melanóma vagy vastagbélrák). Továbbá azt találtuk, hogy a p-Erk szint a vizsgált vonalak közül a selumetinibre érzékenyebb, PTEN mutánsokban volt magasabb. Mindemellett, bár a p-Akt szint is a PTEN mutáns sejtekben volt magasabb, ugyanakkor a p-S6 a HT29 kivételével hasonló mértékben volt jelen a sejtekben. Utóbbi eredmények magyarázhatják a sejtek BEZ235 kezeléssel szembeni hasonló érzékenységüket.



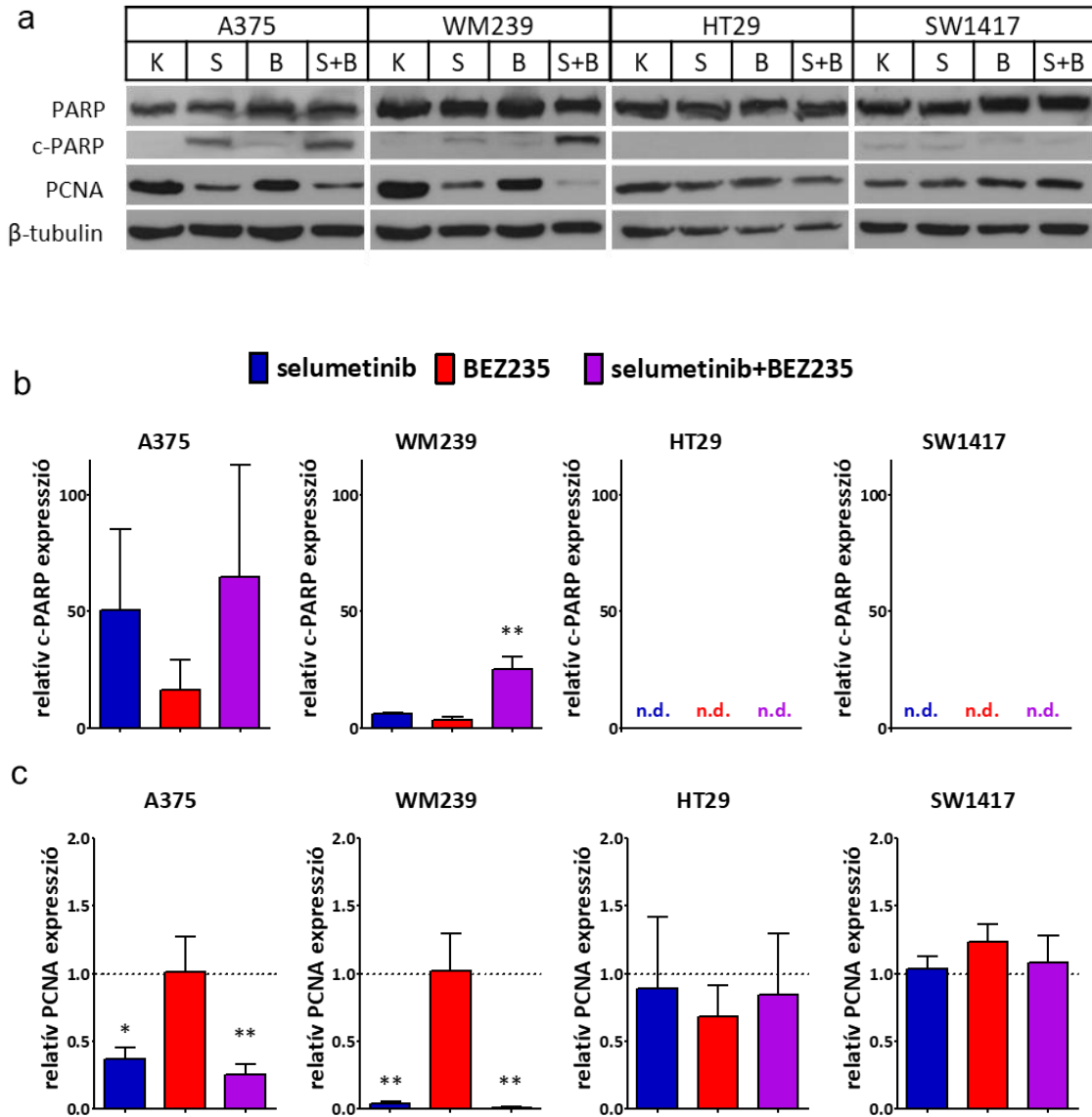
8. ábra Reprezentatív western blot ábrák az öt kettős mutáns sejt fehérje alapaktivációs szintjére vonatkozóan.

4.1.4 Egyszeres és kombinációs kezelés apoptózis indukcióra, proliferációra, valamint jelátviteli fehérjék aktivitására kifejtett hatásának vizsgálata

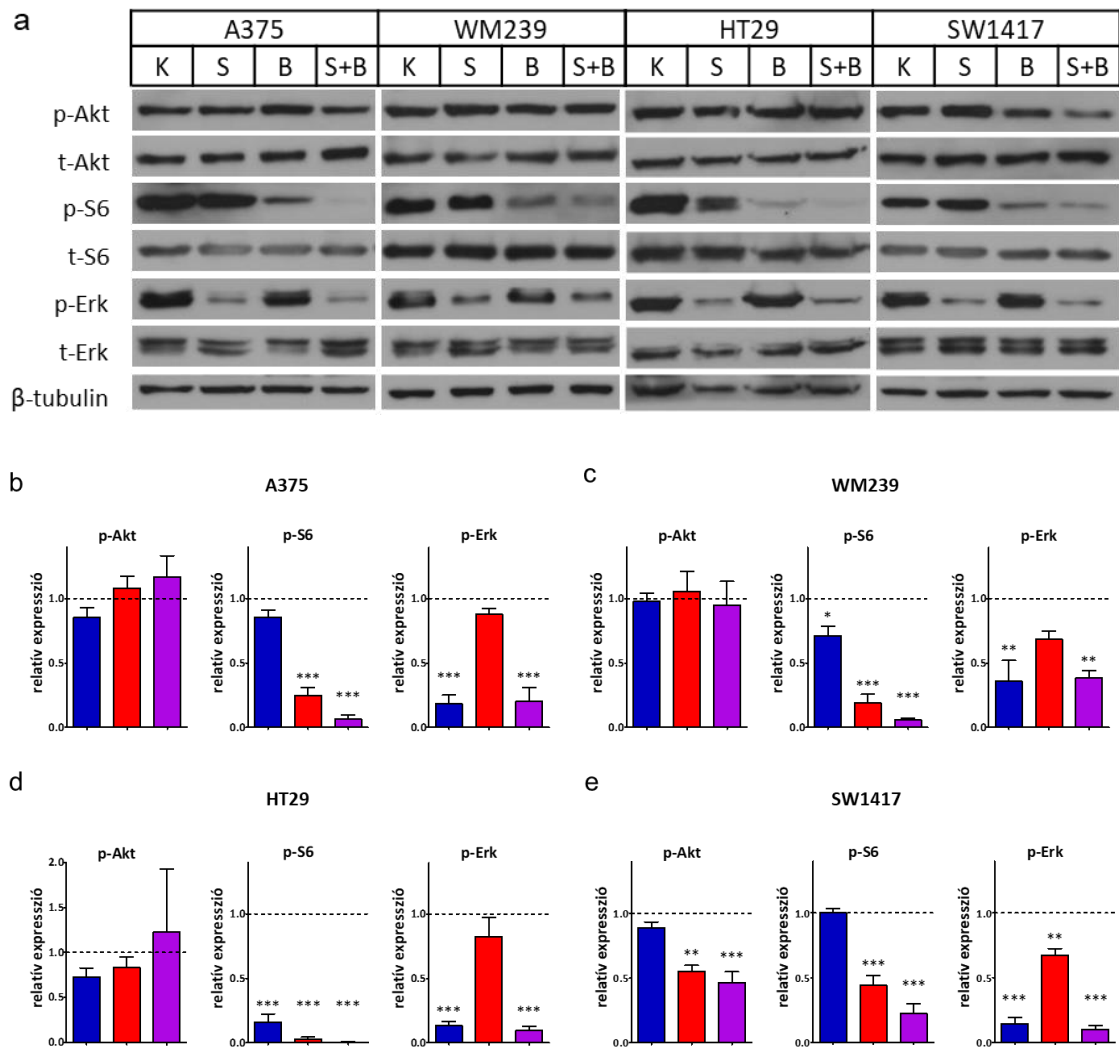
Ezen vizsgálatainkba három kettős mutáns (WM239, HT29, SW1417) és egy BRAF mutáns (A375) vonalat vontunk be, melyek közül kettőben mutattunk ki korábban szinergista kombinációs hatást (WM239, SW1417), kettőben pedig additív (A375, HT29). Vizsgáltuk az apoptózis marker hasított PARP (c-PARP) jelenlétét, valamint a proliferációs marker PCNA fehérje változását 48 óra kezelés hatására (9. ábra). Eredményeink alapján mind az A375, mind a WM239 sejtvonalakban megjelent a hasított PARP, valamint lecsökkent a PCNA expresszió selumetinib és selumetinib+BEZ235 kezelés hatására. Érdekes ugyanakkor, hogy sem a HT29, sem pedig az SW1417 sejtvonalban nem mutattuk ki a c-PARP megjelenését vagy a PCNA fehérje csökkenését kezelés hatására.

Vizsgáltuk továbbá a 4 órás kezelés hatására végbemenő változásokat a RAS/RAF és a PI3K/Akt útvonal fontosabb fehérjéinek (Erk, Akt, S6) aktivációjában (10. ábra). Eredményeink azt mutatták, hogy mind a négy sejtben lecsökkent az Erk aktivációs szintje selumetinib és kombinációs kezelés hatására, valamint az S6 aktivációs szintje BEZ235 és kombináció hatására. Érdekes, hogy a p-Akt szint nem változott jelentősebb

mértékben a sejtekben egyik kezelés hatására sem, kivéve az SW1417 sejtvonalat, ahol a kombinációs kezelés után csökkenést detektáltunk az aktivált Akt fehérje szintjében.



9. ábra c-PARP és PCNA vizsgálata 48 órás kezelés után 100nM selumetinib (S), 10nM BEZ235 (B) vagy ezek kombinációja (S+B) alkalmazásával. Reprezentatív immunoblot képek (a) valamint kvantitatív elemzések eredményei (b). Adatok jelentése átlag \pm SEM. A csillagok szignifikáns különbséget jelölnek a kontroll (1) és az adott érték között, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$



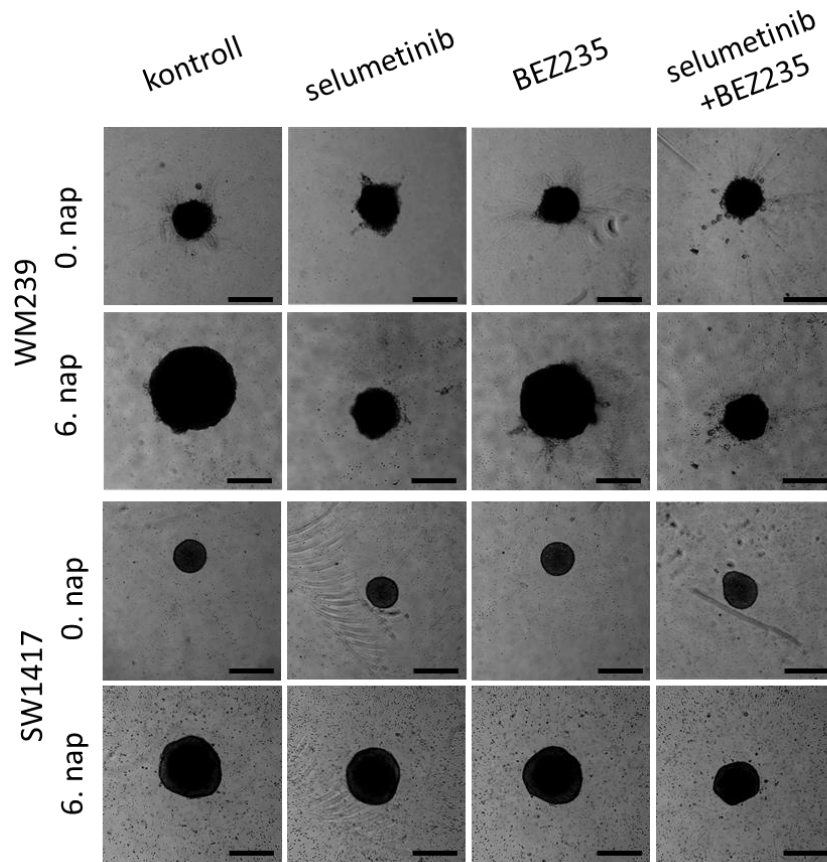
10. ábra Jelátviteli fehérjék (Akt, S6, Erk) aktivációjának változása 4 órás kezelés hatására 50nM selumetinib (S), 5nM BEZ235 (B) vagy kombinációjuk (S+B) felhasználásával. Reprerentatív blottok (a) és a kvantitatív elemzés eredményei (b-e). Az adatok átlag \pm SEM, a csillagok szignifikáns különbséget jelölnek a kontroll (1) és az adott érték között, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$.

4.1.5 Kezelőanyagok egyszeres és kombinációs hatásának vizsgálata 3D szferoid növekedés mérésével

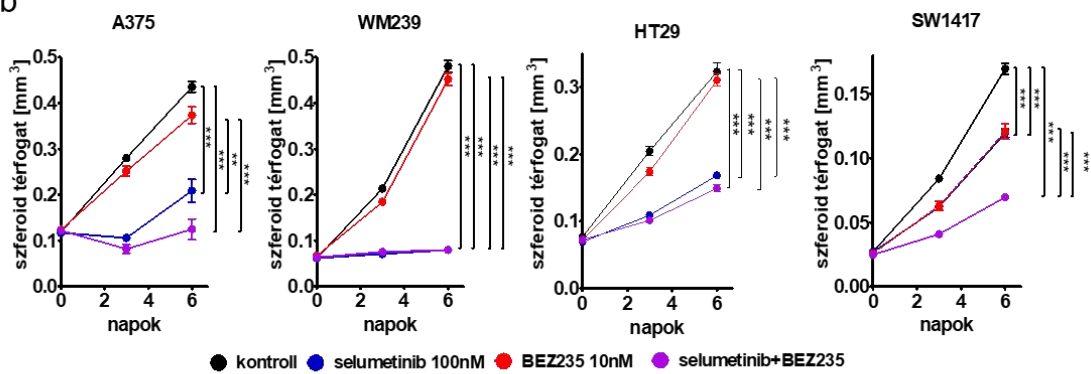
A szferoid növekedés gátlást vizsgáltuk négy sejtvonalon, melyek közül kettő esetén tapasztaltunk szinergizmust (WM239, SW1417) és kettő esetén additív hatást (A375, HT29) a 2D kombinációs kezelésekkor. Reprerentatív képek mutatják a WM239 és az SW1417 szferoidokat a kezelés első és hatodik napján (11. ábra a). Eredményeink alapján

elmondható, hogy a selumetinib és a selumetinib+BEZ235 kezelés minden sejtvonal esetén szignifikánsan csökkentette a szferoid növekedést (11. ábra b). A kombinációs kezelés hatékonyabbnak bizonyult egy kis mértékben az A375 és a HT29 sejtvonalakon, azonban szignifikánsan csak az SW1417 sejtvonalon volt nagyobb hatása. CCK8-al a kezelések utolsó napján mért adataink hasonló eredményt mutattak (11. ábra c). Látható, hogy legnagyobb mértékben az A375 sejtvonal szferoidjaiban csökkent le az életképesség selumetinib és kombinációs kezelés hatására. Továbbá egyedül az SW1417 sejtvonalnál volt szignifikánsan nagyobb hatás a kombinációs kezelés után, mint bármely egyszeres kezeléskor.

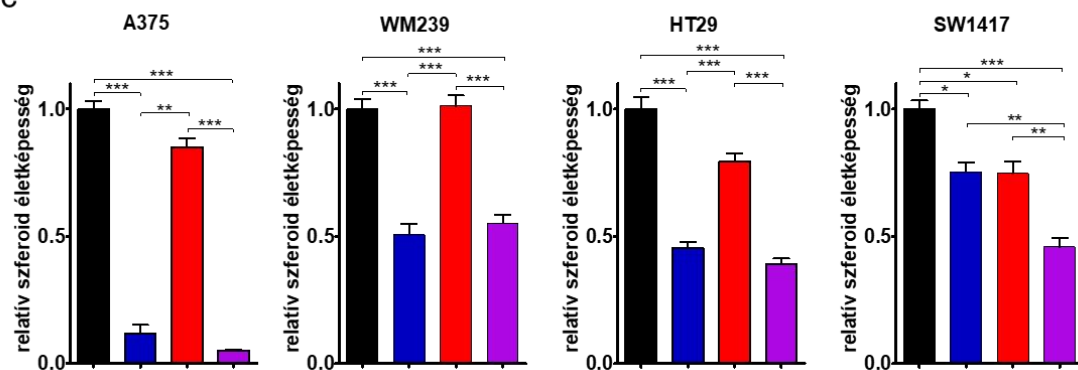
a



b



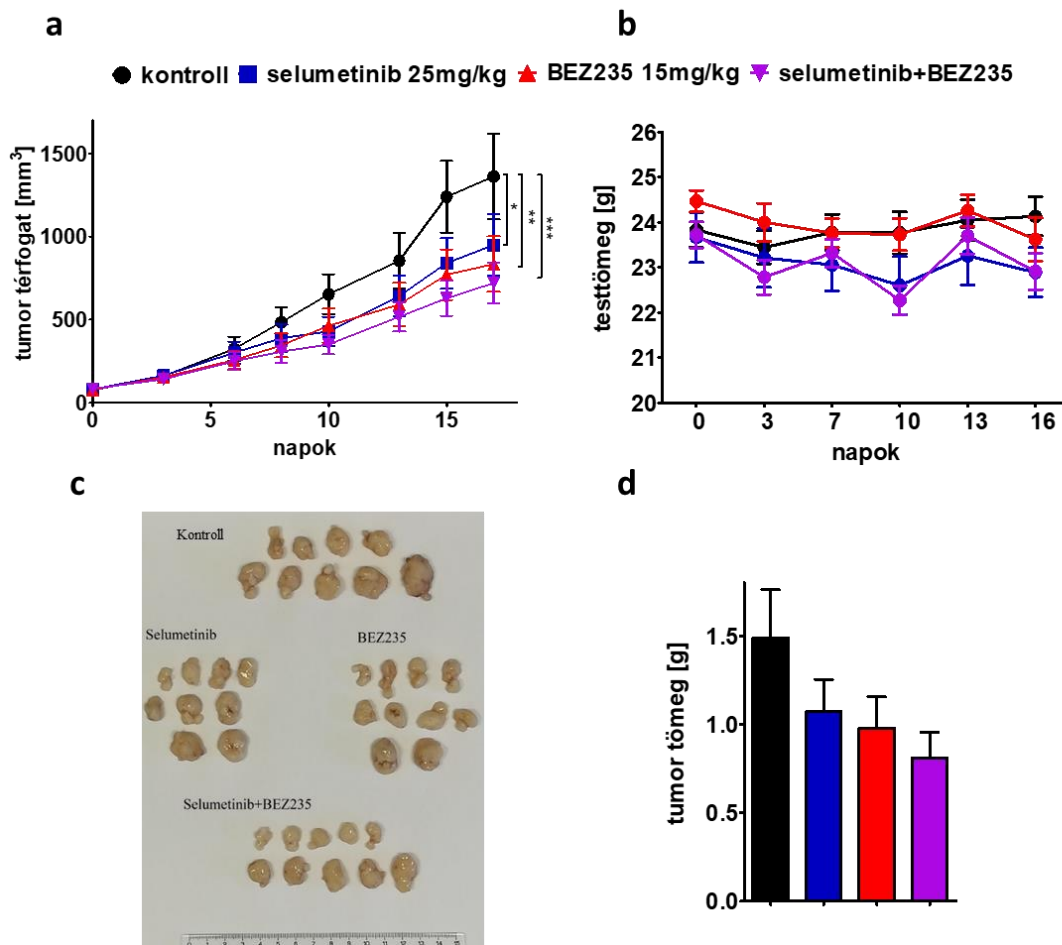
c



11. ábra (a) Reprezentatív fényképek az SW1417 és WM239 sejtek szferoidjairól a kezelés első és utolsó napján (a skála 500 μ m). (b) Szferoid térfogat változás 6 napos kezelés során a jelölt hatóanyagokkal. (c) Szferoidokban levő sejtek életképességének vizsgálata CCK8 segítségével a kezelés utolsó napján (6. nap). Adatok átlag \pm SEM. A csillagok szignifikáns különbséget jelölnek, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$.

4.1.6 Kombinációs kezelés tesztelése *in vivo* kísérletben SW1417 sejtvonalon

SW1417 sejtvonalat oltottuk be szubkután NOD-SCID nőstény egerekbe, hogy a sejtvonalon *in vitro* eredményeit *in vivo* körülmények között is validáljuk. A létrehozott xenograft modellt 17 napon keresztül hétköznaponként napi egyszer per os kezeltük 25mg/kg selumetinib, 15mg/kg BEZ235 hatóanyag és ezek kombinációjával. Eredményeink megmutatták, hogy mindkét hatóanyag szignifikáns gátló hatást fejtett ki a tumor térfogat növekedésre a kontroll csoporthoz képest. Ugyanakkor a legnagyobb gátlást a kombinációs terápia eredményezte, mely a kezelés kezdetétől fogva végig hatékonyabb volt bármely monoterápiánál (12. ábra a). A kísérlet során az állatok testtömege nem változott meg jelentős mértékben egyik kezelőanyag alkalmazásának hatására sem (12. ábra b). Az állatokból eltávolított tumorokat mutatja a 12. ábra c része kezelési csoportonként rendezve, ahol szemmel látható, hogy a legtöbb kis méretű tumor a kombinációs csoportban volt. Továbbá a tumortömegek átlaga is a kombinációs csoportban adódott legkisebbnek (12. ábra d).



12. ábra (a-b) Tumor térfogat (a), valamint testtömeg változás (b) SW1417 xenograft modellen a jelölt kezelőanyagok alkalmazásának hatására. A csillagok szignifikáns különbséget jeleznek a kontroll és a kezelt csoportok között, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$. (c-d) Kísérlet végén az állatokból eltávolított tumorok (c) és azok átlagos tömege (d) kezelési csoportonként ($n=9-10$). Az adatok átlag \pm SEM jelölnek.

4.2 Egy újonnan alapított BRAF mutáns anaplasztikus pajzsmirigyrák sejtvonala (PF49) vizsgálata

A BRAF V600E mutációt hordozó anaplasztikus pajzsmirigyrák sejtvonala PF49 érzékenységét RAF, BRAF és MEK gátlókkal szemben teszteltük (sorafenib, vemurafenib, dabrafenib, selumetinib), továbbá megvizsgáltuk a selumetinib + vemurafenib kombinációs terápia hatását a sejt életképességére, illetve migrációs kapacitására.

4.2.1 Beteg történet és sejtvonal karakterizálás

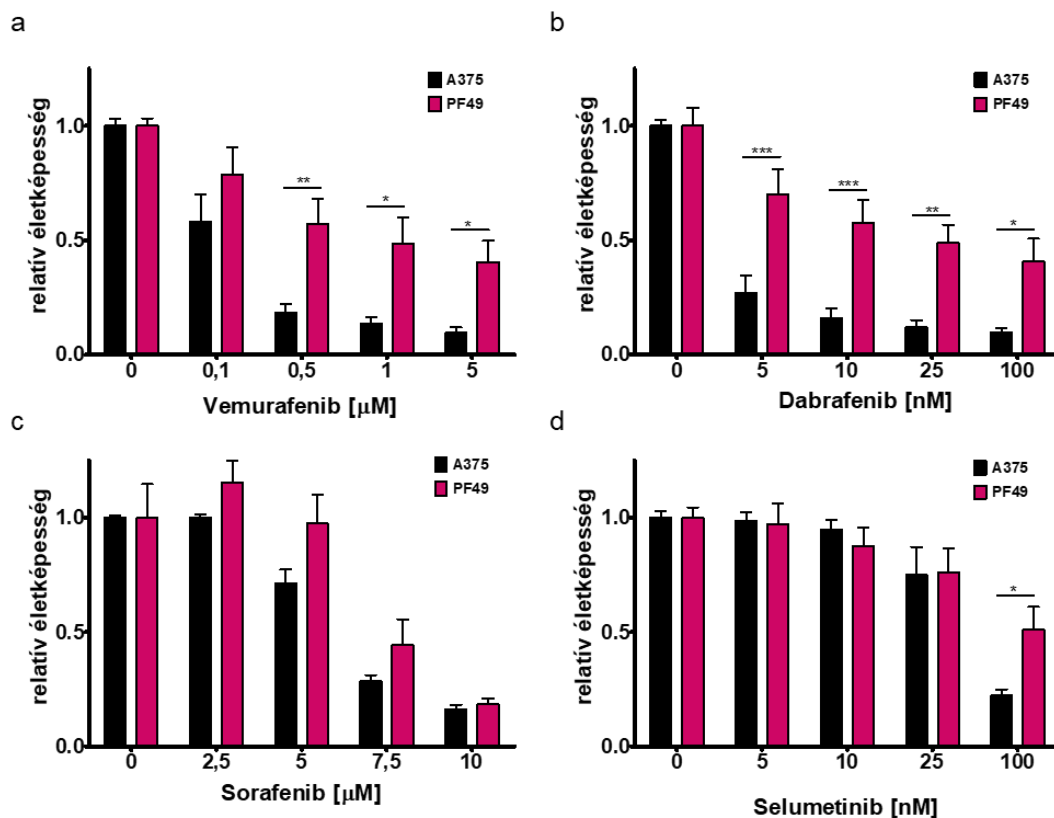
A 68 éves férfi betegnél papilláris típusú pajzsmirigyrákot diagnosztizáltak, aki emiatt teljes pajzsmirigy eltávolításon és nyaki feltáráson esett át. Ennek során nyirokcsomó áttétet illetve mikroszkópikus daganatmaradványt (R1-es reszekció) találtak nála. Kezdetben magas dózisu radioaktív jód (^{131}I) terápiát kapott, amit megfigyelési szakasz követett. Nyolc hónappal később azonban a tumor ismét visszatért, így újabb műtéten esett át a beteg, ahol annyi tumorszövetet távolítottak el, amennyi lehetséges volt. Ekkor a minták hisztopatológiai elemzése már anaplasztikus karcinómát mutatott ki. A pajzsmirigy eredetére utaló markerek (CK18, PAX8) jelen voltak, de megszűnt a magasabb fokú differenciációra utaló TTF1 és tireoglobulin markerek expressziója. Ezután két hónapon keresztül kapott a beteg együttes kemo-radioterápiát. Azonban a tumor nagyon gyorsan terjedt és metasztázisokat hozott létre a mellhártyán, a tüdőben és a csontokban. A pleurális folyadékgyülemet katéter segítségével szívták le, melyből rosszindulatú daganatsejteket mutattak ki. Ebből a mintából lett alapítva a PF49 sejtvonal. A beteg végül 11 hónappal az első diagnózisa után hunyt el.

A PF49 sejtvonal mutációs státuszát újgenerációs szekvenálás segítségével meghatároztuk meg. A vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a sejtvonal BRAF V600E és TERT promóter mutációt hordoz, ami igen gyakori ebben a daganattípusban különösen az idős betegeknél (Vinagre és mtsai 2013). Érdekes, hogy az anaplasztikus pajzsmirigyrákokban szintén gyakori RAS, TP53 vagy PI3K mutációk viszont nem találhatók meg ebben a sejtvonalban (Bonhomme és mtsai 2017).

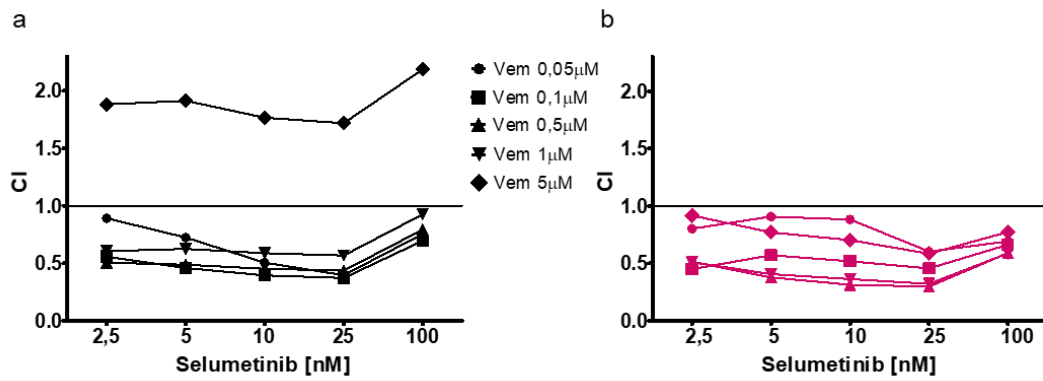
4.2.2 RAS/RAF útvonal egyedüli és kombinációs gátlásának hatása a PF49 sejt életképességére

Mivel a sejtvonal BRAF V600E mutációt hordoz, rövidtávú (72h) életképességi SRB mérés segítségével megvizsgáltuk a PF49 sejtvonal érzékenységét a pan-RAF gátló sorafenib és a mutáns BRAF V600E gátló dabrafenib és vemurafenib, valamint a MEK gátló selumetinib kezeléssel szemben (13. ábra). Kontrollként egy BRAF V600E mutáns melanóma sejtvonalat (A375) használtunk, mint a RAS/RAF útvonal gátló terápiákra

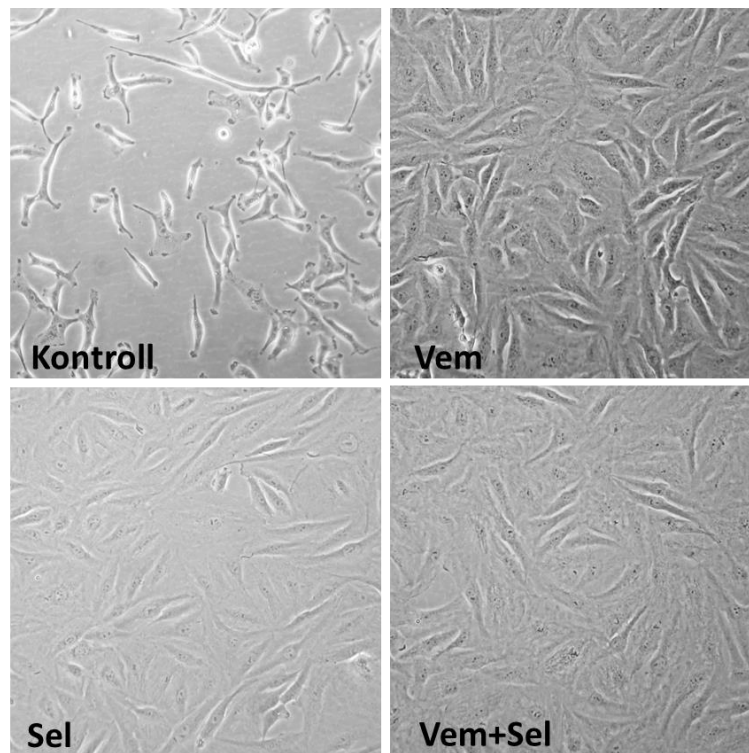
érzékeny, széles körben alkalmazott sejtmodell. Eredményeink azt mutatták, hogy mind a BRAF, mind pedig a MEK gátlószerek képesek voltak csökkenteni a PF49 sejt életképességét, azonban csak kisebb mértékben, mint az A375 sejt vonalét. Megvizsgáltuk továbbá a MEK gátló selumetinib, és az egyik BRAF gátló anyag (vemurafenib) különböző koncentrációban alkalmazott kombinációjának a sejtek életképességére kifejtett hatását. A számított kombinációs index értékek alapján elmondható, hogy a legtöbb koncentrációban a két anyag erősen szinergista ($CI < 1$) gátló hatást fejt ki a sejtek életképességére. Kivételt képez a legmagasabb vemurafenib koncentráció, ahol az A375 esetén a hatás már antagonistának mutatkozott ($CI > 1$) (14. ábra). A PF49 sejt 72 órás kezelés hatására bekövetkező morfológiai változását mutatja a 15. ábra. Látható, hogy a kontroll sejtek hosszúkás orsó alakúak, míg kezelés hatására epitheloid morfológiát mutatnak.



13. ábra A375 és PF49 sejt vonalak érzékenysége a jelölt gátlószerekkel szemben rövidtávú (72h) életképességi tesztek alapján. Adatok: átlag \pm SD. A csillagok szignifikáns különbséget jelölnek a két sejt érzékenysége között, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$.



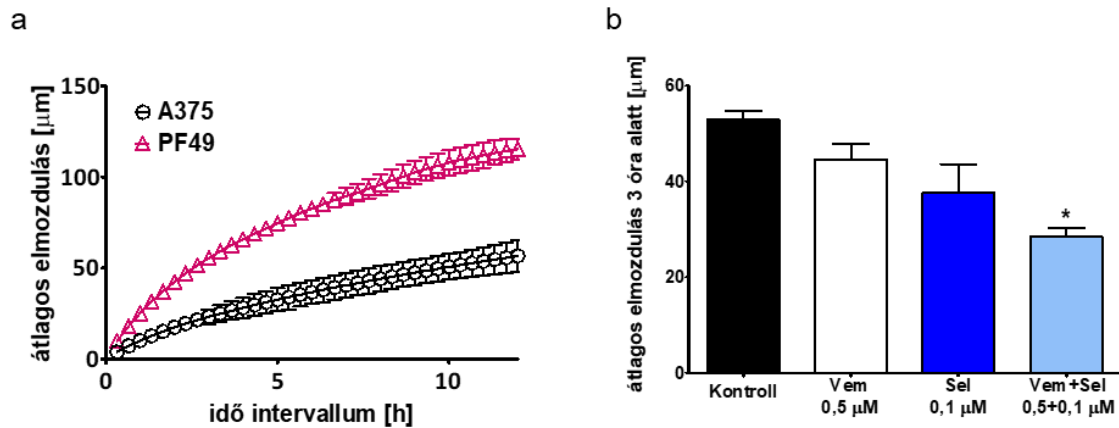
14. ábra A375 (a) és PF49 (b) sejtek kombinációs index értékei 72 óra kezelés után.



15. ábra Reprézatívtív fényképek a PF49 sejtről és a morfológiai változásáról 72 órás vemurafenib (Vem: 0,5 μ M), selumetinib (Sel: 0,1 μ M) és kombinációs (Vem+Sel) kezelés hatására.

4.2.3 A PF49 sejtvonal alapmotilitása és annak gátlási lehetőségei

Megvizsgáltuk a PF49 sejtvonal migrációs kapacitását, és azt találtuk, hogy az új sejtvonal még az A375 vonalnál is jóval gyorsabban mozog (16. ábra a). Továbbá megmértük a vemurafenib és a selumetinib egyszeres és kombinációs gátló hatását a PF49 sejt mozgékonyására, és azt tapasztaltuk, hogy a kombinációs kezelés szignifikánsan gátolja a sejtek migrációját (16. ábra b).



16. ábra (a) PF49 és A375 sejtvonalak alap motilitása. (b) Egyszeres vemurafenib (Vem) és selumetinib (Sel), valamint a kombinációs kezelés hatása a PF49 sejt mozgékonyására. Az adatok átlag \pm SEM jelölnek. A csillag szignifikáns különbséget jelez a kontroll és a kezelt csoport között, * $p < 0,05$.

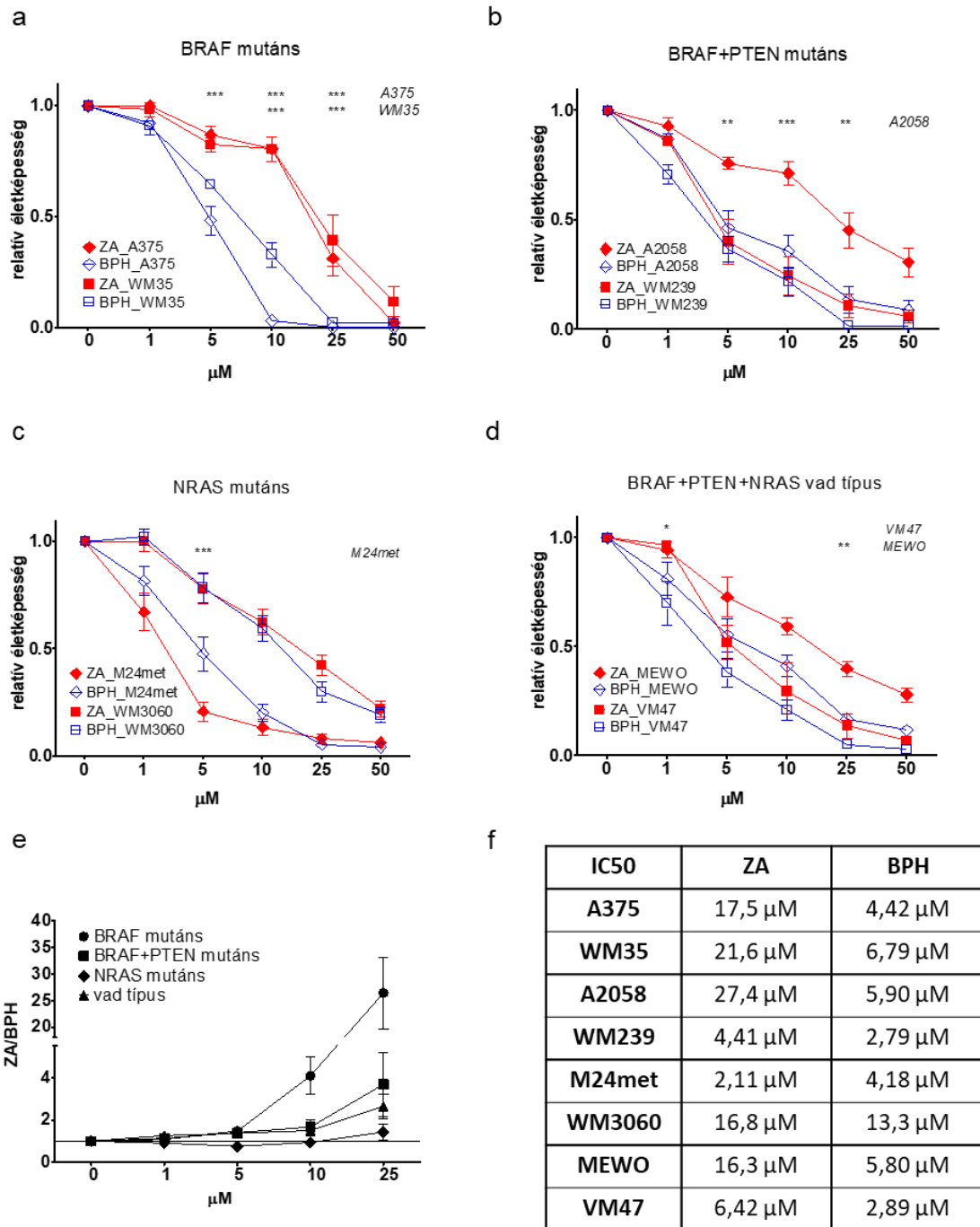
4.3 A lipofil biszfoszfonát BPH tumorelles hatása melanóma sejtvonalakon

Kísérleteinkbe nyolc humán melanóma sejtvonalat vontunk be, melyek közül kettő BRAF mutáns (A375, WM35), kettő BRAF+PTEN mutáns (A2058, WM239), kettő NRAS mutáns (M24met, WM3060) és kettő vad típusú (MEWO, VM47) vonal. A hidrofil zoledronsav (ZA) és a lipofil BPH1222 (BPH) biszfoszfonátok daganatellenes hatását vetettük össze sejteinken annak megállapítására, hogy a lipofil karakter daganat ellenes hatásnövekedéssel jár-e.

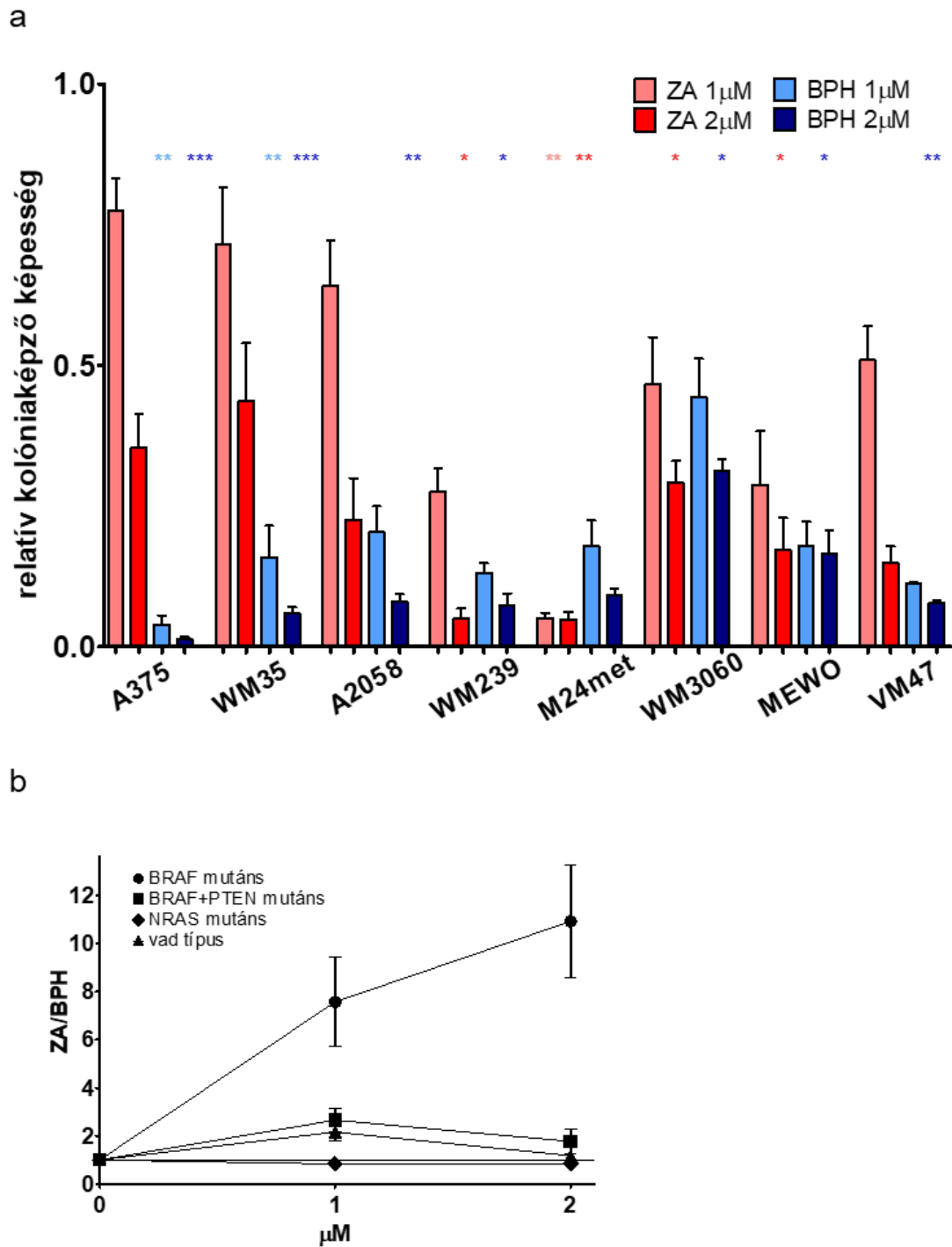
4.3.1 A lipofil BPH és a hidrofil ZA melanóma sejtek életképességére kifejtett hatásának vizsgálata rövid- és hosszútávon

Összehasonlítottuk a kezelőanyagok sejtek életképességére kifejtett hatását különböző koncentrációknál rövidtávon (72h), SRB teszt alkalmazásával. Adataink alapján elmondhatom, hogy a legtöbb sejtvonal esetében a lipofil BPH hatékonyabb volt a hidrofil ZA-hoz képest (17. ábra). Legnagyobb különbség a BRAF mutáns sejtek esetében adódott amit még jobban kifejez a ZA/BPH érték, ahol magasabb koncentráción (25 μ M) több mint 26-szoros hatáskülönbség mutatkozott a BPH javára (17. ábra e). Emellett a BRAF+PTEN és a BRAF/PTEN/NRAS vad típusú sejtek is érzékenyebbek adódtak a BPH-ra ZA-val szemben, 25 μ M kezelésnél 2-3-szoros különbséget mértünk. Ezzel szemben az NRAS mutáns sejtek esetében, amíg a WM3060 sejtre minimális hatáskülönbség adódott a két szer között, az M24met sejtvonal jóval érzékenyebb volt ZA-ra mint BPH-ra. Az IC50 értékeket a 17. ábra f részén gyűjtöttük össze.

Vizsgáltuk a 10 napos kezelés hatását a sejtek kolóniaképző képességére is. Eredményeinkből látható, hogy a BRAF mutációt hordozó A375, WM35, A2058 és a vad típusú VM47 sejtek jóval érzékenyebbek voltak a BPH hatására, mint a ZA kezelésre (18. ábra a). A két anyag egymáshoz viszonyított gátló hatása (ZA/BPH arány) megmutatta, hogy 2 μ M kezelést alkalmazva a BPH 10-szer hatékonyabb volt a csak BRAF mutáns sejteken, mint a ZA (18. ábra b). Továbbá, WM3060, MEWO és WM239 sejtek esetén a két anyag hatása igen hasonlóan adódott. Érdekes viszont, hogy az M24met sejtvonal esetén, bár mindkét hatóanyag jelentős mértékben csökkentette a kolóniaképző képességet, a ZA mégis erősebb hatást fejtett ki a sejtre, mint a lipofil BPH.



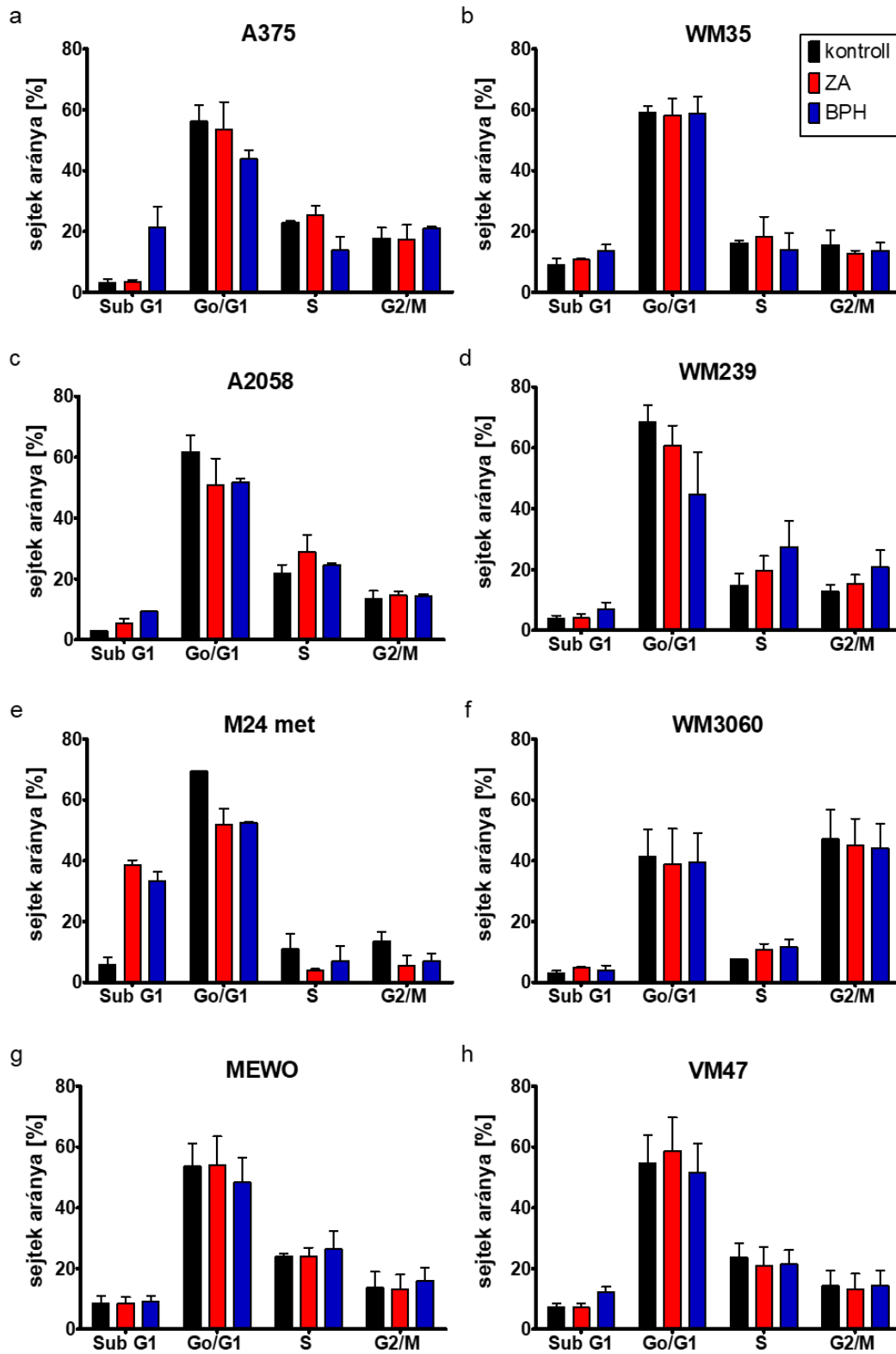
17. ábra Rövidtávú (72h) SRB mérés eredményei a vizsgált sejteken (a-d). A csillagok szignifikáns különbséget jelölnek a ZA és BPH hatás között, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$. (e) ZA/BPH arány a négy mutációs csoportba tartozó sejtek átlagos életképességét tekintve az adott koncentrációkon. Adatok: átlag \pm SEM. (f) IC50 értékek.



18. ábra (a) Hosszútávú (10 nap) klonogenitási teszt eredményei 1-2 μM kezelési koncentrációt alkalmazva. A csillagok a kontrollhoz viszonyított szignifikáns hatást jelölnek, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$. (b) ZA/BPH arány a négy mutációs csoportba tartozó sejtek átlagos kolóniaképző képességét tekintve a jelölt koncentrációknál. Adatok: átlag \pm SEM.

4.3.2 Sejtciklus eloszlás változás 72 óra alatt ZA és BPH kezelés hatására

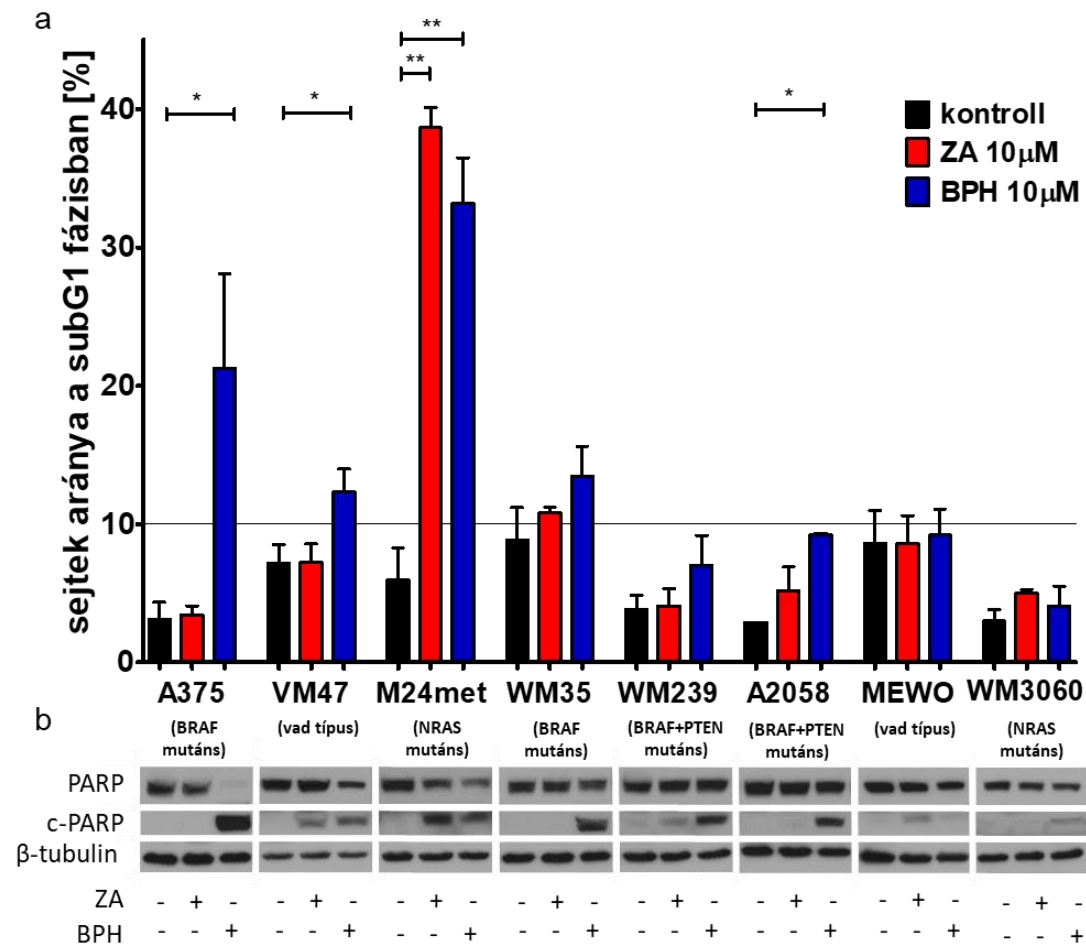
Biszfoszfónatokkal való kezelés sejtciklusra kifejtett hatásait vizsgáltuk meg sejtciklus elemzés segítségével. Eredményeink megmutatták, hogy kezelések hatására az A2058, WM239 és M24met sejtekben csökken le a G0/G1 fázisban megtalálható sejtek száma (19. ábra). M24met és VM47 sejtek kivételével megfigyelhető volt a sejteken, hogy egyik vagy mindkét hatóanyaggal való kezelés hatására némiképp megnövekedett az S fázisban rekedt sejtek aránya.



19. ábra (a-h) Sejtciklus eloszlás 72 óra 10 μ M ZA vagy BPH kezelés hatására. Adatok: átlag \pm SD.

4.3.3 Biszfoszfonátokkal való kezelés apoptózis indukáló hatásának vizsgálata sejtciklus eloszlás elemzés és western blot segítségével

Megvizsgáltuk a hatóanyagok 48-72 óra alatt, 10 μ M-os koncentrációban kifejtett apoptózis indukáló hatását. Sejtciklus eloszlás vizsgálat után a subG1 fázisban levő sejtek arányát számítva megállapítottuk, hogy a legtöbb sejt esetében a BPH nagyobb mértékben indukál apoptózist, mint a ZA (20. ábra a). Legnagyobb arányban az M24met, A375 és a VM47 vonalaknál észleltünk subG1 fázisban levő sejteket, ugyanakkor M24met esetében a ZA által indukált apoptózis mértéke magasabb volt szemben a BPH-val. Western blot segítségével megvizsgáltuk a sejtekben kezelés hatására megjelenő hasított PARP fehérjét. Azt találtuk, hogy BPH kezelés után 8 sejtből 6-ban megfigyelhető volt a c-PARP, míg ZA kezelés hatására csak 3 sejtben tapasztaltuk ezt (20. ábra b). BPH kezelés hatására legnagyobb mértékben a BRAF és BRAF+PTEN mutáns sejtekben jelent meg az apoptózis marker. Továbbá, ZA kezelés egyedül az M24met sejtben eredményezett nagyobb mértékű PARP hasítást, mint a BPH kezelés. Mindezen eredmények jól korrelálnak az életképességi tesztek eredményeivel (17-18. ábra).



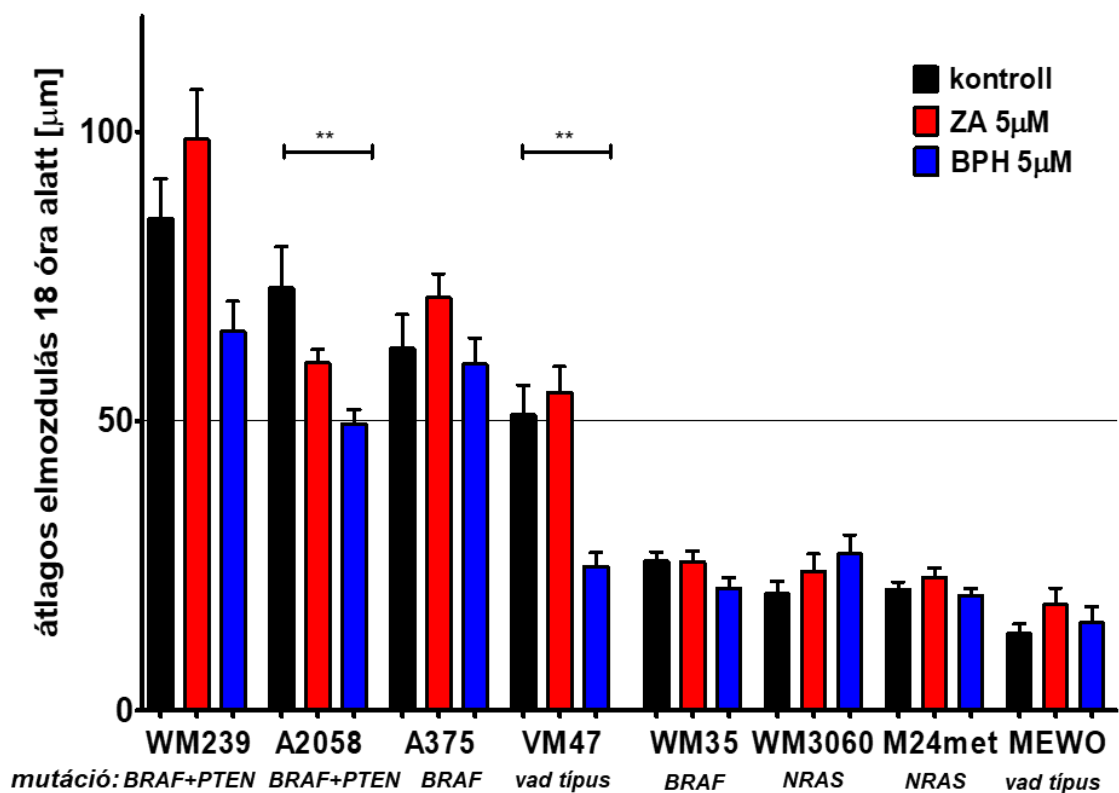
20. ábra (a) 72 órás kezelés hatására subG1 fázisba kerülő sejtek aránya a vizsgált sejtvonalakban. Az adatok átlag \pm SD jelölik. A csillagok szignifikáns különbséget jeleznek a kontrollhoz képest, * $p < 0,05$, ** és $p < 0,01$. (b) 48 órás kezelés hatása a c-PARP/PARP megjelenésre.

4.3.4 Preniláció gátlás hatása az Erk, Akt, S6 és Rheb fehérjék aktivációjára

A RAS/RAF (Erk) és PI3K/Akt (Akt, S6, Rheb) jelpályák fehérjéinek aktivációs változását vizsgáltuk 48 órás 10 μ M-os kezelés hatására a sejtekben. Eredményeink alapján az Erk fehérje foszforilációja nem változik meg vagy megnő a kezelés hatására a legtöbb sejtben (21. ábra). Kivételt képez az M24met, ahol lecsökken a p-Erk szint ZA és BPH kezelés hatására egyaránt. Akt és S6 aktivációs szint csökkenést mindkét hatóanyag képes volt előidézni, de a BPH nagyobb arányban. A375, VM47 és M24met sejtekben mind a p-Akt, mind a p-S6 szint jelentős mértékben lecsökkent BPH kezelés hatására,

4.3.5 A sejtek alap motilitása meghatározza az BPH kezeléssel szembeni érzékenységüket a mozgás gátlás tekintetében

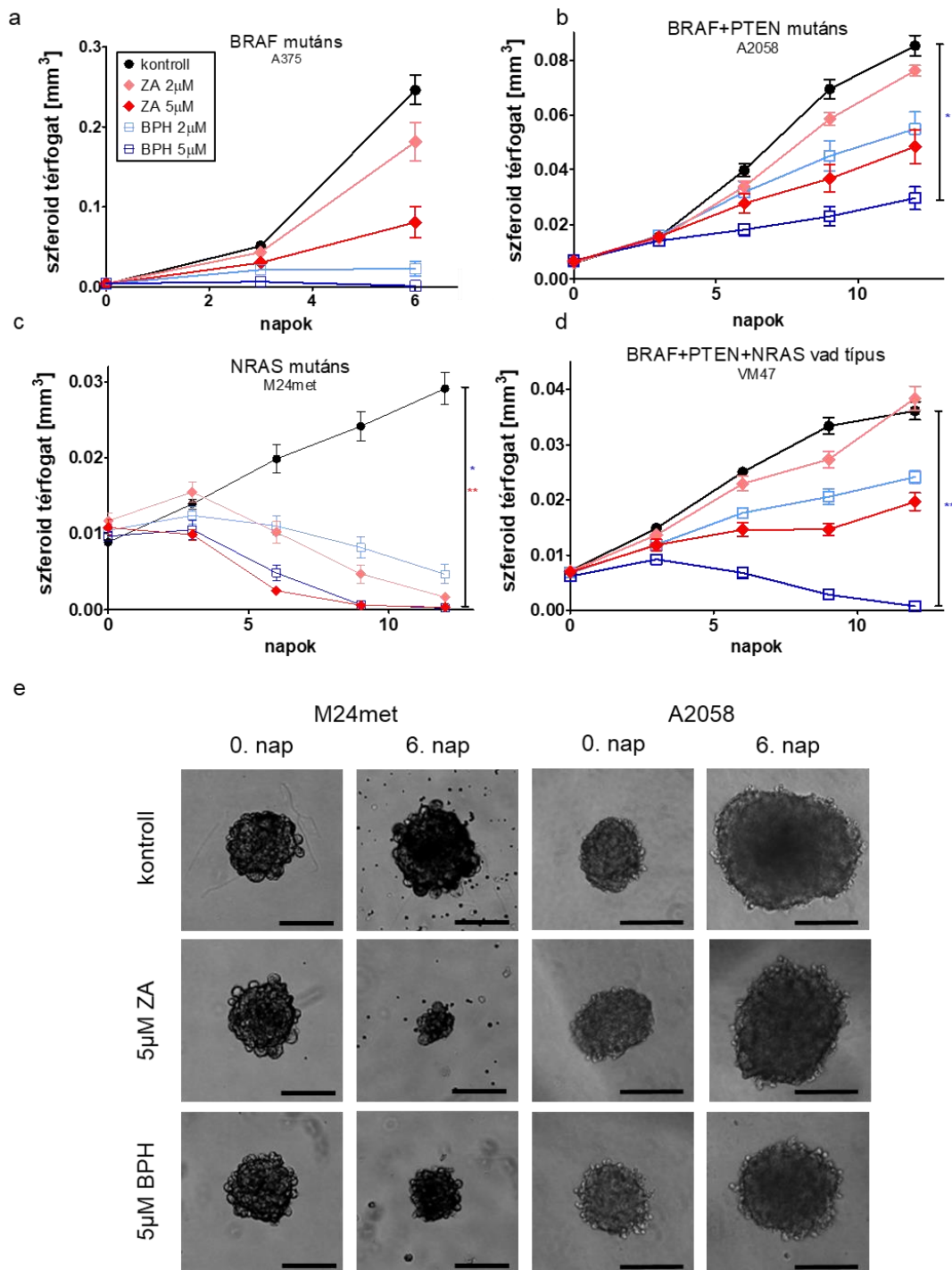
Mivel a melanóma sejtek igen magas migrációs potenciállal bírnak (Garay és mtsai 2013), megvizsgáltuk a hatóanyagok mozgásra kifejtett gátló hatását is. Videomikroszkóp segítségével meghatároztuk a sejtek átlagos elmozdulását 5 μM ZA és BPH kezelést követő 18 óra alatt (22. ábra). Alap motilitásuk szerint a sejteket két csoportra osztottuk: gyors és lassú sejtek (határérték 50 μm átlagos elmozdulás 18 óra alatt). A négy gyors sejt közül háromban mértünk jelentős mozgékonyág csökkenést BPH kezelés hatására (WM239, A2058, VM47), melyek közül kettőben szignifikánsnak adódott a hatás (A2058, VM47). Ezzel szemben a ZA nem volt képes csökkenteni a mozgékonyágot, csak egy esetben (A2058), ugyanakkor a másik három sejtben növelte azt. Emellett, a lassabb sejtekben nem változott meg szignifikánsan a sejtek mozgása egyik kezelés hatására sem.



22. ábra Nyolc melanóma sejt átlagos elmozdulása 18 óra alatt a kezelést követően. Adatok: átlag \pm SEM. A csillagok szignifikáns különbséget jelölnek a kontrollhoz viszonyítva, ** $p < 0,01$.

4.3.6 Biszfoszfonátok szferoid növekedés gátlására kifejtett hatásának vizsgálata

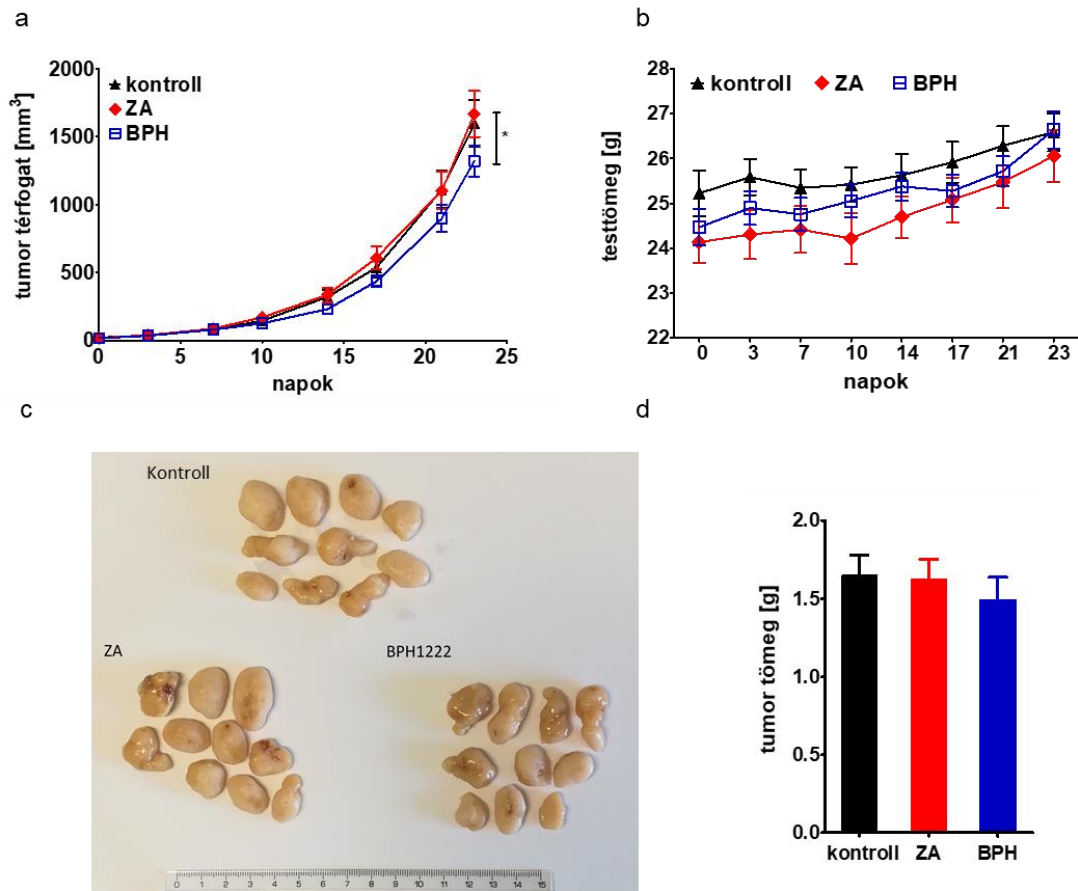
A lipofil karakterű BPH feltételezhetően jobb diffúziós tulajdonságai miatt háromdimenziós környezetben még hatékonyabbnak ígérkezett, amit szferoid növekedési vizsgálatokkal teszteltünk. A vizsgálatba 1-1 szferoid képzésre alkalmas sejtvonalat vontunk be mutációs csoportonként (A375, A2058, M24met, VM47) (23. ábra). A375 esetében a BPH kezelés annyira hatékonynak bizonyult, hogy a szferoidok a 6. napon szétestek, így a kísérletet be kellett fejezni. A másik három sejt esetében a BPH 5 μM koncentrációban szignifikánsan csökkentette a szferoid növekedést a kontroll csoporthoz képest. M24met esetében pedig a ZA is képes volt szignifikáns szferoid térfogat csökkenést elérni, sőt még a BPH-hoz képest is nagyobb gátló hatást mutatott. A 23. ábra e része reprezentatív fényképeket mutat M24met és A2058 szferoidokról a kezelés kezdetén és a 6. napon.



23. ábra (a-d) Szferoid térfogat csökkenés 6-12 napig tartó ZA vagy BPH kezelés hatására. Az adatok átlag \pm SEM jelölnek. A csillagok szignifikáns különbséget jeleznek a kontroll és a kezelt csoport között, * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$. (e) Reprezentatív fényképek a szferoidokról a kezelés első és 6. napján. Skála 200 μm .

4.3.7 ZA és BPH tumorelles hatása M24met xenograft modelljén

Mivel az M24met sejt volt az egyetlen a 8 vizsgált melanóma vonal közül, melyen minden *in vitro* vizsgálatban a ZA volt hatékonyabb, *in vivo* körülmények között összehasonlítottuk a ZA és BPH hatását. Mivel a BPH jóval lipofilebb a ZA-hoz képest, a diffúziós tulajdonságai is jobbak és nem csontszelektív, várható volt, hogy élő szervezetben a BPH még jobban ki tudja fejteni hatását. M24met sejtet szubkután oltottunk nőstény SCID egerekbe, majd a tumorok kialakulását követően 23 napig kezeltük őket 1,47 $\mu\text{mol/kg}$ ZA és BPH anyagokkal (24. ábra). Eredményeink, a vártnak megfelelően megmutatták, hogy a BPH még ezen a sejtvonalon is szignifikánsan nagyobb tumorelles hatást fejt ki *in vivo* körülmények között a ZA-val szemben (24. ábra a). A kísérlet során az egerek testtömege nem csökkent (24. ábra b). A vizsgálat végén eltávolított tumorok csoportonként rendezve láthatóak a 24. ábra c részén, mely megmutatja, hogy jelentős különbség nem adódott a csoportok között. A tumorok tömegét tekintve azonban a BPH-val kezelt csoportban adódott a legalacsonyabb érték a másik két csoporthoz képest (24. ábra d).



24. ábra (a-b) M24met sejttel oltott egerek tumor térfogatának, valamint az egerek testtömegének változása ZA és BPH kezelés hatására 23 nap alatt. A csillag szignifikáns különbséget jelöl a két kezelt csoport között, * $p < 0,05$. (c-d) A kísérlet végén eltávolított tumorok csoportonkénti képe illetve tömegének átlagos értéke. Adatok átlag \pm SEM.

5. Megbeszélés

5.1 BRAF mellett PI3K vagy PTEN mutációt hordozó daganatos sejtek RAS/RAF és PI3K/Akt jelpályák kombinációs gátlással szembeni érzékenysége

Jelenleg több daganattípus esetén a BRAF (V600E) mutáció jelenlétekor standard terápiaként BRAF és/vagy MEK gátlószereket alkalmaznak. Sajnos azonban a rezisztencia kialakulása sok esetben elkerülhetetlen a terápia során (Nazarian és mtsai 2010, Rossi és mtsai 2019). A RAS/RAF jelpálya intenzív kommunikációt folytat a PI3K/Akt pályával, valamint ismert, hogy a BRAF mutáció mellett a PI3K/Akt pályán jelen lehetnek együttes mutációk, melyek nagymértékben befolyásolják a célzott terápiákra adott választ. Mindezen információk együttevén megalapozottá teszik a feltételezést, hogy a két jelpálya horizontális gátlása javíthat a terápiás válaszon (Mendoza és mtsai 2011). A RAS/RAF pálya linearitásához nagymértékben hozzájáruló MEK1/2 fehérje fontos daganat terápiás célpont, melynek gátlása a teljes kaszkád sikeres blokkolását teszi lehetővé (Caunt és mtsai 2015). Másrészt, a PI3K/Akt jelpálya gátlásának egy fontos aspektusa az mTOR mindkét komplexének blokkolása, melyet az allosztérikus gátlószerek (rapamycin és analógjai) nem képesek megtenni, ellenben például a kompetitív, PI3K/mTOR kettős gátló BEZ235 igen (Jacinto és mtsai 2004, Maira és mtsai 2008). Vizsgálatainkban MEK gátló selumetinib és PI3K/mTOR gátló BEZ235 hatóanyagokat teszteltünk önállóan és kombinációban BRAF- és BRAF mellett PI3K vagy PTEN mutációt hordozó humán daganatos sejt kultúrákon.

Eredményeink a rövid-, és hosszútávú életképességi teszteken selumetinib vagy BEZ235 kezelések hatására igen hasonlóan bizonyultak a szakirodalomban lejegyzett adatokkal (Aziz és mtsai 2010, Gopal és mtsai 2010, Qu és mtsai 2014, Sweetlove és mtsai 2015, El Zaoui és mtsai 2019). Sweetlove és munkatársai rövidtávú vizsgálatokban mutatta meg a selumetinib és BEZ235 anyagok kombinációjának melanóma sejtekre kifejtett hatását, és azt találták, hogy a legtöbb sejt esetén a két szer additív hatást mutatott, mely nagyon hasonló az általunk hosszútávú vizsgálatok során nyert eredményekhez (Sweetlove és mtsai 2015). Saját eredményeink azt mutatták, hogy a vizsgált sejtek közül kettő esetében

mutatkozott a kezelési kombináció szinergistának, egy melanóma és egy vastagbélrák vonalnál. Ezek a sejtek BRAF mellett PI3K vagy PTEN mutációt hordoznak, de a többi kettős mutáns vonal nem volt ilyen érzékeny. Érdekes viszont, hogy a szakirodalomban számos példa van rövid-, és hosszútávú kombinációs kezelésekkkel is, hogy szinergista hatás áll fenn a két vegyület között különböző mutációs státuszú (BRAF, EGFR, KRAS, PI3KCA) sejtvonalakon (Aziz és mtsai 2010, Qu és mtsai 2014). Továbbá a mutáció jellege (homo- vagy heterozigóta) szintén befolyásoló tényező lehet a terápiára adott válaszbán, azonban az általunk vizsgált sejtvonalakban a mutációk (BRAF, PI3K) heterozigóta jellegűek, így ez nem magyarázza a sejtek különböző érzékenységét.

Korábbi vizsgálatokban megmutatták, hogy a selumetinib+BEZ235 kombinációs kezelés megnöveli a sejtek apoptózist indukáló hatását (Shi és mtsai 2011, Grazia és mtsai 2014, Kuger és mtsai 2015). Saját eredményeink szerint az egyszeres selumetinib és a kombinációs kezelések is képesek voltak programozott sejthalált előidézni kettős sejtből a vizsgált négyből, a hasított PARP detektálása alapján. Érdekes, hogy a kombinációs kezelésre igen érzékeny SW1417 és HT29 sejtvonalaknál viszont nem tudtuk detektálni a c-PARP-ot. Továbbá megmutattuk, hogy a PCNA fehérje szintje két sejtből jelentősen lecsökken az egyszeres selumetinib és a kombinációs kezelés hatására. Azonban az SW1417 és HT29 sejtekben, hasonlóan a c-PARP eredményekhez, nem detektáltunk PCNA fehérje szint változást kezelés hatására. Fontos megjegyezni, hogy mind az SW1417, mind pedig a HT29 sejtvonalak hordoznak TP53 génmutációt, mely összefüggésben állhat ezen eredményekkel (Deb és mtsai 1992, Montero és mtsai 2013).

Megvizsgáltuk, hogy a PI3K vagy PTEN mutációnak milyen hatása van az EGFR, MET, Akt, S6 és Erk fehérjék expressziójára és alapaktivációjára a kettős mutáns sejtekben (SKMEL28, A2058, WM239, HT29, SW1417). EGFR expressziót a BRAF+PI3K mutáns alcsoportba tartozó, vastagbélrák sejtekben detektáltunk. Ismert, hogy a vastagbélrák sejtekre a melanómákkal szemben jóval nagyobb mértékben jellemző az EGFR kifejeződés (Staibano és mtsai 2004, Spano és mtsai 2005), és ez jól korrelál eredményeinkkel. A MET fehérje expresszióban és aktivitásában levő különbségek azonban már nem magyarázhatók egyértelműen a szöveti eredettel (Lee és mtsai 2011, Gayyed és mtsai 2015), míg saját eredményeink azt mutatták, hogy a vastagbélrák

BRAF+PI3K mutáns sejtekben volt a MET kimutatható, és a legaktívabb a HT29 sejtben. A korábbi eredményekkel összhangban azt találtuk, hogy a p-Akt szint a BRAF+PTEN mutáns sejtekben magasabb, mint a BRAF+PI3K mutánsoknál (Vasudevan és mtsai 2009). Vizsgáltuk a kezelések hatását is a jelpálya fehérjék aktivációjára, és eredményeink megmutatták, hogy az Erk aktiváció jelentősen lecsökken selumetinib és kombinációs kezelés hatására, mely összhangban áll a szakirodalomban korábban leírt eredményekkel (Shi és mtsai 2011, Sweetlove és mtsai 2015, El Zaoui és mtsai 2019). Érdekes, hogy az Erk alapaktiváció magasabb volt a selumetinibre érzékenyebb sejtekben a rezisztensekkel összevetve. Továbbá, a vártak megfelelően, és ahogy korábban már megmutatták (Kuger és mtsai 2015), a p-S6 szint jelentősen lecsökkent BEZ235 és a BEZ235+selumetinib kezelés hatására, sőt, a kombináció jóval hatékonyabbnak bizonyult. Ez utóbbi jelenségre magyarázatul szolgálhat, hogy a selumetinibről megmutatták, hogy önmagában is képes gátolni az S6 aktivációt (Sweetlove és mtsai 2015). Valamint korábban leírták, hogy a BEZ235 gátolja az Akt fehérje aktivációját, selumetinibbel kombinációban pedig még hatékonyabban gátol (Engelman és mtsai 2008, Shi és mtsai 2011). Érdekes, hogy saját eredményeink alapján csak a legérzékenyebb SW1417 sejtvonalnál csökkent a p-Akt szint a kombinációs kezelés hatására.

A kétdimenziós eredményeink validálása érdekében háromdimenziós szferoidokon és szubkután xenograft modellen is megvizsgáltuk vegyületeink hatékonyságát. A 3D szferoid növekedési és életképességi vizsgálatainkat olyan sejtvonalakon végeztük el, ahol a kombinációs kezelés 2D-ben szinergista hatást mutatott (SW1417, WM239), illetve két sejtvonalon (A375, HT29), ahol additív hatást detektáltunk. Eredményeink szerint csak az SW1417 sejtvonalon esetében volt szignifikánsan hatékonyabb a kombinációs terápia mint az egyszeres kezelések. Korábban megmutatták, hogy a HT29 sejtvonalon szferoidján ez a kombináció hatékonyabb lehet, magasabb BEZ235 kezelési koncentrációt alkalmazva (Shahi Thakuri és mtsai 2017). Továbbá vemurafenib rezisztens melanóma sejtvonalakon (M229, M238, Pt48) is megmutatták, hogy a kombinációs terápia hatékonyabb az egyszeres kezelésnél (Shi és mtsai 2011).

In vitro adataink alapján az SW1417 sejtvonalat választottuk xenograft modellnek. Állatkísérletes eredményeink szerint is a kombinációs terápia bizonyult hatékonyabbnak bármely egyszeres kezeléshez hasonlítva, ami jól összecseng az irodalomban leírtakkal.

Megmutatták, hogy a selumetinib+BEZ235 kombináció hatékonyabb az egyszeres kezeléseknél BRAF mutáns melanóma sejtvonal (NZM20) esetén (Sweetlove és mtsai 2015), bizonyos tüdő daganat sejteknél (NCI-H1993, NCI-H1975, NCI-H460) (Qu és mtsai 2014) de még betegből származó kolorektális daganat xenograftokon is (Migliardi és mtsai 2012).

Összességében elmondható, hogy a RAS/RAF és PI3K/Akt jelpályán együttesen jelenlévő mutációk nem határozzák meg egyértelműen a MEK és PI3K/mTOR gátló szerek szinergista hatását. Ezért további vizsgálatok szükségesek, olyan prediktív faktorok felderítéséhez, melyek segíthetik a daganatos betegek személyre szabott, szinergista módon ható kombinációs terápiájának kiválasztását.

5.2 BRAF mutáns anaplasztikus pajzsmirigyrák sejtek kezelése BRAF és MEK inhibitorokkal

Amíg a differenciált pajzsmirigyrákban szenvedő betegek jó prognózissal bírnak és túlélési idejük igen hosszú a standard terápia alkalmazása után, addig az anaplasztikus pajzsmirigyrákos (ATC) betegeknek nagyon rossz kilátásaik vannak, mivel ez a típus metasztázis képzésre hajlamos, valamint rosszul reagál a standard radiojód vagy kemoterápiás kezelésekre (Ferrari és mtsai 2020). Emiatt új terápiás modellekre és módszerekre van szükség ezen betegcsoport kilátásainak javítása érdekében.

Munkánkban egy új ATC sejtvonalat alapítottunk (PF49) egy 68 éves férfi beteg pajzsmirigyrákjának pleurális folyadékgyüleméből. Az ATC betegek körülbelül 20%-a ad áttétet a mellhártyára és ez bizonyos esetekben rosszindulatú pleurális folyadékgyülemet okoz (Kurebayashi és mtsai 2003, Besic és mtsai 2013). A beteget először papilláris pajzsmirigyrákkal diagnosztizálták, ami a 8 hónapos követési idő alatt anaplasztikus átalakuláson ment át. Meghatároztuk, hogy az alapított sejtvonal BRAF V600E és TERT promóter mutációt hordoz, melyek már az eredeti papilláris tumorokban is jelen voltak. Az ATC betegek mintegy 25%-ában van jelen BRAF V600E mutáció, és körülbelül ilyen arányú az ATC sejtvonalakban is a mutáció aránya (Pilli és mtsai 2009, Chen és mtsai 2018). A TERT promóter mutáció az ATC esetek körülbelül 40%-ában

van jelen, továbbá TERT promóter mutációt hordozó papilláris pajzsmirigyrákokról leírták, hogy nagyobb eséllyel alakulnak ATC-vé (Bonhomme és mtsai 2017, Oishi és mtsai 2017). A PF49 sejtek pozitívak voltak a pajzsmirigy sejt marker transzkripciós faktor PAX-8-ra és CK18-ra, de negatívak voltak a differenciált pajzsmirigy tumor markerekre (tireoglobulin, TTF-1), ami jól korrelál a korábbi megfigyelésekkel más ATC sejtvonalakban (Lam és mtsai 2001, Nonaka és mtsai 2008, Pilli és mtsai 2009).

Megvizsgáltuk az újonnan alapított PF49 sejtvonala érzékenységét BRAF V600E gátló hatóanyagokkal (vemurafenib, dabrafenib), egy pan-RAF gátló (sorafenib) és egy MEK gátló vegyülettel (selumetinib) szemben. Eredményeink alapján a vizsgált vegyületek dózisfüggő hatást mutattak, a szakirodalomban leírt vizsgálati eredményekkel összhangban. A vemurafenib hatékonysága összevethető volt más ATC sejtvonalaival leírtakkal (Jiao és mtsai 2018, Song és mtsai 2018). Klinikai vizsgálatokban is igazolták, hogy vannak BRAF V600E mutáns ATC betegek, akik jól reagálnak vemurafenib kezelésre (Rosove és mtsai 2013, Hyman és mtsai 2015, Prager és mtsai 2016). A másik BRAF V600E specifikus gátlószerre (dabrafenib) a PF49 sejtvonala jóval érzékenyebbnek mutatkozott, mint a vemurafenibre, és más BRAF V600E mutáns ATC vonalakhoz képest is nagyobb volt az érzékenysége (Kurata és mtsai 2016). Korábbi vizsgálatok BRAF V600E és nem V600E mutáns ATC sejtvonalaikon azt mutatták, hogy a sorafenib hatása nem mutáció függő ezekben a sejtekben. Mi azt tapasztaltuk, hogy a PF49 sejtek kevésbé voltak érzékenyek a kezelésre, mint az irodalomban korábban bemutatott sejtvonalaik (Broecker-Preuss és mtsai 2015, Chen és mtsai 2015, Wächter és mtsai 2018, Ishihara és mtsai 2019). A MEK gátló selumetinib hatását összevetve a szakirodalomban leírtakkal, a PF49 sejtvonala nagyobb érzékenységet mutatott (Song és mtsai 2018, Wächter és mtsai 2018).

A RAS/RAF jelút gátlásának egyik legjobban vizsgált megközelítése a dabrafenib+trametinib kombináció alkalmazása. Ezt a terápiát a sikeres preklinikai és klinikai vizsgálatok alapján 2018-ban törzskönyvezték inoperábilis és metasztatikus BRAF V600E mutáns ATC betegek kezelésére (Subbiah és mtsai 2018), valamint azt találták, hogy neoadjuváns terápiaként megnöveli az operálhatóság esélyét is (Wang és mtsai 2019). Vizsgáltuk továbbá, a selumetinib és vemurafenib kombinációjának hatékonyságát pajzsmirigyrák sejtvonalaikon (Song és mtsai 2018). Az eredmények

alátámasztják az általunk kapott adatokat, miszerint ez kombinációs terápia jóval hatékonyabb, mint az egyszeres kezelés. Saját eredményeink szinergista hatást mutattak az összes vizsgált koncentráción.

Az ATC egyik meghatározó tulajdonsága a rendkívüli metasztatikus készség, amihez nagymértékben hozzájárul a sejtek mozgékonyasága. Megmutatták, hogy a BRAF V600E mutáció megnöveli az ATC sejtek alap motilitását (Nucera és mtsai 2010, Liu és mtsai 2016). Továbbá leírták korábban, hogy a BRAF V600E specifikus gátlószer PLX4720 hatékonyan csökkenti a vizsgált ATC sejtek migrációját (Nucera és mtsai 2011). Ezzel összhangban azt találtuk, hogy az PF49 sejtvonálnak rendkívüli migrációs kapacitása van, és ez csökkenthető BRAF és MEK gátlószer kezeléssel, de a BRAF+MEK kombinált gátlás hatékonyabb az egyszeres kezeléseknél.

Összességében elmondható, hogy a RAS/RAF jelpálya egyszeres gátlása is csökkenti a PF49 sejt életképességét, ugyanakkor a BRAF+MEK kombinációs gátlás az életképességet és a sejtek mozgékonyaságát is nagyobb mértékben képes csökkenteni, mint a monoterápiák.

5.3 BRAF vagy NRAS mutáns melanóma sejtek érzékenysége lipofil és hidrofil biszfoszfónátokkal szemben

A malignus melanóma egy rendkívül agresszív bőrdaganat, és dacára a terápiás lehetőségek kiszélesedésének és a hatékonyság jelentős növekedésének, még napjainkban is vannak bizonyos betegcsoportok, akik számára nincs megfelelő gyógymód. Emiatt új terápiás megközelítésekre van szükség, a betegek túlélésének növelése érdekében (Cox és mtsai 2014, Zuo és mtsai 2018, Kunz és mtsai 2019). A biszfoszfónátok hatékonyan gátolják a fehérje preniláció folyamatát, ezáltal bizonyos kis G fehérjéket is, továbbá megmutatták róluk, hogy direkt daganatellenes hatásuk is van (Forsea és mtsai 2004). Azonban felhasználásukat jelentősen korlátozza a rossz biohasznosulásuk, ami új, lipofilabb karakterű hatóanyagok fejlesztését ösztönözte. A lipofil biszfoszfónátokról megmutatták, hogy hatékonyabbak a hidrofil vegyületeknél tüdő-, emlő-, vastagbél- és agydaganatokon. A legígéretesebb zoledronsav (ZA) analógnak a BPH1222 (BPH)

vegyületet találták, mely hatékonyabban gátolta a vizsgált tumor sejteket, mint a ZA (Zhang és mtsai 2009, Xia és mtsai 2014, Boulmier és mtsai 2017, Baranyi és mtsai 2020). Eredményeinkben elsőként mutattuk be a lipofil BPH melanóma sejtek életképességére, apoptózis indukciójára valamint migrációjára kifejtett hatását összehasonlítva a ZA-al.

Összhangban a saját eredményeinkkel, korábban már leírták, hogy 2D kísérletekben a ZA dózisfüggő gátló hatást mutat melanóma sejteken (Forsea és mtsai 2004, Hirbe és mtsai 2009, Garay és mtsai 2015). Továbbá, kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján elmondható az is, hogy a ZA hatékonysága mutáció függő, mivel a BRAF+PTEN mutáns sejtek érzékenyebbek voltak ZA-ra, mint a csak BRAF mutánsok (Garay és mtsai 2015). Érdekes, hogy új eredményeink azt mutatták, hogy a BPH hatékonyabb volt a BRAF+PTEN mutáns sejteken, mint a ZA. Rövid-, és hosszútávú életképességi tesztekben a legtöbb melanóma sejtvonal érzékenyebb volt BPH-ra, mint ZA-ra. Hasonló eredményeket kapott Xia és munkatársai, amikor tüdő adenokarcinóma sejteket vizsgáltak (Xia és mtsai 2014). Érdekes viszont, hogy az NRAS mutáns M24met sejtvonal érzékenyebb volt ZA-ra, mint BPH-ra. Itt érdemes megjegyezni, hogy az M24met vonalról leírták, hogy az EGFR-t túltermeli (Mueller és mtsai 1991), továbbá a ZA-ról megmutatták, hogy alacsonyabb koncentrációban gátolja az EGFR-t, mint a BPH (Yuen és mtsai 2014, Malwal és mtsai 2018). Ebből következik, hogy a ZA feltehetően nem csak, mint preniláció gátló, hanem egyszerre EGFR inhibitorként is fellép az M24met sejt esetében, ami megmagyarázhatja, hogy miért érzékenyebb az M24met ZA-ra, mint BPH-ra *in vitro* körülmények között.

Továbbá, korábbi eredmények megmutatták, hogy a ZA kezelés a sejtek S fázisban való megrekedését okozhatja (Forsea és mtsai 2004). Saját eredményeink is alátámasztják ezt, hiszen a vizsgált sejtek egy része S fázisban rekedt ZA vagy BPH kezelés hatására. Valamint négy vonal esetén (A375, WM35, VM47, M24met) BPH kezelés hatására a sejtek több mint 10%-a subG1 fázisba került, ami a vegyület apoptózist indukáló hatására utal. Emellett az M24met esetén ZA kezelés eredményeként is 40% körüli subG1 fázisú sejtarányt mértünk.

Korábban megmutatták, hogy ZA képes volt gátolni emlő-, és prosztatatarák sejtek invázióját (Boissier és mtsai 2000, Hiraga és mtsai 2004). Azonban kutatócsoportunk korábbi és jelenlegi eredményei alapján elmondható, hogy melanóma sejtek esetén a ZA nem gátolja hatékonyan a sejtmozgást (Garay és mtsai 2015). Ezzel szemben a BPH jelentősen csökkentette a migrációját három sejtvonálnak a négy gyors mozgású sejt közül.

Mivel napjainkban a 3D vizsgálatok szerepe a preklinikai kutatásban jelentősen felértékelődött (Beaumont és mtsai 2013), szferoid vizsgálatokkal is teszteltük hatóanyagainkat. Eredményeink megmutatták, hogy az 5 μ M BPH kezelés szignifikáns szferoid növekedés gátlást ér el A2058, VM47 és M24met sejtvonalakon, hasonlóan a 2D hosszútávú életképességi tesztek eredményeihez. Azonban az M24met sejtvonala esetén a ZA erősebb gátló hatás mutatott, mint a BPH, szintén hasonlóan a korábbi 2D eredményekhez.

Ezek után M24met xenograft modell segítségével validáltuk az *in vitro* 2D és 3D eredményeinket. A ZA nem mutatott tumornövekedés gátló hatást hasonlóan a korábbi *in vivo* eredményekhez (Chen és mtsai 2013, Garay és mtsai 2015). Ezzel szemben a BPH kis mértékben, de a ZA-hoz képest szignifikánsan nagyobb hatékonysággal csökkentette a tumor térfogatot, és mérsékelten a tumorok tömegét is, mely jól korrelál a korábban tüdő adenokarcinóma sejtvonallakkal nyert *in vivo* adatokkal (Xia és mtsai 2014).

Eredményeink és a szakirodalom alapján feltételezhető, hogy a BPH jobb fizikai-kémiai tulajdonsága és magasabb lipofilitása jobb felszívódást és a csontszövethez való alacsonyabb affinitást eredményez, melynek köszönhetően hosszabb időt tölt a vegyület a vérkeringésben, mint hidrofil analógja és így jobban ki tudja fejteni hatását (Zhang és mtsai 2009, Xia és mtsai 2014).

5.4 A PI3K/Akt jelpálya szerepe a lipofil biszfoszfónát hatásmechanizmusában

Megvizsgáltuk a biszfoszfónátok RAS/RAF és PI3K/Akt jelpályák fehérjéinek aktivitására kifejtett hatását sejtvonalainkban. Eredményeink szerint a vizsgált sejtjeinkben a RAS/RAF jelpálya fehérjéjének (Erk) aktivációjára nem volt jelentős

hatással egyik kezelőanyag sem. Kivételt képez ez alól az M24met vonal, ahol kis mértékben lecsökkent a p-Erk szint mindkét kezelőanyag alkalmazása után. Ezzel összhangban leírták, hogy a ZA képes csökkenteni a p-Erk szintet, de csak magasabb kezelési koncentráció mellett (Tsubaki és mtsai 2013, Garay és mtsai 2015, Kim és mtsai 2016). Hasonlóképpen, kutatócsoportunk korábbi eredményei és a szakirodalom alapján elmondható, hogy a ZA ugyan képes a PI3K/Akt útvonal fehérjéinek (Akt, S6) aktivációját csökkenteni, de csak magasabb koncentráción vagy hosszabb kezelési idővel (Tsubaki és mtsai 2013, Xia és mtsai 2014, Garay és mtsai 2015, Kim és mtsai 2016). Ezzel összhangban saját eredményeink alapján egyedül a legérzékenyebb M24met sejtvonalnál detektáltunk jelentősebb p-S6 és p-Akt csökkenést ZA kezelés után. Ezzel szemben a lipofil BPH jelentős mértékben lecsökkentette mind a p-S6, mind pedig a p-Akt szintet négy sejtvonal esetében (A375, WM35, M24met, VM47), ami jól korrelál a Xia és munkatársai által tüdő adenokarcinóma sejtvonalakon megmutatott eredményekkel (Xia és mtsai 2014).

A Rheb egy PI3K/Akt jelpályán szerepet játszó kis G fehérje, melynek a RAS-hoz hasonlóan, optimális működéséhez prenilálódnia kell. Feltételeztük, hogy az A375, WM35, M24met és VM47 sejtekben BPH hatására lecsökkenő p-S6 és p-Akt szint összefügghet a Rheb prenilációjának csökkenésével. Ezért western blot segítségével megvizsgáltuk a Rheb aktivitásának változását is, és azt találtuk, hogy a négy sejtből három esetben (A375, WM35, VM47) a Rheb fehérje két sávban jelenik meg BPH kezelés után. Más kutatócsoportok is találkoztak a jelenséggel preniláció gátló vegyületek alkalmazásakor, és leírták, hogy a felső sáv a prenilálatlan, míg az alsó a prenilált fehérjét jelzi (Finlay és mtsai 2007, Hanker és mtsai 2010, Ding és mtsai 2014). Ezek alapján elmondható, hogy A375 és VM47 sejtekben BPH kezelés hatására a Rheb fehérje prenilált formája majdnem teljesen eltűnt, míg WM35 sejtben lecsökkent a prenilált és megjelent a prenilálatlan fehérje is. Az M24met sejtvonalban a Rheb teljes mennyisége lecsökkent kezelés hatására. Érdekes, hogy mindkét hatóanyag csökkentette a Rheb mennyiségét, de a BPH nagyobb mértékben. Fontos megjegyezni, hogy éppen ez a négy sejtvonal volt a legérzékenyebb BPH kezelésre az életképességi és apoptózis indukciós tesztek alapján. Ezek alapján feltételezhető, hogy a BPH hatásmechanizmusában szerepet játszik a Rheb fehérje prenilációjának gátlása.

Ismert azonban a Rheb fehérje RAS/RAF útvonalra kifejtett gátló hatása (RAF gátlás) (Karbowiczek és mtsai 2006), mely nagyban befolyásolhatja a BPH monoterápia hatékonyságát, így a továbbiakban érdemes a kombinációs terápiaik lehetőségeit feltérképezni.

Érdekes továbbá, hogy a legkevésbé érzékeny sejtvonalnál (WM3060), mely NRAS és Rac1 mutációt is hordoz, BPH kezelés hatására megemelkedett p-Akt szintet mértünk. Mivel a Rac1 is kis G fehérje és prenilálódik, mutációja feltehetően befolyásolja a BPH sejtre kifejtett hatását, mint ahogy leírták korábban a Rac1 mutáció szerepét a RAF gátlószerek elleni rezisztenciában is (Watson és mtsai 2014).

Összességében elmondható, hogy a BPH a legtöbb vizsgált melanóma sejtvonalon hatékonyabbnak bizonyult a ZA-nál *in vitro* és *in vivo* egyaránt. Továbbá megállapítottuk, hogy a BPH hatásmechanizmusában feltehetően fontos szerepet játszik a PI3K/Akt jelpálya, azon belül is a Rheb fehérje. További vizsgálatok szükségesek a lipofil biszfoszfonát terápiaik lehetőségének feltérképezésére melanóma kezelésére alkalmazott kombinációs terápiaik részeként.

6. Következtetések

A Célkitűzések fejezetben megfogalmazott felvetésekre a disszertáció új megfigyelései alapján a következő válaszokat adom:

1. A nyolc vizsgált BRAF és BRAF+PI3K/PTEN mutáns sejtvonalak közül két kettős mutáns sejtvonalon mutatkozott szinergista gátló hatás a MEK és PI3K/mTOR szerek kombinálásával. A legérzékenyebb SW1417 sejtvonalon volt az egyetlen, ahol a kombinációs terápia p-Akt szint csökkenéssel, illetve szignifikánsan nagyobb szferoid növekedés gátlással járt. Továbbá *in vivo* adatok alapján is a kombinációs terápia mutatkozott a legeredményesebbnek ezen sejtvonalon. Azonban a kettős mutáció jelenléte önmagában nem prediktív érték a horizontális kombinációs gátlás hatékonyságára.

2. Az újonnan alapított BRAF V600E mutációt hordozó PF49 sejtvonalon életképessége pan-RAF, BRAF és MEK gátló hatóanyagokkal is gátlható. A BRAF+MEK kombinációs gátlás a legtöbb koncentráción erős szinergista hatást mutatott. Illetve elsőként mutattam meg, hogy a BRAF+MEK kombinációs gátlás a rendkívüli migrációs kapacitással rendelkező anaplasztikus pajzsmirigyák PF49 sejtvonalon esetén hatékonyabb, mint az egyszeres kezelések.

3. Elsőként igazoltam, hogy a lipofil BPH hatékonyabb, mint a hidrofil ZA melanóma sejtvonalakon. Elmondható, hogy a legtöbb sejt esetén, mutációs csoporttól függetlenül, a BPH fejtett ki nagyobb gátló hatást a sejtek életképességére és a gyorsabban mozgó sejtek migrációjára. A PI3K/Akt útvonal fehérjéinek aktivációja (S6, Akt, Rheb) a legérzékenyebb sejtek esetén csökkent le BPH kezelés után. 3D környezetben a BPH egyetlen sejt esetén nem volt hatékonyabb a ZA-nál. *In vivo* körülmények között a ZA nem, de a BPH kis mértékben képes volt gátlani a tumornövekedést. Ezen eredmények alátámasztják előzetes feltételezésemet, miszerint a lipofilabb BPH hatékonyabb melanóma sejtvonalakon, vélhetően jobb diffúziós tulajdonságai és biohasznosulása miatt.

7. Összefoglalás

A RAS/RAF és PI3K/Akt jelpálya szerepe a daganatok kialakulásában és fenntartásában kulcsfontosságú. A két jelpályán együttesen jelen levő mutációk és a pályák közötti és azokon belüli intenzív kommunikáció és visszacsatolási folyamatok nagy mértékben megnehezítik a hatékony célzott terápiát.

A dolgozatomban összehasonlítottam a BRAF és BRAF+PI3K/PTEN mutáns sejtvonalak érzékenységét a RAS/RAF és PI3K/Akt jelpályák kombinációs gátlásával szemben. Megvizsgáltam egy BRAF V600E mutáns anaplasztikus pajzsmirigyák sejtvonala RAS/RAF jelpálya gátlószerével szembeni szenzitivitását egyszeres és kombinációs terápiában. Valamint BRAF-, BRAF+PTEN-, NRAS mutáns és vad típusú melanóma sejtvonalak lipofil és hidrofil biszfoszfonátokkal szembeni érzékenységét vettem össze. A PI3K/mTOR gátló BEZ235 és MEK gátló selumetinib hatóanyagok kombinációja csak bizonyos BRAF+PI3K/PTEN mutáns sejtneél mutatott szinergista gátló hatást. A p-Akt szint egyedül a legérzékenyebb SW1417 sejtvonalnál csökkent le kombináció hatására, ahogy 3D kísérletekben is csak ennél a sejtvonalnál tapasztaltunk szignifikáns különbséget az egyszeres és a kombinációs csoportok között. Az állatkísérlet eredményei alátámasztották, hogy a kombinációs kezelés képes a legnagyobb tumornövekedés gátló hatást elérni. A PF49 sejtvonala az összes vizsgált RAS/RAF útvonal gátló szerrel szemben érzéketlenebb volt, mint az A375 sejtvonala. Azonban a kombinációs kezelés jelentős szinergista hatást mutatott a legtöbb koncentráción. Valamint, a rendkívül mozgékony PF49 sejtvonala migrációja a kombinációs kezelés hatására jobban lecsökkent, mint bármely egyszeres kezelés hatására. A lipofil (BPH) és hidrofil (ZA) biszfoszfonátok vizsgálata megmutatta, hogy a BPH a legtöbb sejt esetén hatékonyabb a ZA-hoz képest életképesség gátlás és apoptózis indukció tekintetében. A PI3K/Akt útvonal fehérjéinek aktivitása nagyobb mértékben csökkent BPH kezelésre, különös tekintettel a Rheb-re. Elmondható, hogy a magasabb alapmotilitással jellemezhető sejtvonalak érzékenyebbek voltak a BPH-ra, mint a ZA kezelésre a migrációs teszteken. Az egyetlen sejtvonala, M24met, mely az *in vitro* kísérletekben érzékenyebb volt ZA-al szemben, *in vivo* körülmények között már BPH-ra volt szenzitívebb. Összességében ezen eredmények hozzájárulhatnak a RAS/RAF és PI3K/Akt jelpályán mutációt hordozó daganatos betegek célzott terápiájának optimalizálásához.

8. Summary

RAS/RAF and PI3K/Akt pathways have key role in the development and maintenance of cancers. Mutations in both signaling pathways, feedback mechanisms and the cross-talk between signaling cascades can contribute to the failure of targeted therapy. In my dissertation we compared the sensitivity of BRAF mutant and BRAF+PI3K/PTEN mutant tumor cells to the combinational inhibition of RAS/RAF and PI3K/Akt pathways. Second, we determined the sensitivity of a novel BRAF V600E mutant anaplastic thyroid cancer cell line (PF49) against RAS/RAF pathway inhibitors alone or in combination. Finally, we studied the effectiveness of hydrophilic and lipophilic bisphosphonates in melanoma cells carrying BRAF, BRAF+PTEN, NRAS or none of these mutations.

PI3K/mTOR inhibitor (BEZ235) and MEK inhibitor (selumetinib) had synergistic effect in two BRAF+PI3K/PTEN mutant cell lines. Additionally, decrease of p-Akt level was detected upon combination treatment only in the most sensitive cell line. Furthermore, the combinational inhibition was more effective in 3D spheroid assay and *in vivo* xenograft experiments when compared to monotherapies. Next, the BRAF mutant PF49 cell line was sensitive to RAS/RAF pathway inhibitors but to a lesser extent than the BRAF mutant melanoma line, A375. However, strong synergism was detected in the combination treatment with vemurafenib and selumetinib in the anaplastic thyroid cancer cells. Finally, motility of the PF49 cell line with high migratory capacity was decreased successfully especially with combination treatment. We also demonstrated that the lipophilic bisphosphonate (BPH) was more effective than the hydrophilic one (ZA) in inhibition of cell viability and in induction of apoptosis in the majority of melanoma cell lines. Interestingly, BPH was able to decrease the activation of PI3K/Akt pathway, especially Rheb, more robustly than the activity of the RAS/RAF pathway. In addition, faster migrating cell lines were more sensitive to BPH than ZA in migration assays. Importantly, the only cell line with higher sensitivity to ZA *in vitro* was found to be more sensitive to BPH *in vivo*.

In summary, these results may contribute to the optimization of the therapy for patients with cancers carrying RAS/RAF and PI3K/Akt pathway mutations.

9. Irodalomjegyzék

- Ahearn IM, Haigis K, Bar-Sagi D, Philips MR. (2011) Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13: 39-51.
- Akinleye A, Furqan M, Mukhi N, Ravella P, Liu D. (2013) MEK and the inhibitors: from bench to bedside. *J Hematol Oncol*, 6: 27.
- Akslen LA, Angelini S, Straume O, Bachmann IM, Molven A, Hemminki K, Kumar R. (2005) BRAF and NRAS mutations are frequent in nodular melanoma but are not associated with tumor cell proliferation or patient survival. *J Invest Dermatol*, 125: 312-317.
- Akslen LA, Puntervoll H, Bachmann IM, Straume O, Vuhahula E, Kumar R, Molven A. (2008) Mutation analysis of the EGFR-NRAS-BRAF pathway in melanomas from black Africans and other subgroups of cutaneous melanoma. *Melanoma Res*, 18: 29-35.
- Alzahrani AS. (2019) PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside. *Semin Cancer Biol*, 59: 125-132.
- Amin D, Cornell SA, Gustafson SK, Needle SJ, Ullrich JW, Bilder GE, Perrone MH. (1992) Bisphosphonates used for the treatment of bone disorders inhibit squalene synthase and cholesterol biosynthesis. *J Lipid Res*, 33: 1657-1663.
- Ascierto PA, McArthur GA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Di Giacomo AM, Mandalà M, Demidov L, Stroyakovskiy D, Thomas L, de la Cruz-Merino L, Dutriaux C, Garbe C, Yan Y, Wongchenko M, Chang I, Hsu JJ, Koralek DO, Rooney I, Ribas A, Larkin J. (2016) Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 17: 1248-1260.
- Aziz SA, Jilaveanu LB, Zito C, Camp RL, Rimm DL, Conrad P, Kluger HM. (2010) Vertical targeting of the phosphatidylinositol-3 kinase pathway as a strategy for treating melanoma. *Clin Cancer Res*, 16: 6029-6039.
- Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, Hartleb D, Stoecklein NH, Gabbert HE. (2010) Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res*, 16: 790-799.

- Baranyi M, Rittler D, Molnár E, Shirasawa S, Jalsovszky I, Varga IK, Hegedűs L, Németh A, Dank M, Aigner C, Tóvári J, Tímár J, Hegedűs B, Garay T. (2020) Next Generation Lipophilic Bisphosphonate Shows Antitumor Effect in Colorectal Cancer In Vitro and In Vivo. *Pathol Oncol Res*, 26: 1957–1969.
- Bartholomeusz C, Xie X, Pitner MK, Kondo K, Dadbin A, Lee J, Saso H, Smith PD, Dalby KN, Ueno NT. (2015) MEK Inhibitor Selumetinib (AZD6244; ARRY-142886) Prevents Lung Metastasis in a Triple-Negative Breast Cancer Xenograft Model. *Mol Cancer Ther*, 14: 2773-2781.
- Beaumont KA, Mohana-Kumaran N, Haass NK. (2013) Modeling Melanoma In Vitro and In Vivo. *Healthcare (Basel)*, 2: 27-46.
- Besic N, Gazic B. (2013) Sites of metastases of anaplastic thyroid carcinoma: autopsy findings in 45 cases from a single institution. *Thyroid*, 23: 709-713.
- Blasco RB, Francoz S, Santamaria D, Canamero M, Dubus P, Charron J, Baccarini M, Barbacid M. (2011) c-Raf, but not B-Raf, is essential for development of K-Ras oncogene-driven non-small cell lung carcinoma. *Cancer Cell*, 19: 652-663.
- Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magnetto S, Ebetino FH, Colombel M, Delmas P, Delaisse JM, Clezardin P. (2000) Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res*, 60: 2949-2954.
- Bonhomme B, Godbert Y, Perot G, Al Ghuzlan A, Bardet S, Belleanne G, Criniere L, Do Cao C, Fouilloux G, Guyetant S, Kelly A, Leboulleux S, Buffet C, Leteurtre E, Michels JJ, Tissier F, Toubert ME, Wassef M, Pinard C, Hostein I, Soubeyran I. (2017) Molecular Pathology of Anaplastic Thyroid Carcinomas: A Retrospective Study of 144 Cases. *Thyroid*, 27: 682-692.
- Boulmier A, Feng X, Oms O, Mialane P, Riviere E, Shin CJ, Yao J, Kubo T, Furuta T, Oldfield E, Dolbecq A. (2017) Anticancer Activity of Polyoxometalate-Bisphosphonate Complexes: Synthesis, Characterization, In Vitro and In Vivo Results. *Inorg Chem*, 56: 7558-7565.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68: 394-424.

- Brenan L, Andreev A, Cohen O, Pantel S, Kamburov A, Cacchiarelli D, Persky NS, Zhu C, Bagul M, Goetz EM, Burgin AB, Garraway LA, Getz G, Mikkelsen TS, Piccioni F, Root DE, Johannessen CM. (2016) Phenotypic Characterization of a Comprehensive Set of MAPK1/ERK2 Missense Mutants. *Cell Rep*, 17: 1171-1183.
- Britten CD. (2013) PI3K and MEK inhibitor combinations: examining the evidence in selected tumor types. *Cancer Chemother Pharmacol*, 71: 1395-1409.
- Broecker-Preuss M, Müller S, Britten M, Worm K, Schmid KW, Mann K, Fuhrer D. (2015) Sorafenib inhibits intracellular signaling pathways and induces cell cycle arrest and cell death in thyroid carcinoma cells irrespective of histological origin or BRAF mutational status. *BMC Cancer*, 15: 184.
- Brown NA, Furtado LV, Betz BL, Kiel MJ, Weigelin HC, Lim MS, Elenitoba-Johnson KS. (2014) High prevalence of somatic MAP2K1 mutations in BRAF V600E-negative Langerhans cell histiocytosis. *Blood*, 124: 1655-1658.
- Brown SR, Hall A, Buckley HL, Flanagan L, Gonzalez de Castro D, Farnell K, Moss L, Gregory R, Newbold K, Du Y, Flux G, Wadsley J. (2019) Investigating the potential clinical benefit of Selumetinib in resensitising advanced iodine refractory differentiated thyroid cancer to radioiodine therapy (SEL-I-METRY): protocol for a multicentre UK single arm phase II trial. *BMC Cancer*, 19: 582.
- Cabanillas ME, Ryder M, Jimenez C. (2019) Targeted Therapy for Advanced Thyroid Cancer: Kinase Inhibitors and Beyond. *Endocr Rev*, 40: 1573-1604.
- Cabanillas ME, Zafereo M, Gunn GB, Ferrarotto R. (2016) Anaplastic Thyroid Carcinoma: Treatment in the Age of Molecular Targeted Therapy. *J Oncol Pract*, 12: 511-518.
- Candido S, Rapisarda V, Marconi A, Malaponte G, Bevelacqua V, Gangemi P, Scalisi A, McCubrey JA, Maestro R, Spandidos DA, Fenga C, Libra M. (2014) Analysis of the B-RafV600E mutation in cutaneous melanoma patients with occupational sun exposure. *Oncol Rep*, 31: 1079-1082.
- Canon J, Rex K, Saiki AY, Mohr C, Cooke K, Bagal D, Gaida K, Holt T, Knutson CG, Koppada N, Lanman BA, Werner J, Rapaport AS, San Miguel T, Ortiz R, Osgood T, Sun JR, Zhu X, McCarter JD, Volak LP, Houk BE, Fakih MG, O'Neil BH, Price TJ, Falchook GS, Desai J, Kuo J, Govindan R, Hong DS, Ouyang W, Henary H, Arvedson

- T, Cee VJ, Lipford JR. (2019) The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature*, 575: 217-223.
- Carracedo A, Alimonti A, Pandolfi PP. (2011) PTEN level in tumor suppression: how much is too little? *Cancer Res*, 71: 629-633.
- Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, Egia A, Sasaki AT, Thomas G, Kozma SC, Papa A, Nardella C, Cantley LC, Baselga J, Pandolfi PP. (2008) Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest*, 118: 3065-3074.
- Carriere A, Romeo Y, Acosta-Jaquez HA, Moreau J, Bonneil E, Thibault P, Fingar DC, Roux PP. (2011) ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem*, 286: 567-577.
- Caunt CJ, Sale MJ, Smith PD, Cook SJ. (2015) MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road. *Nature reviews. Cancer*, 15: 577-592.
- Chamcheu JC, Roy T, Uddin MB, Banang-Mbeumi S, Chamcheu RN, Walker AL, Liu YY, Huang S. (2019) Role and Therapeutic Targeting of the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in Skin Cancer: A Review of Current Status and Future Trends on Natural and Synthetic Agents Therapy. *Cells*, 8: 803.
- Chandarlapaty S, Sawai A, Scaltriti M, Rodrik-Outmezguine V, Grbovic-Huezo O, Serra V, Majumder PK, Baselga J, Rosen N. (2011) AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer Cell*, 19: 58-71.
- Chen G, Nicula D, Renko K, Derwahl M. (2015) Synergistic anti-proliferative effect of metformin and sorafenib on growth of anaplastic thyroid cancer cells and their stem cells. *Oncol Rep*, 33: 1994-2000.
- Chen H, Luthra R, Routbort MJ, Patel KP, Cabanillas ME, Broaddus RR, Williams MD. (2018) Molecular Profile of Advanced Thyroid Carcinomas by Next-Generation Sequencing: Characterizing Tumors Beyond Diagnosis for Targeted Therapy. *Mol Cancer Ther*, 17: 1575-1584.
- Chen L, Ding Y, Wang Y, Liu X, Babu R, Ravis W, Yan W. (2013) Codelivery of zoledronic acid and doublestranded RNA from core-shell nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 8: 137-145.

- Chou T-C. (2010) Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Res*, 70: 440.
- Cohen R, Cervera P, Svrcek M, Pellat A, Dreyer C, de Gramont A, Andre T. (2017) BRAF-Mutated Colorectal Cancer: What Is the Optimal Strategy for Treatment? *Curr Treat Options Oncol*, 18: 9.
- Cole PA, Chu N, Salguero AL, Bae H. (2019) AKTivation mechanisms. *Curr Opin Struct Biol*, 59: 47-53.
- Consoli F, Bersanelli M, Perego G, Grisanti S, Merelli B, Berruti A, Petrelli F. (2020) Network indirect comparison of 3 BRAF + MEK inhibitors for the treatment of advanced BRAF mutated melanoma. *Clin Transl Oncol*, 22: 900-907.
- Corcoran RB, Atreya CE, Falchook GS, Kwak EL, Ryan DP, Bendell JC, Hamid O, Messersmith WA, Daud A, Kurzrock R, Pierobon M, Sun P, Cunningham E, Little S, Orford K, Motwani M, Bai Y, Patel K, Venook AP, Kopetz S. (2015) Combined BRAF and MEK Inhibition With Dabrafenib and Trametinib in BRAF V600-Mutant Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*, 33: 4023-4031.
- Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. (2014) Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat Rev Drug Discov*, 13: 828-851.
- Dal Maso L, Tavilla A, Pacini F, Serraino D, van Dijk BAC, Chirlaque MD, Capocaccia R, Larranaga N, Colonna M, Agius D, Ardanaz E, Rubio-Casadevall J, Kowalska A, Virdone S, Mallone S, Amash H, De Angelis R. (2017) Survival of 86,690 patients with thyroid cancer: A population-based study in 29 European countries from EURO CARE-5. *Eur J Cancer*, 77: 140-152.
- Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky WE, Jr., You MJ, DePinho RA, McMahon M, Bosenberg M. (2009) Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet*, 41: 544-552.
- Davies BR, Logie A, McKay JS, Martin P, Steele S, Jenkins R, Cockerill M, Cartlidge S, Smith PD. (2007) AZD6244 (ARRY-142886), a potent inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 1/2 kinases: mechanism of action in vivo, pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, and potential for combination in preclinical models. *Mol Cancer Ther*, 6: 2209-2219.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S,

- Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417: 949-954.
- Deb S, Jackson CT, Subler MA, Martin DW. (1992) Modulation of cellular and viral promoters by mutant human p53 proteins found in tumor cells. *J Virol*, 66: 6164-6170.
- Degirmenci U, Wang M, Hu J. (2020) Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells*, 9: 198.
- Denoyelle C, Hong L, Vannier JP, Soria J, Soria C. (2003) New insights into the actions of bisphosphonate zoledronic acid in breast cancer cells by dual RhoA-dependent and -independent effects. *Br J Cancer*, 88: 1631-1640.
- Ding H, McDonald JS, Yun S, Schneider PA, Peterson KL, Flatten KS, Loegering DA, Oberg AL, Riska SM, Huang S, Sinicrope FA, Adjei AA, Karp JE, Meng XW, Kaufmann SH. (2014) Farnesyltransferase inhibitor tipifarnib inhibits Rheb prenylation and stabilizes Bax in acute myelogenous leukemia cells. *Haematologica*, 99: 60-69.
- Dong M, Liu X, Evert K, Utpatel K, Peters M, Zhang S, Xu Z, Che L, Cigliano A, Ribback S, Dombrowski F, Cossu A, Gordan J, Calvisi DF, Evert M, Liu Y, Chen X. (2018) Efficacy of MEK inhibition in a K-Ras-driven cholangiocarcinoma preclinical model. *Cell Death Dis*, 9: 31.
- Dummer R, Ascierto PA, Gogas HJ, Arance A, Mandalà M, Liskay G, Garbe C, Schadendorf D, Krajsova I, Gutzmer R, Chiarion-Sileni V, Dutriaux C, de Groot JWB, Yamazaki N, Loquai C, Moutouh-de Parseval LA, Pickard MD, Sandor V, Robert C, Flaherty KT. (2018) Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 19: 603-615.
- El Zaoui I, Bucher M, Rimoldi D, Nicolas M, Kaya G, Pescini Gobert R, Bedoni N, Schalenbourg A, Sakina E, Zografos L, Leyvraz S, Riggi N, Rivolta C, Moulin AP.

- (2019) Conjunctival Melanoma Targeted Therapy: MAPK and PI3K/mTOR Pathways Inhibition. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 60: 2764-2772.
- Engelman JA, Chen L, Tan X, Crosby K, Guimaraes AR, Upadhyay R, Maira M, McNamara K, Perera SA, Song Y, Chirieac LR, Kaur R, Lightbown A, Simendinger J, Li T, Padera RF, García-Echeverría C, Weissleder R, Mahmood U, Cantley LC, Wong KK. (2008) Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat Med*, 14: 1351-1356.
- Ewald F, Norz D, Grottke A, Hofmann BT, Nashan B, Jucker M. (2014) Dual Inhibition of PI3K-AKT-mTOR- and RAF-MEK-ERK-signaling is synergistic in cholangiocarcinoma and reverses acquired resistance to MEK-inhibitors. *Invest New Drugs*, 32: 1144-1154.
- Fazio N, Buzzoni R, Baudin E, Antonuzzo L, Hubner RA, Lahner H, De Herder WW, Raderer M, Teulé A, Capdevila J, Libutti SK, Kulke MH, Shah M, Dey D, Turri S, Aimone P, Massacesi C, Verslype C. (2016) A Phase II Study of BEZ235 in Patients with Everolimus-resistant, Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumours. *Anticancer Res*, 36: 713-719.
- Ferrari SM, Elia G, Ragusa F, Ruffilli I, La Motta C, Paparo SR, Patrizio A, Vita R, Benvenga S, Materazzi G, Fallahi P, Antonelli A. (2020) Novel treatments for anaplastic thyroid carcinoma. *Gland Surg*, 9: S28-S42.
- Finlay GA, Malhowski AJ, Liu Y, Fanburg BL, Kwiatkowski DJ, Toksoz D. (2007) Selective inhibition of growth of tuberous sclerosis complex 2 null cells by atorvastatin is associated with impaired Rheb and Rho GTPase function and reduced mTOR/S6 kinase activity. *Cancer Res*, 67: 9878-9886.
- Forbes SA, Beare D, Boutselakis H, Bamford S, Bindal N, Tate J, Cole CG, Ward S, Dawson E, Ponting L, Stefancsik R, Harsha B, Kok CY, Jia M, Jubb H, Sondka Z, Thompson S, De T, Campbell PJ. (2017) COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res*, 45: D777-D783.
- Forsea AM, Müller C, Riebeling C, Orfanos CE, Geilen CC. (2004) Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit cell cycle progression in human melanoma cells. *Br J Cancer*, 91: 803-810.
- Fragni M, Bonini SA, Bettinsoli P, Bodei S, Generali D, Bottini A, Spano PF, Memo M, Sigala S. (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: 529-538.
- Freeman AK, Ritt DA, Morrison DK. (2013) Effects of Raf dimerization and its inhibition on normal and disease-associated Raf signaling. *Mol Cell*, 49: 751-758.
- Garay T, Juhász É, Molnár E, Eisenbauer M, Cziráok A, Dekan B, László V, Hoda MA, Döme B, Tímár J, Klepetko W, Berger W, Hegedűs B. (2013) Cell migration or cytokinesis and proliferation?--revisiting the "go or grow" hypothesis in cancer cells in vitro. *Exp Cell Res*, 319: 3094-3103.
- 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. (2015) Prenylation inhibition-induced cell death in melanoma: reduced sensitivity in BRAF mutant/PTEN wild-type melanoma cells. *PLoS One*, 10: e0117021.
- Garbe C, Eigentler TK. (2018) Vemurafenib. *Recent Results Cancer Res*, 211: 77-89.
- Gautschi O, Milia J, Cabarrou B, Bluthgen MV, Besse B, Smit EF, Wolf J, Peters S, Fruh M, Koeberle D, Oulkhovir Y, Schuler M, Curioni-Fontecedro A, Huret B, Kerjouan M, Michels S, Pall G, Rothschild S, Schmid-Bindert G, Scheffler M, Veillon R, Wannesson L, Diebold J, Zalcman G, Filleron T, Mazieres J. (2015) Targeted Therapy for Patients with BRAF-Mutant Lung Cancer: Results from the European EURAF Cohort. *J Thorac Oncol*, 10: 1451-1457.
- Gayyed MF, Abd El-Maqsoud NM, El-Hameed El-Heeny AA, Mohammed MF. (2015) c-MET expression in colorectal adenomas and primary carcinomas with its corresponding metastases. *J Gastrointest Oncol*, 6: 618-627.
- Ghosh AP, Marshall CB, Coric T, Shim EH, Kirkman R, Ballestas ME, Ikura M, Bjornsti MA, Sudarshan S. (2015) Point mutations of the mTOR-RHEB pathway in renal cell carcinoma. *Oncotarget*, 6: 17895-17910.
- Goldvaser H, Amir E. (2019) Role of Bisphosphonates in Breast Cancer Therapy. *Curr Treat Options Oncol*, 20: 26.
- Gopal YN, Deng W, Woodman SE, Komurov K, Ram P, Smith PD, Davies MA. (2010) Basal and treatment-induced activation of AKT mediates resistance to cell death by AZD6244 (ARRY-142886) in Braf-mutant human cutaneous melanoma cells. *Cancer Res*, 70: 8736-8747.

- Gort E, Johnson ML, Hwang JJ, Pant S, Dünzinger U, Riemann K, Kitzing T, Janne PA. (2020) A phase I, open-label, dose-escalation trial of BI 1701963 as monotherapy and in combination with trametinib in patients with KRAS mutated advanced or metastatic solid tumors. *J Clin Oncol*, 38: TPS3651.
- Grazia G, Vegetti C, Benigni F, Penna I, Perotti V, Tassi E, Bersani I, Nicolini G, Canevari S, Carlo-Stella C, Gianni AM, Mortarini R, Anichini A. (2014) Synergistic anti-tumor activity and inhibition of angiogenesis by cotargeting of oncogenic and death receptor pathways in human melanoma. *Cell Death Dis*, 5: e1434.
- Green JR, Clezardin P. (2002) Mechanisms of bisphosphonate effects on osteoclasts, tumor cell growth, and metastasis. *Am J Clin Oncol*, 25: S3-S9.
- Gross AM, Wolters PL, Dombi E, Baldwin A, Whitcomb P, Fisher MJ, Weiss B, Kim A, Bornhorst M, Shah AC, Martin S, Roderick MC, Pichard DC, Carbonell A, Paul SM, Therrien J, Kapustina O, Heisey K, Clapp DW, Zhang C, Peer CJ, Figg WD, Smith M, Glod J, Blakeley JO, Steinberg SM, Venzon DJ, Doyle LA, Widemann BC. (2020) Selumetinib in Children with Inoperable Plexiform Neurofibromas. *N Engl J Med*, 382: 1430-1442.
- Haling JR, Sudhamsu J, Yen I, Sideris S, Sandoval W, Phung W, Bravo BJ, Giannetti AM, Peck A, Masselot A, Morales T, Smith D, Brandhuber BJ, Hymowitz SG, Malek S. (2014) Structure of the BRAF-MEK complex reveals a kinase activity independent role for BRAF in MAPK signaling. *Cancer Cell*, 26: 402-413.
- Hallin J, Engstrom LD, Hargis L, Calinisan A, Aranda R, Briere DM, Sudhakar N, Bowcut V, Baer BR, Ballard JA, Burkard MR, Fell JB, Fischer JP, Vigers GP, Xue Y, Gatto S, Fernandez-Banet J, Pavlicek A, Velastagui K, Chao RC, Barton J, Pierobon M, Baldelli E, Patricoin EF, 3rd, Cassidy DP, Marx MA, Rybkin, II, Johnson ML, Ou SI, Lito P, Papadopoulos KP, Jänne PA, Olson P, Christensen JG. (2020) The KRAS(G12C) Inhibitor MRTX849 Provides Insight toward Therapeutic Susceptibility of KRAS-Mutant Cancers in Mouse Models and Patients. *Cancer Discov*, 10: 54-71.
- Hanker AB, Mitin N, Wilder RS, Henske EP, Tamanoi F, Cox AD, Der CJ. (2010) Differential requirement of CAAX-mediated posttranslational processing for Rheb localization and signaling. *Oncogene*, 29: 380-391.

- Hatzivassiliou G, Liu B, O'Brien C, Spoerke JM, Hoeflich KP, Haverty PM, Soriano R, Forrest WF, Heldens S, Chen H, Toy K, Ha C, Zhou W, Song K, Friedman LS, Amler LC, Hampton GM, Moffat J, Belvin M, Lackner MR. (2012) ERK inhibition overcomes acquired resistance to MEK inhibitors. *Mol Cancer Ther*, 11: 1143-1154.
- Hegemann M, Maas M, Rausch S, Walz S, Bedke J, Stenzl A, Todenhofer T. (2017) Current concepts and trends in the treatment of bone metastases in patients with advanced prostate cancer. *Asian J Androl*: 12-18.
- Hiraga T, Williams PJ, Ueda A, Tamura D, Yoneda T. (2004) Zoledronic acid inhibits visceral metastases in the 4T1/luc mouse breast cancer model. *Clin Cancer Res*, 10: 4559-4567.
- Hirbe AC, Roelofs AJ, Floyd DH, Deng H, Becker SN, Lanigan LG, Apicelli AJ, Xu Z, Prior JL, Eagleton MC, Piwnica-Worms D, Rogers MJ, Weilbaecher K. (2009) The bisphosphonate zoledronic acid decreases tumor growth in bone in mice with defective osteoclasts. *Bone*, 44: 908-916.
- Ho DWH, Chan LK, Chiu YT, Xu IMJ, Poon RTP, Cheung TT, Tang CN, Tang VWL, Lo ILO, Lam PWY, Yau DTW, Li MX, Wong CM, Ng IOL. (2017) TSC1/2 mutations define a molecular subset of HCC with aggressive behaviour and treatment implication. *Gut*, 66: 1496-1506.
- Holderfield M, Deuker MM, McCormick F, McMahon M. (2014) Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nat Rev Cancer*, 14: 455-467.
- Holderfield M, Nagel TE, Stuart DD. (2014) Mechanism and consequences of RAF kinase activation by small-molecule inhibitors. *Br J Cancer*, 111: 640-645.
- Hollander MC, Blumenthal GM, Dennis PA. (2011) PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat Rev Cancer*, 11: 289-301.
- Huynh H, Soo KC, Chow PKH, Tran E. (2007) Targeted inhibition of the extracellular signal-regulated kinase kinase pathway with AZD6244 (ARRY-142886) in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther*, 6: 138-146.
- Hyman DM, Puzanov I, Subbiah V, Faris JE, Chau I, Blay JY, Wolf J, Raje NS, Diamond EL, Hollebecque A, Gervais R, Elez-Fernandez ME, Italiano A, Hofheinz RD, Hidalgo M, Chan E, Schuler M, Lasserre SF, Makrutzki M, Sirzen F, Veronese ML, Tabernero

- J, Baselga J. (2015) Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations. *N Engl J Med*, 373: 726-736.
- Ishihara S, Onoda N, Noda S, Asano Y, Tauchi Y, Morisaki T, Kashiwagi S, Takashima T, Ohira M. (2019) Sorafenib inhibits vascular endothelial cell proliferation stimulated by anaplastic thyroid cancer cells regardless of BRAF mutation status. *Int J Oncol*, 55: 1069-1076.
- Izar B, Sharfman W, Hodi FS, Lawrence D, Flaherty KT, Amaravadi R, Kim KB, Puzanov I, Sosman J, Dummer R, Goldinger SM, Lam L, Kakar S, Tang Z, Krieter O, McDermott DF, Atkins MB. (2017) A first-in-human phase I, multicenter, open-label, dose-escalation study of the oral RAF/VEGFR-2 inhibitor (RAF265) in locally advanced or metastatic melanoma independent from BRAF mutation status. *Cancer Med*, 6: 1904-1914.
- Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN. (2004) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*, 6: 1122-1128.
- Janku F, Lee JJ, Tsimberidou AM, Hong DS, Naing A, Falchook GS, Fu S, Luthra R, Garrido-Laguna I, Kurzrock R. (2011) PIK3CA mutations frequently coexist with RAS and BRAF mutations in patients with advanced cancers. *PLoS One*, 6: e22769.
- Janku F, Yap TA, Meric-Bernstam F. (2018) Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? *Nat Rev Clin Oncol*, 15: 273-291.
- Jiao X, Zhang H, Xu X, Yu Y, Zhang H, Zhang J, Ning L, Hao F, Liu X, Niu M, Chen CT, Chen D, Zhang K. (2018) S100A4 Knockout Sensitizes Anaplastic Thyroid Carcinoma Cells Harboring BRAFV600E/Mt to Vemurafenib. *Cell Physiol Biochem*, 49: 1143-1162.
- Julien LA, Carriere A, Moreau J, Roux PP. (2010) mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol*, 30: 908-921.
- Karbowiczek M, Robertson GP, Henske EP. (2006) Rheb inhibits C-raf activity and B-raf/C-raf heterodimerization. *J Biol Chem*, 281: 25447-25456.
- Kim EH, Kim MS, Lee KH, Koh JS, Jung WG, Kong CB. (2016) Zoledronic acid is an effective radiosensitizer in the treatment of osteosarcoma. *Oncotarget*, 7: 70869-70880.

- Kim EK, Choi EJ. (2015) Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Arch Toxicol*, 89: 867-882.
- Kopetz S, Desai J, Chan E, Hecht JR, O'Dwyer PJ, Maru D, Morris V, Janku F, Dasari A, Chung W, Issa JP, Gibbs P, James B, Powis G, Nolop KB, Bhattacharya S, Saltz L. (2015) Phase II Pilot Study of Vemurafenib in Patients With Metastatic BRAF-Mutated Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*, 33: 4032-4038.
- Kotani H, Adachi Y, Kitai H, Tomida S, Bando H, Faber AC, Yoshino T, Voon DC, Yano S, Ebi H. (2018) Distinct dependencies on receptor tyrosine kinases in the regulation of MAPK signaling between BRAF V600E and non-V600E mutant lung cancers. *Oncogene*, 37: 1775-1787.
- Kozyrakis D, Paridis D, Perikleous S, Malizos K, Zarkadas A, Tsagkalis A. (2018) The Current Role of Osteoclast Inhibitors in Patients with Prostate Cancer. *Adv Urol*, 2018: 1525832.
- Kuger S, Flentje M, Djuzenova CS. (2015) Simultaneous perturbation of the MAPK and the PI3K/mTOR pathways does not lead to increased radiosensitization. *Radiat Oncol*, 10: 214.
- Kunz M, Vera J. (2019) Modelling of Protein Kinase Signaling Pathways in Melanoma and Other Cancers. *Cancers (Basel)*, 11: 465.
- Kurata K, Onoda N, Noda S, Kashiwagi S, Asano Y, Hirakawa K, Ohira M. (2016) Growth arrest by activated BRAF and MEK inhibition in human anaplastic thyroid cancer cells. *Int J Oncol*, 49: 2303-2308.
- Kurebayashi J, Otsuki T, Tanaka K, Yamamoto Y, Moriya T, Sonoo H. (2003) Medroxyprogesterone acetate decreases secretion of interleukin-6 and parathyroid hormone-related protein in a new anaplastic thyroid cancer cell line, KTC-2. *Thyroid*, 13: 249-258.
- Kwiatkowski DJ, Choueiri TK, Fay AP, Rini BI, Thorner AR, de Velasco G, Tyburczy ME, Hamieh L, Albiges L, Agarwal N, Ho TH, Song J, Pignon JC, Barrios PM, Michaelson MD, Van Allen E, Krajewski KM, Porta C, Pal S, Bellmunt J, McDermott DF, Heng DYC, Gray KP, Signoretti S. (2016) Mutations in TSC1, TSC2, and MTOR Are Associated with Response to Rapalogs in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 22: 2445-2452.

- Lam KY, Lui MC, Lo CY. (2001) Cytokeratin expression profiles in thyroid carcinomas. *Eur J Surg Oncol*, 27: 631-635.
- Laplante M, Sabatini DM. (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149: 274-293.
- Larkin J, Ascierto PA, Dreno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, Mandala M, Demidov L, Stroyakovskiy D, Thomas L, de la Cruz-Merino L, Dutriaux C, Garbe C, Sovak MA, Chang I, Choong N, Hack SP, McArthur GA, Ribas A. (2014) Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med*, 371: 1867-1876.
- Lavoie H, Therrien M. (2015) Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16: 281-298.
- Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, Meyerson M, Gabriel SB, Lander ES, Getz G. (2014) Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*, 505: 495-501.
- Lee YJ, Kim DH, Lee SH, Kim DW, Nam HS, Cho MK. (2011) Expression of the c-Met Proteins in Malignant Skin Cancers. *Ann Dermatol*, 23: 33-38.
- Lee YR, Chen M, Pandolfi PP. (2018) The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19: 547-562.
- Leonetti A, Facchinetti F, Rossi G, Minari R, Conti A, Friboulet L, Tiseo M, Planchard D. (2018) BRAF in non-small cell lung cancer (NSCLC): Pickaxing another brick in the wall. *Cancer Treat Rev*, 66: 82-94.
- Li J, Kim SG, Blenis J. (2014) Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab*, 19: 373-379.
- Li S, Balmain A, Counter CM. (2018) A model for RAS mutation patterns in cancers: finding the sweet spot. *Nat Rev Cancer*, 18: 767-777.
- Li Y, Dong Q, Cui Y. (2019) Synergistic inhibition of MEK and reciprocal feedback networks for targeted intervention in malignancy. *Cancer Biol Med*, 16: 415-434.
- Liu F, Yang X, Geng M, Huang M. (2018) Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*, 8: 552-562.
- Liu Y, Gunda V, Zhu X, Xu X, Wu J, Askhatova D, Farokhzad OC, Parangi S, Shi J. (2016) Theranostic near-infrared fluorescent nanoplatform for imaging and systemic

- siRNA delivery to metastatic anaplastic thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113: 7750-7755.
- Long GV, Flaherty KT, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, Garbe C, Jouary T, Hauschild A, Chiarion-Sileni V, Lebbe C, Mandala M, Millward M, Arance A, Bondarenko I, Haanen J, Hansson J, Utikal J, Ferraresi V, Mohr P, Probachai V, Schadendorf D, Nathan P, Robert C, Ribas A, Davies MA, Lane SR, Legos JJ, Mookerjee B, Grob JJ. (2017) Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with metastatic BRAF V600E/K-mutant melanoma: long-term survival and safety analysis of a phase 3 study. *Ann Oncol*, 28: 1631-1639.
- Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, Garbe C, Jouary T, Hauschild A, Grob JJ, Chiarion Sileni V, Lebbe C, Mandala M, Millward M, Arance A, Bondarenko I, Haanen JB, Hansson J, Utikal J, Ferraresi V, Kovalenko N, Mohr P, Probachai V, Schadendorf D, Nathan P, Robert C, Ribas A, DeMarini DJ, Irani JG, Casey M, Ouellet D, Martin AM, Le N, Patel K, Flaherty K. (2014) Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *N Engl J Med*, 371: 1877-1888.
- Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. (2005) Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*, 121: 179-193.
- Maertens O, Johnson B, Hollstein P, Frederick DT, Cooper ZA, Messiaen L, Bronson RT, McMahon M, Granter S, Flaherty K, Wargo JA, Marais R, Cichowski K. (2013) Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. *Cancer Discov*, 3: 338-349.
- Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, Brachmann S, Chene P, De Pover A, Schoemaker K, Fabbro D, Gabriel D, Simonen M, Murphy L, Finan P, Sellers W, Garcia-Echeverria C. (2008) Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther*, 7: 1851-1863.
- Malwal SR, O'Dowd B, Feng X, Turhanen P, Shin C, Yao J, Kim BK, Baig N, Zhou T, Bansal S, Khade RL, Zhang Y, Oldfield E. (2018) Bisphosphonate-Generated ATP-Analogs Inhibit Cell Signaling Pathways. *J Am Chem Soc*, 140: 7568-7578.

- Manaswiyoungkul P, de Araujo ED, Gunning PT. (2020) Targeting prenylation inhibition through the mevalonate pathway. *RSC Medicinal Chemistry*, 11: 51-71.
- Mao M, Tian F, Mariadason JM, Tsao CC, Lemos R, Jr., Dayyani F, Gopal YN, Jiang ZQ, Wistuba II, Tang XM, Bornman WG, Bollag G, Mills GB, Powis G, Desai J, Gallick GE, Davies MA, Kopetz S. (2013) Resistance to BRAF inhibition in BRAF-mutant colon cancer can be overcome with PI3K inhibition or demethylating agents. *Clin Cancer Res*, 19: 657-667.
- Martinelli E, Troiani T, D'Aiuto E, Morgillo F, Vitagliano D, Capasso A, Costantino S, Ciuffreda LP, Merolla F, Vecchione L, De Vriendt V, Tejpar S, Nappi A, Sforza V, Martini G, Berrino L, De Palma R, Ciardiello F. (2013) Antitumor activity of pimasertib, a selective MEK 1/2 inhibitor, in combination with PI3K/mTOR inhibitors or with multi-targeted kinase inhibitors in pimasertib-resistant human lung and colorectal cancer cells. *Int J Cancer*, 133: 2089-2101.
- McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. (2007) Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1773: 1263-1284.
- Melosky B, Bradbury P, Tu D, Florescu M, Reiman A, Nicholas G, Basappa N, Rothenstein J, Goffin JR, Laurie SA, Wheatley-Price P, Leighl N, Goss G, Reaume MN, Butts C, Murray N, Card C, Ko J, Blais N, Gray S, Lui H, Brown-Walker P, Kaurah P, Prentice LM, Seymour L. (2019) Selumetinib in patients receiving standard pemetrexed and platinum-based chemotherapy for advanced or metastatic KRAS wildtype or unknown non-squamous non-small cell lung cancer: A randomized, multicenter, phase II study. *Canadian Cancer Trials Group (CCTG) IND.219. Lung Cancer*, 133: 48-55.
- Mendoza MC, Er EE, Blenis J. (2011) The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci*, 36: 320-328.
- Merchant M, Moffat J, Schaefer G, Chan J, Wang X, Orr C, Cheng J, Hunsaker T, Shao L, Wang SJ, Wagle MC, Lin E, Haverty PM, Shahidi-Latham S, Ngu H, Solon M, Eastham-Anderson J, Koeppen H, Huang SA, Schwarz J, Belvin M, Kirouac D,

- Junttila MR. (2017) Combined MEK and ERK inhibition overcomes therapy-mediated pathway reactivation in RAS mutant tumors. *PLoS One*, 12: e0185862.
- Migliardi G, Sassi F, Torti D, Galimi F, Zanella ER, Buscarino M, Ribero D, Muratore A, Massucco P, Pisacane A, Risio M, Capussotti L, Marsoni S, Di Nicolantonio F, Bardelli A, Comoglio PM, Trusolino L, Bertotti A. (2012) Inhibition of MEK and PI3K/mTOR suppresses tumor growth but does not cause tumor regression in patient-derived xenografts of RAS-mutant colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res*, 18: 2515-2525.
- Molnár E, Rittler D, Baranyi M, Grusch M, Berger W, Döme B, Tóvári J, Aigner C, Tímár J, Garay T, Hegedűs B. (2018) Pan-RAF and MEK vertical inhibition enhances therapeutic response in non-V600 BRAF mutant cells. *BMC Cancer*, 18: 542.
- Montero J, Dutta C, van Bodegom D, Weinstock D, Letai A. (2013) p53 regulates a non-apoptotic death induced by ROS. *Cell Death Differ*, 20: 1465-1474.
- Morris EJ, Jha S, Restaino CR, Dayananth P, Zhu H, Cooper A, Carr D, Deng Y, Jin W, Black S, Long B, Liu J, Dinunzio E, Windsor W, Zhang R, Zhao S, Angagaw MH, Pinheiro EM, Desai J, Xiao L, Shipps G, Hruza A, Wang J, Kelly J, Paliwal S, Gao X, Babu BS, Zhu L, Daublain P, Zhang L, Lutterbach BA, Pelletier MR, Philippar U, Siliphaivanh P, Witter D, Kirschmeier P, Bishop WR, Hicklin D, Gilliland DG, Jayaraman L, Zawel L, Fawell S, Samatar AA. (2013) Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer Discov*, 3: 742-750.
- Mueller BM, Romerdahl CA, Trent JM, Reisfeld RA. (1991) Suppression of spontaneous melanoma metastasis in scid mice with an antibody to the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res*, 51: 2193-2198.
- Murugan AK, Liu R, Xing M. (2019) Identification and characterization of two novel oncogenic mTOR mutations. *Oncogene*, 38: 5211-5226.
- Na J, Furue MK, Andrews PW. (2010) Inhibition of ERK1/2 prevents neural and mesendodermal differentiation and promotes human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cell Res*, 5: 157-169.
- Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, Mangood A, Russell RG, Ebetino FH. (2006) Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone*, 38: 617-627.

- Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, Chen Z, Lee MK, Attar N, Sazegar H, Chodon T, Nelson SF, McArthur G, Sosman JA, Ribas A, Lo RS. (2010) Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*, 468: 973-977.
- Niessner H, Sinnberg T, Kosnopfel C, Smalley KSM, Beck D, Praetorius C, Mai M, Beissert S, Kulms D, Schaller M, Garbe C, Flaherty KT, Westphal D, Wanke I, Meier F. (2017) BRAF Inhibitors Amplify the Proapoptotic Activity of MEK Inhibitors by Inducing ER Stress in NRAS-Mutant Melanoma. *Clin Cancer Res*, 23: 6203-6214.
- Nikolaou VA, Stratigos AJ, Flaherty KT, Tsao H. (2012) Melanoma: new insights and new therapies. *J Invest Dermatol*, 132: 854-863.
- Noeparast A, Teugels E, Giron P, Verschelden G, De Brakeleer S, Decoster L, De Grève J. (2017) Non-V600 BRAF mutations recurrently found in lung cancer predict sensitivity to the combination of Trametinib and Dabrafenib. *Oncotarget*, 8: 60094-60108.
- Nonaka D, Tang Y, Chiriboga L, Rivera M, Ghossein R. (2008) Diagnostic utility of thyroid transcription factors Pax8 and TTF-2 (FoxE1) in thyroid epithelial neoplasms. *Mod Pathol*, 21: 192-200.
- Nucera C, Nehs MA, Nagarkatti SS, Sadow PM, Mekel M, Fischer AH, Lin PS, Bollag GE, Lawler J, Hodin RA, Parangi S. (2011) Targeting BRAFV600E with PLX4720 displays potent antimigratory and anti-invasive activity in preclinical models of human thyroid cancer. *Oncologist*, 16: 296-309.
- Nucera C, Porrello A, Antonello ZA, Mekel M, Nehs MA, Giordano TJ, Gerald D, Benjamin LE, Priolo C, Puxeddu E, Finn S, Jarzab B, Hodin RA, Pontecorvi A, Nose V, Lawler J, Parangi S. (2010) B-Raf(V600E) and thrombospondin-1 promote thyroid cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 10649-10654.
- O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N. (2006) mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res*, 66: 1500-1508.
- Odogwu L, Mathieu L, Blumenthal G, Larkins E, Goldberg KB, Griffin N, Bijwaard K, Lee EY, Philip R, Jiang X, Rodriguez L, McKee AE, Keegan P, Pazdur R. (2018) FDA Approval Summary: Dabrafenib and Trametinib for the Treatment of Metastatic Non-

- Small Cell Lung Cancers Harboring BRAF V600E Mutations. *Oncologist*, 23: 740-745.
- Oishi N, Kondo T, Ebina A, Sato Y, Akaishi J, Hino R, Yamamoto N, Mochizuki K, Nakazawa T, Yokomichi H, Ito K, Ishikawa Y, Katoh R. (2017) Molecular alterations of coexisting thyroid papillary carcinoma and anaplastic carcinoma: identification of TERT mutation as an independent risk factor for transformation. *Mod Pathol*, 30: 1527-1537.
- Papa A, Pandolfi PP. (2019) The PTEN-PI3K Axis in Cancer. *Biomolecules*, 9: 153.
- Pavlick AC, Fecher L, Ascierto PA, Sullivan RJ. (2019) Frontline Therapy for BRAF-Mutated Metastatic Melanoma: How Do You Choose, and Is There One Correct Answer? *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 39: 564-571.
- Perera E, Gnaneswaran N, Jennens R, Sinclair R. (2014) Malignant Melanoma. *Healthcare (Basel)*, 2: 1-19.
- Pilli T, Prasad KV, Jayarama S, Pacini F, Prabhakar BS. (2009) Potential utility and limitations of thyroid cancer cell lines as models for studying thyroid cancer. *Thyroid*, 19: 1333-1342.
- Planchard D, Besse B, Groen HJM, Souquet PJ, Quoix E, Baik CS, Barlesi F, Kim TM, Mazieres J, Novello S, Rigas JR, Upalawanna A, D'Amelio AM, Jr., Zhang P, Mookerjee B, Johnson BE. (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. *Lancet Oncol*, 17: 984-993.
- Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P, Kallioniemi O, Hayward NK, Trent JM, Meltzer PS. (2003) High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet*, 33: 19-20.
- Prager GW, Koperek O, Mayerhoefer ME, Muellauer L, Wrba F, Niederle B, Zielinski CC, Raderer M. (2016) Sustained Response to Vemurafenib in a BRAF(V600E)-Mutated Anaplastic Thyroid Carcinoma Patient. *Thyroid*, 26: 1515-1516.
- Prahallad A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D, Beijersbergen RL, Bardelli A, Bernards R. (2012) Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature*, 483: 100-103.

- Puszkiel A, Noé G, Bellesoeur A, Kramkimel N, Paludetto MN, Thomas-Schoemann A, Vidal M, Goldwasser F, Chatelut E, Blanchet B. (2019) Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Dabrafenib. *Clin Pharmacokinet*, 58: 451-467.
- Qu Y, Wu X, Yin Y, Yang Y, Ma D, Li H. (2014) Antitumor activity of selective MEK1/2 inhibitor AZD6244 in combination with PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 in gefitinib-resistant NSCLC xenograft models. *Journal of experimental & clinical cancer research* : CR, 33: 52-52.
- Quilliam LA, Castro AF, Rogers-Graham KS, Martin CB, Der CJ, Bi C. (1999) M-Ras/R-Ras3, a transforming ras protein regulated by Sos1, GRF1, and p120 Ras GTPase-activating protein, interacts with the putative Ras effector AF6. *J Biol Chem*, 274: 23850-23857.
- Raaijmakers MI, Widmer DS, Narechania A, Eichhoff O, Freiburger SN, Wenzina J, Cheng PF, Mihic-Probst D, Desalle R, Dummer R, Levesque MP. (2016) Co-existence of BRAF and NRAS driver mutations in the same melanoma cells results in heterogeneity of targeted therapy resistance. *Oncotarget*, 7: 77163-77174.
- Ragazzi M, Ciarrocchi A, Sancisi V, Gandolfi G, Bisagni A, Piana S. (2014) Update on anaplastic thyroid carcinoma: morphological, molecular, and genetic features of the most aggressive thyroid cancer. *Int J Endocrinol*, 2014: 790834.
- Ragon BK, Odenike O, Baer MR, Stock W, Borthakur G, Patel K, Han L, Chen H, Ma H, Joseph L, Zhao Y, Baggerly K, Konopleva M, Jain N. (2019) Oral MEK 1/2 Inhibitor Trametinib in Combination With AKT Inhibitor GSK2141795 in Patients With Acute Myeloid Leukemia With RAS Mutations: A Phase II Study. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 19: 431-440.e413.
- Ramos JW. (2008) The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 40: 2707-2719.
- Rezaei Adariani S, Buchholzer M, Akbarzadeh M, Nakhaei-Rad S, Dvorsky R, Ahmadian MR. (2018) Structural snapshots of RAF kinase interactions. *Biochem Soc Trans*, 46: 1393-1406.
- Ribas A, Lawrence D, Atkinson V, Agarwal S, Miller WH, Jr., Carlino MS, Fisher R, Long GV, Hodi FS, Tsoi J, Grasso CS, Mookerjee B, Zhao Q, Ghorri R, Moreno BH, Ibrahim N, Hamid O. (2019) Combined BRAF and MEK inhibition with PD-1 blockade immunotherapy in BRAF-mutant melanoma. *Nat Med*, 25: 936-940.

- Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J. (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*, 370: 527-532.
- Roh MR, Eliades P, Gupta S, Tsao H. (2015) Genetics of melanocytic nevi. *Pigment Cell Melanoma Res*, 28: 661-672.
- Roskoski R, Jr. (2018) Targeting oncogenic Raf protein-serine/threonine kinases in human cancers. *Pharmacol Res*, 135: 239-258.
- Rosove MH, Peddi PF, Glaspy JA. (2013) BRAF V600E inhibition in anaplastic thyroid cancer. *N Engl J Med*, 368: 684-685.
- Rossi A, Roberto M, Panebianco M, Botticelli A, Mazzuca F, Marchetti P. (2019) Drug resistance of BRAF-mutant melanoma: Review of up-to-date mechanisms of action and promising targeted agents. *Eur J Pharmacol*, 862: 172621.
- Roux C, Dougados M. (1999) Treatment of patients with Paget's disease of bone. *Drugs*, 58: 823-830.
- Rushworth LK, Hindley AD, O'Neill E, Kolch W. (2006) Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Mol Cell Biol*, 26: 2262-2272.
- Ryu SH, Heo SH, Park EY, Choi KC, Ryu JW, Lee SH, Lee SW. (2017) Selumetinib Inhibits Melanoma Metastasis to Mouse Liver via Suppression of EMT-targeted Genes. *Anticancer Res*, 37: 607-614.
- Salazar R, Garcia-Carbonero R, Libutti SK, Hendifar AE, Custodio A, Guimbaud R, Lombard-Bohas C, Ricci S, Klümper H-J, Capdevila J, Reed N, Walenkamp A, Grande E, Safina S, Meyer T, Kong O, Salomon H, Tavorath R, Yao JC. (2018) Phase II Study of BEZ235 versus Everolimus in Patients with Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor-Naïve Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *The oncologist*, 23: 766-e790.
- Sambrook PN. (2002) Glucocorticoid osteoporosis. *Curr Pharm Des*, 8: 1877-1883.
- Sanchez JN, Wang T, Cohen MS. (2018) BRAF and MEK Inhibitors: Use and Resistance in BRAF-Mutated Cancers. *Drugs*, 78: 549-566.
- Santini D, Schiavon G, Angeletti S, Vincenzi B, Gasparro S, Grilli C, La Cesa A, Virzi V, Leoni V, Budillon A, Addeo SR, Caraglia M, Dicuonzo G, Tonini G. (2006) Last generation of amino-bisphosphonates (N-BPs) and cancer angio-genesis: a new role for these drugs? *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 1: 383-396.

- Satyamoorthy K, Li G, Gerrero MR, Brose MS, Volpe P, Weber BL, Van Belle P, Elder DE, Herlyn M. (2003) Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res*, 63: 756-759.
- Savoia P, Fava P, Casoni F, Cremona O. (2019) Targeting the ERK Signaling Pathway in Melanoma. *Int J Mol Sci*, 20: 1483.
- Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmüller L, Lautwein A, Schmitz F, Wittinghofer A. (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*, 277: 333-338.
- Schilrreff P, Cervini G, Romero EL, Morilla MJ. (2014) Enhanced antimelanoma activity of methotrexate and zoledronic acid within polymeric sandwiches. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 122: 19-29.
- Sereno M, Moreno V, Moreno Rubio J, Gomez-Raposo C, Garcia Sanchez S, Hernandez Jurdado R, Falagan S, Zambrana Tebar F, Casado Saenz E. (2015) A significant response to sorafenib in a woman with advanced lung adenocarcinoma and a BRAF non-V600 mutation. *Anticancer Drugs*, 26: 1004-1007.
- Serra V, Markman B, Scaltriti M, Eichhorn PJ, Valero V, Guzman M, Botero ML, Llonch E, Atzori F, Di Cosimo S, Maira M, Garcia-Echeverria C, Parra JL, Arribas J, Baselga J. (2008) NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Res*, 68: 8022-8030.
- Serra V, Scaltriti M, Prudkin L, Eichhorn PJ, Ibrahim YH, Chandarlapaty S, Markman B, Rodriguez O, Guzman M, Rodriguez S, Gili M, Russillo M, Parra JL, Singh S, Arribas J, Rosen N, Baselga J. (2011) PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer. *Oncogene*, 30: 2547-2557.
- Seto T, Hirai F, Saka H, Kogure Y, Yoh K, Niho S, Fukase K, Shimada H, Sasai M, Fukino K. (2018) Safety and tolerability of selumetinib as a monotherapy, or in combination with docetaxel as second-line therapy, in Japanese patients with advanced solid malignancies or non-small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 48: 31-42.
- Shahi Thakuri P, Tavana H. (2017) Single and Combination Drug Screening with Aqueous Biphasic Tumor Spheroids. *SLAS Discov*, 22: 507-515.

- She QB, Halilovic E, Ye Q, Zhen W, Shirasawa S, Sasazuki T, Solit DB, Rosen N. (2010) 4E-BP1 is a key effector of the oncogenic activation of the AKT and ERK signaling pathways that integrates their function in tumors. *Cancer Cell*, 18: 39-51.
- Shi H, Kong X, Ribas A, Lo RS. (2011) Combinatorial treatments that overcome PDGFR β -driven resistance of melanoma cells to V600EB-RAF inhibition. *Cancer Res*, 71: 5067-5074.
- Shirley M. (2018) Encorafenib and Binimetinib: First Global Approvals. *Drugs*, 78: 1277-1284.
- Shull AY, Latham-Schwark A, Ramasamy P, Leskoske K, Oroian D, Birtwistle MR, Buckhaults PJ. (2012) Novel somatic mutations to PI3K pathway genes in metastatic melanoma. *PLoS One*, 7: e43369.
- Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. (2017) RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*, 170: 17-33.
- Sinicrope FA, Shi Q, Smyrk TC, Thibodeau SN, Dienstmann R, Guinney J, Bot BM, Tejpar S, Delorenzi M, Goldberg RM, Mahoney M, Sargent DJ, Alberts SR. (2015) Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. *Gastroenterology*, 148: 88-99.
- Skolnik EY, Margolis B, Mohammadi M, Lowenstein E, Fischer R, Drepps A, Ullrich A, Schlessinger J. (1991) Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. *Cell*, 65: 83-90.
- Song H, Zhang J, Ning L, Zhang H, Chen D, Jiao X, Zhang K. (2018) The MEK1/2 Inhibitor AZD6244 Sensitizes BRAF-Mutant Thyroid Cancer to Vemurafenib. *Med Sci Monit*, 24: 3002-3010.
- Spano JP, Lagorce C, Atlan D, Milano G, Domont J, Benamouzig R, Attar A, Benichou J, Martin A, Morere JF, Raphael M, Penault-Llorca F, Breau JL, Fagard R, Khayat D, Wind P. (2005) Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol*, 16: 102-108.
- Staibano S, Pepe S, Soyer P, Argenziano G, Somma P, Mansueto G, Mascolo M, Bianco AR, Laus G, De Rosa G. (2004) Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in cutaneous melanoma: A possible role as prognostic marker. *Melanoma Res*, 14: S26.

- Steinmetz R, Wagoner HA, Zeng P, Hammond JR, Hannon TS, Meyers JL, Pescovitz OH. (2004) Mechanisms Regulating the Constitutive Activation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Signaling Pathway in Ovarian Cancer and the Effect of Ribonucleic Acid Interference for ERK1/2 on Cancer Cell Proliferation. *Mol Endocrinol*, 18: 2570-2582.
- Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M, Carey M, Hu Z, Guan Y, Sahin A, Symmans WF, Pusztai L, Nolden LK, Horlings H, Berns K, Hung MC, van de Vijver MJ, Valero V, Gray JW, Bernardis R, Mills GB, Hennessy BT. (2008) An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res*, 68: 6084-6091.
- Subbiah V, Kreitman RJ, Wainberg ZA, Cho JY, Schellens JHM, Soria JC, Wen PY, Zielinski C, Cabanillas ME, Urbanowitz G, Mookerjee B, Wang D, Rangwala F, Keam B. (2018) Dabrafenib and Trametinib Treatment in Patients With Locally Advanced or Metastatic BRAF V600-Mutant Anaplastic Thyroid Cancer. *J Clin Oncol*, 36: 7-13.
- Sullivan RJ, Hamid O, Gonzalez R, Infante JR, Patel MR, Hodi FS, Lewis KD, Tawbi HA, Hernandez G, Wongchenko MJ, Chang Y, Roberts L, Ballinger M, Yan Y, Cha E, Hwu P. (2019) Atezolizumab plus cobimetinib and vemurafenib in BRAF-mutated melanoma patients. *Nat Med*, 25: 929-935.
- Sullivan RJ, Infante JR, Janku F, Wong DJL, Sosman JA, Keedy V, Patel MR, Shapiro GI, Mier JW, Tolcher AW, Wang-Gillam A, Sznol M, Flaherty K, Buchbinder E, Carvajal RD, Varghese AM, Lacouture ME, Ribas A, Patel SP, DeCrescenzo GA, Emery CM, Groover AL, Saha S, Varterasian M, Welsch DJ, Hyman DM, Li BT. (2018) First-in-Class ERK1/2 Inhibitor Ulixertinib (BVD-523) in Patients with MAPK Mutant Advanced Solid Tumors: Results of a Phase I Dose-Escalation and Expansion Study. *Cancer Discov*, 8: 184-195.
- Sun Q, Burke JP, Phan J, Burns MC, Olejniczak ET, Waterson AG, Lee T, Rossanese OW, Fesik SW. (2012) Discovery of small molecules that bind to K-Ras and inhibit Sos-mediated activation. *Angew Chem Int Ed Engl*, 51: 6140-6143.
- Sweetlove M, Wrightson E, Kolekar S, Rewcastle GW, Baguley BC, Shepherd PR, Jamieson SM. (2015) Inhibitors of pan-PI3K Signaling Synergize with BRAF or MEK Inhibitors to Prevent BRAF-Mutant Melanoma Cell Growth. *Front Oncol*, 5: 135.

- Tabernero J, Geel RV, Guren TK, Yaeger RD, Spreafico A, Faris JE, Yoshino T, Yamada Y, Kim TW, Bendell JC, Schuler MH, Lenz H-J, Eskens F, Desai J, Hochster HS, Avsar E, Demuth T, Sandor V, Elez E, Schellens JHM. (2016) Phase 2 results: Encorafenib (ENCO) and cetuximab (CETUX) with or without alpelisib (ALP) in patients with advanced BRAF-mutant colorectal cancer (BRAFM CRC). *J Clin Oncol*, 34: 3544-3544.
- Thorpe LM, Spangle JM, Ohlson CE, Cheng H, Roberts TM, Cantley LC, Zhao JJ. (2017) PI3K-p110 α mediates the oncogenic activity induced by loss of the novel tumor suppressor PI3K-p85 α . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: 7095-7100.
- Thurnher M, Nussbaumer O, Gruenbacher G. (2012) Novel aspects of mevalonate pathway inhibitors as antitumor agents. *Clin Cancer Res*, 18: 3524-3531.
- Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. (2004) Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol*, 122: 337-341.
- Tsubaki M, Itoh T, Satou T, Imano M, Komai M, Ogawa N, Mukai J, Nishida S. (2013) Nitrogen-containing bisphosphonates induce apoptosis of hematopoietic tumor cells via inhibition of Ras signaling pathways and Bim-mediated activation of the intrinsic apoptotic pathway. *Biochem Pharmacol*, 85: 163-172.
- Turke AB, Song Y, Costa C, Cook R, Arteaga CL, Asara JM, Engelman JA. (2012) MEK inhibition leads to PI3K/AKT activation by relieving a negative feedback on ERBB receptors. *Cancer Res*, 72: 3228-3237.
- Turski ML, Vidwans SJ, Janku F, Garrido-Laguna I, Munoz J, Schwab R, Subbiah V, Rodon J, Kurzrock R. (2016) Genomically Driven Tumors and Actionability across Histologies: BRAF-Mutant Cancers as a Paradigm. *Mol Cancer Ther*, 15: 533-547.
- Unal EB, Uhlitz F, Bluthgen N. (2017) A compendium of ERK targets. *FEBS Lett*, 591: 2607-2615.
- Van Dort ME, Galbán S, Wang H, Sebolt-Leopold J, Whitehead C, Hong H, Rehemtulla A, Ross BD. (2015) Dual inhibition of allosteric mitogen-activated protein kinase (MEK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) oncogenic targets with a bifunctional inhibitor. *Bioorg Med Chem*, 23: 1386-1394.
- Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. (2010) The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11: 329-341.

- Vasudevan KM, Barbie DA, Davies MA, Rabinovsky R, McNear CJ, Kim JJ, Hennessey BT, Tseng H, Pochanard P, Kim SY, Dunn IF, Schinzel AC, Sandy P, Hoersch S, Sheng Q, Gupta PB, Boehm JS, Reiling JH, Silver S, Lu Y, Stemke-Hale K, Dutta B, Joy C, Sahin AA, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Rameh LE, Jacks T, Root DE, Lander ES, Mills GB, Hahn WC, Sellers WR, Garraway LA. (2009) AKT-independent signaling downstream of oncogenic PIK3CA mutations in human cancer. *Cancer Cell*, 16: 21-32.
- Vinagre J, Almeida A, Populo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, Coelho R, Celestino R, Prazeres H, Lima L, Melo M, da Rocha AG, Preto A, Castro P, Castro L, Pardal F, Lopes JM, Santos LL, Reis RM, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M, Lima J, Maximo V, Soares P. (2013) Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun*, 4: 2185.
- Wächter S, Wunderlich A, Roth S, Mintziras I, Maurer E, Hoffmann S, Verburg FA, Fellingner SA, Holzer K, Bartsch DK, Di Fazio P. (2018) Individualised Multimodal Treatment Strategies for Anaplastic and Poorly Differentiated Thyroid Cancer. *J Clin Med*, 7: 115.
- Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R. (2004) Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, 116: 855-867.
- Wang JR, Zafereo ME, Dadu R, Ferrarotto R, Busaidy NL, Lu C, Ahmed S, Gule-Monroe MK, Williams MD, Sturgis EM, Goepfert RP, Gross ND, Lai SY, Gunn GB, Phan J, Rosenthal DI, Fuller CD, Morrison WH, Iyer P, Cabanillas ME. (2019) Complete Surgical Resection Following Neoadjuvant Dabrafenib Plus Trametinib in BRAF(V600E)-Mutated Anaplastic Thyroid Carcinoma. *Thyroid*, 29: 1036-1043.
- Watson IR, Li L, Cabeceiras PK, Mahdavi M, Gutschner T, Genovese G, Wang G, Fang Z, Tepper JM, Stemke-Hale K, Tsai KY, Davies MA, Mills GB, Chin L. (2014) The RAC1 P29S hotspot mutation in melanoma confers resistance to pharmacological inhibition of RAF. *Cancer Res*, 74: 4845-4852.
- Webster MR, Kamat C, Connis N, Zhao M, Weeraratna AT, Rudek MA, Hann CL, Freil Meyers CL. (2014) Bisphosphonamidate clodronate prodrug exhibits selective cytotoxic activity against melanoma cell lines. *Mol Cancer Ther*, 13: 297-306.

- Weiss HM, Pfaar U, Schweitzer A, Wiegand H, Skerjanec A, Schran H. (2008) Biodistribution and plasma protein binding of zoledronic acid. *Drug Metab Dispos*, 36: 2043-2049.
- Whittaker SR, Cowley GS, Wagner S, Luo F, Root DE, Garraway LA. (2015) Combined Pan-RAF and MEK Inhibition Overcomes Multiple Resistance Mechanisms to Selective RAF Inhibitors. *Mol Cancer Ther*, 14: 2700-2711.
- Whyte DB, Kirschmeier P, Hockenberry TN, Nunez-Oliva I, James L, Catino JJ, Bishop WR, Pai JK. (1997) K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J Biol Chem*, 272: 14459-14464.
- Xia Y, Liu YL, Xie Y, Zhu W, Guerra F, Shen S, Yeddula N, Fischer W, Low W, Zhou X, Zhang Y, Oldfield E, Verma IM. (2014) A combination therapy for KRAS-driven lung adenocarcinomas using lipophilic bisphosphonates and rapamycin. *Sci Transl Med*, 6: 263ra161.
- Xing M. (2005) BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*, 12: 245-262.
- Yamagishi S-i, Abe R, Inagaki Y, Nakamura K, Sugawara H, Inokuma D, Nakamura H, Shimizu T, Takeuchi M, Yoshimura A, Bucala R, Shimizu H, Imaizumi T. (2004) Minodronate, a newly developed nitrogen-containing bisphosphonate, suppresses melanoma growth and improves survival in nude mice by blocking vascular endothelial growth factor signaling. *The American journal of pathology*, 165: 1865-1874.
- Yang X, Niu B, Wang L, Chen M, Kang X, Wang L, Ji Y, Zhong J. (2016) Autophagy inhibition enhances colorectal cancer apoptosis induced by dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235. *Oncol Lett*, 12: 102-106.
- Yap TA, Garrett MD, Walton MI, Raynaud F, de Bono JS, Workman P. (2008) Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Curr Opin Pharmacol*, 8: 393-412.
- Yeh I, von Deimling A, Bastian BC. (2013) Clonal BRAF mutations in melanocytic nevi and initiating role of BRAF in melanocytic neoplasia. *J Natl Cancer Inst*, 105: 917-919.
- Yeh TC, Marsh V, Bernat BA, Ballard J, Colwell H, Evans RJ, Parry J, Smith D, Brandhuber BJ, Gross S, Marlow A, Hurley B, Lyssikatos J, Lee PA, Winkler JD,

- Koch K, Wallace E. (2007) Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13: 1576-1583.
- Yi KH, Lauring J. (2016) Recurrent AKT mutations in human cancers: functional consequences and effects on drug sensitivity. *Oncotarget*, 7: 4241-4251.
- Yu JS, Cui W. (2016) Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development*, 143: 3050-3060.
- Yuan J, Ng WH, Tian Z, Yap J, Baccarini M, Chen Z, Hu J. (2018) Activating mutations in MEK1 enhance homodimerization and promote tumorigenesis. *Sci Signal*, 11: eaar6795.
- Yuen T, Stachnik A, Iqbal J, Sgobba M, Gupta Y, Lu P, Colaianni G, Ji Y, Zhu LL, Kim SM, Li J, Liu P, Izadmehr S, Sangodkar J, Bailey J, Latif Y, Mujtaba S, Epstein S, Davies TF, Bian Z, Zallone A, Aggarwal AK, Haider S, New MI, Sun L, Narla G, Zaidi M. (2014) Bisphosphonates inactivate human EGFRs to exert antitumor actions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 17989-17994.
- Zhang W, Liu HT. (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res*, 12: 9-18.
- Zhang Y, Cao R, Yin F, Hudock MP, Guo RT, Krysiak K, Mukherjee S, Gao YG, Robinson H, Song Y, No JH, Bergan K, Leon A, Cass L, Goddard A, Chang TK, Lin FY, Van Beek E, Papapoulos S, Wang AH, Kubo T, Ochi M, Mukkamala D, Oldfield E. (2009) Lipophilic bisphosphonates as dual farnesyl/geranylgeranyl diphosphate synthase inhibitors: an X-ray and NMR investigation. *J Am Chem Soc*, 131: 5153-5162.
- Zheng G, Tseng LH, Chen G, Haley L, Illei P, Gocke CD, Eshleman JR, Lin MT. (2015) Clinical detection and categorization of uncommon and concomitant mutations involving BRAF. *BMC Cancer*, 15: 779.
- Zimmermann S, Moelling K. (1999) Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science (New York, N.Y.)*, 286: 1741-1744.

Zuo Q, Liu J, Huang L, Qin Y, Hawley T, Seo C, Merlino G, Yu Y. (2018) AXL/AKT axis mediated-resistance to BRAF inhibitor depends on PTEN status in melanoma. *Oncogene*, 37: 3275-3289.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1 Disszertációhoz kapcsolódó publikációk listája

Rittler D, Baranyi M, Molnar E, Garay T, Jalsovszky I, Varga IK, Hegedus L, Aigner C, Tovari J, Timar J, Hegedus B. (2019) The Antitumor Effect of Lipophilic Bisphosphonate BPH1222 in Melanoma Models: The Role of the PI3K/Akt Pathway and the Small G Protein Rheb. *Int J Mol Sci*, 20: 4917.

Hegedűs L, **Rittler D**, Garay T, Stockhammer P, Kovács I, Döme B, Theurer S, Hager T, Herold T, Kalbourtzis S, Bankfalvi A, Schmid KW, Führer D, Aigner C, Hegedűs B. (2020) HDAC inhibition induces PD-L1 expression in a novel anaplastic thyroid cancer cell line. *Pathol Oncol Res*, DOI: 10.1007/s12253-020-00834-y.

10.2 Disszertációtól független publikációk listája

Molnár E, **Rittler D**, Baranyi M, Grusch M, Berger W, Döme B, Tóvári J, Aigner C, Tímár J, Garay T, Hegedűs B. (2018) Pan-RAF and MEK vertical inhibition enhances therapeutic response in non-V600 BRAF mutant cells. *BMC Cancer*, 18: 542.

Molnár E, Garay T, Donia M, Baranyi M, **Rittler D**, Berger W, Tímár J, Grusch M, Hegedűs B. (2019) Long-Term Vemurafenib Exposure Induced Alterations of Cell Phenotypes in Melanoma: Increased Cell Migration and Its Association with EGFR Expression. *Int J Mol Sci*, 20: 4484.

Baranyi M, Molnár E, **Rittler D**, Hegedűs B, Tímár J. (2019) [Impact of prenylation inhibition on RAS mutant tumors in preclinical studies]. *Magy Onkol*, 63: 320-329.

Baranyi M, **Rittler D**, Molnár E, Shirasawa S, Jalsovszky I, Varga IK, Hegedűs L, Németh A, Dank M, Aigner C, Tóvári J, Tímár J, Hegedűs B, Garay T. (2020) Next Generation Lipophilic Bisphosphonate Shows Antitumor Effect in Colorectal Cancer In Vitro and In Vivo. *Pathol Oncol Res*, 26: 1957–1969.

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom mindazoknak, akik munkám során támogatást és segítséget nyújtottak számomra. Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Hegedűs Baláznak, aki mindvégig mellettem állt és segítette szakmai és emberi fejlődésemet iránymutatásával, tanácsaival és bátorításával. Köszönettel tartozom munkatársaimnak, Dr. Molnár Eszternek és Baranyi Marcellnek, akik mindenkor támaszt nyújtottak nekem, segítették szemléletem formálódását szakmailag és emberileg egyaránt, és akiknek köszönhetően vidám, szeretetteljes környezetben dolgozhattam. Hálásan köszönöm Dr. Hegedűs Lucának a kísérletekben és a lektorálásban nyújtott segítségét. Külön köszönettel tartozom Prof. Dr. Tímár Józsefnek támogatásáért és a munkám megvalósításához szükséges háttér biztosításáért. Hálával tartozom azoknak a munkatársaimnak is, akiktől jó alapokat kaptam a tudományos életben való elinduláshoz, Dr. Szoboszlai Norbertnek, Dr. Garay Tamásnak, Dr. Bösze Szilviának és dr. Gaál Anikónak. Köszönöm a II. Sz. Patológiai Intézet vezetőségének és minden munkatársának, hogy biztosították számomra az intézetben való zavartalan munkavégzést. Továbbá köszönöm az intézetünkben dolgozó rezidenseknek, PhD hallgatóknak és kutatóknak, különösen dr. Bilecz Ágnesnek, Szekerczés Tímeának és Dr. Lendvai Gábornak biztatásukat és támogatásukat. Köszönet illeti a Doktori Titkárság minden munkatársát valamint Laczik Cecíliát, a doktori képzés során felmerülő problémák és adminisztratív terhek megoldásában nyújtott segítségükért. Köszönöm kollaborációs partnereinknek a közös munka lehetőségét. Hálás vagyok Dr. Enyedi Ágnesnek és munkacsoportja minden egykori és jelenlegi tagjának, köztük Szendefyné Lőr Krisztinának, akik támogatásukról biztosítottak mind szakmai mind pedig emberi téren. Köszönettel tartozom Dr. Michael Gruschnak és munkatársainak, akik lehetőséget biztosítottak nekem, hogy négy hónapig laboratóriumukban, a Bécsi Tudományegyetem Rákkutató Intézetében velük dolgozzak, új technikákat és gondolkodásmódod ismerjek meg. Köszönöm az Országos Onkológiai Intézetből Dr. Tóvári Józsefnek, Hídvégi Anitának és a laboratórium összes munkatársának, hogy lehetőséget és megfelelő szakmai háttérrel biztosítottak az állatkísérletek elvégzéséhez. Végül, de nem utolsó sorban, köszönettel tartozom barátaimnak és családtagjaimnak, akik megértő türelemmel és támogató szeretettel álltak mögöttem mindvégig.