

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

Doktori tézisek

**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

# 1. Bevezetés

A RAS/RAF és PI3K/Akt jelpálya szerepe a daganatok kialakulásában és fenntartásában kulcsfontosságú. A hatékony célzott terápiát nagy mértékben megnehezíti a két jelpálya közötti intenzív kommunikáció, valamint a jelpályákon együttesen jelen levő mutációk. Mindezek hozzájárulhatnak a monoterápiák hatástalanságához és így megnövelik a horizontális és vertikális kombinációs kezelések, valamint alternatív terápiák kutatásának jelentőségét. PhD munkám során a BRAF mutáns tumorok gátlását 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 pajzsmirigyrák sejtvonal RAS/RAF útvonalon ható 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 vetettem össze, figyelembe véve azok eltérő lipofilitásának tumorelleses hatékonyságra gyakorolt befolyását. Mindezen eredmények hozzájárulhatnak a RAS/RAF és PI3K/Akt jelpályán mutációt hordó daganatos betegek terápiájának fejlesztéséhez.

## 2. Célkitűzés

Munkám során a BRAF mutáns daganatok gátlási lehetőségeit vizsgálatom monoterápia és kombinációs terápia segítségével, valamint a PI3K/Akt jelpálya szerepét a terápiás válaszban. 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 terápiás előnyt jelent-e.

2. Egy újonnan alapított, BRAF mutáns anaplasztikus pajzsmirigyrák 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 jobb fizikai-kémiai tulajdonsági nagyobb tumor ellenes hatással járnak-e.

### 3. Módszerek

#### 3.1 Sejtvonalak

Mindösszesen 9 melanóma, 2 vastagbélrák, egy tüdő adenokarcinóma és egy anaplasztikus pajzsmirigyrák sejtvonallal dolgoztunk, melyek RAS/BRAF/PI3K/PTEN mutációt hordoznak vagy mindezekre vad típusúak.

#### 3.2 Kezelőanyagok

Munkánk során két preniláció gátló biszfoszfonát (zoledronsav, BPH1222), két BRAFV600 specifikus (vemurafenib, dabrafenib), egy pan-RAF gátló (sorafenib) hatóanyag, egy MEK1/2 gátló vegyület (selumetinib) és egy PI3K/mTOR kettős gátló anyag (BEZ235) tumorelles hatását tanulmányoztuk önállóan vagy kombinációban.

#### 3.3 Életképességi tesztek, kombinációs index (CI)

Rövid-, és hosszútávú életképességi tesztekkel vizsgáltuk vegyületeink toxicitását 2D modelleken. Rövidtávon (72h) szulforodamin B (SRB) festéket, hosszútávon (10 nap) kristályibolya festéket alkalmaztunk. A kötött festék beoldása után a mért optikai denzitásból (OD) határoztuk meg a kezelés utáni életképességet, IC<sub>50</sub> értéket illetve kolóniaképző képességet. Selumetinib+vemurafenib, valamint selumetinib+BEZ235 hatóanyag kombinációkat rövid-, és hosszútávú kezelések mellett

vizsgáltuk. Életképesség változást SRB festék alkalmazásával detektáltuk, a kombinációs indexeket a CompuSyn szoftver segítségével számítottuk.

### 3.4 Háromdimenziós szferoid vizsgálatok

Összesen nyolc sejtvonalat vontunk be 3D vizsgálatainkba, melyeknek egy része spontán képzett szferoidokat 4-7 nap alatt, a többi sejt szferoid képzését segédanyagok (Matrigel, kollagén) hozzáadásával segítettük elő. A kezelt szferoidokról a kísérlet során rendszeresen képet készítettünk, így a kezelés hatására bekövetkező térfogatváltozást határoztuk meg. Továbbá a kísérleteink egy részében CCK8 segítségével meghatároztunk a szferoidot alkotó sejtek életképességét a mérések végén.

### 3.5 Sejtmozgás vizsgálat

A biszfoszfonátok sejtek mozgására kifejtett hatását videomikroszkóp segítségével vizsgáltuk meg. A kezelést követő első 24 órában 10 percenként készültek fényképek a sejtekről, amiket azután egy sejtkövető program segítségével értékeltünk ki és így határoztuk meg a sejtek kezelés hatására megváltozó nettó elmozdulását.

### 3.6 Immunoblot vizsgálatok

Immunoblot módszer segítségével határoztuk meg sejtvonalaink PTEN, MET, EGFR, Akt, S6, valamint ERK fehérjékre vonatkozó alapaktivációs

szintjét. Továbbá vizsgáltuk a sejtekben kezelés hatására megváltozó Akt, S6, ERK, RHEB, PCNA expressziót és aktivációt, valamint a c-PARP szintet.

### 3.7 Sejtciklus vizsgálatok

A biszfoszfonátok hatását a sejtciklus változásra a sejtek DNS mennyisége alapján NucleoCounter NC-3000™ műszer segítségével határoztuk meg. A subG1, G0/G1, S és G2/M fázisba kerülő sejtek arányának eltolódását a kontrollhoz viszonyítottuk.

### 3.8 *In vivo* kísérletek

Állatkísérleteinket az Országos Onkológiai Intézet Kísérletes Farmakológia osztályán végeztük, követve az iránymutató szabályzatot. Sejtvonalainkat NOD-SCID és SCID egerekbe szubkután oltottuk be, majd a megfelelő hatóanyagokkal per os, illetve intraperitoneálisan kezeltük őket 17-23 napig. Kaliper segítségével meghatározott hosszúsági és szélességi paramétereiből számítottuk a tumortérfogat adatokat. A tumorok tömegét a terminálást követően mértük meg.

### 3.9 Statisztika

Statisztikai vizsgálatainkat minden esetben a GraphPad Prism 5 program segítségével végeztük el.

## 4. Eredmények

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

Rövidtávú (72h) SRB- és hosszútávú (10 nap) klonogenitási tesztet végeztünk a sejtvonalak hatóanyagokkal szembeni érzékenységének meghatározására. Eredményeink megmutatják, hogy a MEK inhibitor selumetinib nagyobb gátló hatást fejtett ki a csak BRAF mutációt hordozó sejteken, szemben a BRAF mellett PI3K/PTEN mutációt is hordozó vonalakkal rövid- és hosszútávon egyaránt. Ugyanakkor a BEZ235 kezelésre rövidtávon mutációs státusztól független választ figyeltünk meg, míg hosszútávú BEZ235 kezelésre nagyobb érzékenységet mutattak a kettős mutáns sejtvonalak a csak BRAF mutánsokhoz képest. Megvizsgáltuk továbbá a selumetinib és BEZ235 anyagok kombinációjának hatását hosszútávon (10 nap) 30 különböző koncentrációnál. Az eredmények megmutatták, hogy a legtöbb sejtre a két hatóanyag kombinációja additív hatást fejtett ki ( $CI \approx 1$ ). Kivételt képeztek a kettős mutáns WM239 és SW1417 sejtvonalak, melyek esetében számos kombinációs koncentrációnál szinergista hatás volt mérhető ( $CI < 1$ ). Megvizsgáltuk immunoblot segítségével az öt kettős mutáns sejt (SKMEL28, A2058, WM239, HT29, SW1417) egymáshoz viszonyított fehérje aktivációs szintjét EGFR, MET, Akt, Erk, és S6 fehérjékre vonatkoztatva. Az eredmények alapján az EGFR és MET expresszió a BRAF+PI3K mutáns vastagbélrák vonalokban volt magasabb, míg a p-

Erk és p-Akt szint a vizsgált vonalak közül a PTEN mutáns melanóma vonalakban volt magasabb. Ugyanakkor a p-S6 a HT29 kivételével hasonló mértékben volt jelen ezekben a sejtekben. Továbbá vizsgáltuk a kezelés hatását a jelátviteli fehérjékre (Erk, Akt, S6) A375, WM239, HT29 és SW1417 sejtvonalakon. Eredményeink azt mutatták, hogy a sejtekben 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 egyedül az SW1417 sejtvonaltban csökkent a kombinációs kezelés hatására. Továbbá, az A375 és a WM239 sejtvonalakban megjelent a hasított PARP, valamint lecsökkent a PCNA expresszió selumetinib és selumetinib+BEZ235 kezelés hatására. Szferoid térfogat változásra és életképességre vonatkozó adatok alapján elmondható, hogy a selumetinib és a selumetinib+BEZ235 kezelés minden sejtvonalnál szignifikáns gátlást mutatott, a kombinációs kezelés pedig csak az SW1417 sejtvonalt esetében volt szignifikánsan hatékonyabb, mint az egyszeres kezelések. Továbbá, az SW1417 sejtvonalt szubkután oltottuk NOD-SCID nőstény egerekbe xenograft létrehozása céljából. Eredményeink megmutatták, hogy mindkét hatóanyag szignifikáns gátló hatást fejtett ki a tumor térfogat növekedésre a kontroll csoporthoz képest. Ugyanakkor a legnagyobb mértékű gátlást a kombinációs terápia eredményezte, mely a kezelés kezdetétől fogva végig hatékonyabb volt bármely monoterápiánál.



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

A PF49 sejtvonalat egy 68 éves férfi betegből izoláltuk, akit kezdetben papilláris pajzsmirigyrákkal diagnosztizáltak és kezeltek, azonban nyolc hónappal később a visszatérő tumor mintáiból anaplasztikus dedifferenciációt mutattak ki (elveszett a sejtek TTF1 és tireoglobulin expresziója, megmaradt a CK18 és PAX8). Ezután a kemo-radioterápia ellenére a tumor nagyon gyorsan terjedt és metasztázisokat hozott létre a mellhártyán, a tüdőben és a csontokban. A mellkasi folyadékgyülemet katéter segítségével szívták le, melyből rosszindulatú daganatsejteket mutattak ki. Ebből a mintából lett alapítva a PF49 sejtvonala. A beteg végül 11 hónappal az első diagnózisa után hunyt el.

A PF49 sejtvonala mutációs státuszát újgenerációs szekvenálás (NGS) segítségével határoztuk meg. A sejtvonalaiban BRAF V600E és TERT promóter mutációt azonosítottunk, ami igen gyakori ebben a daganattípusban és az idős betegekénél. Érdekes, hogy az anaplasztikus pajzsmirigyrákra szintén jellemző RAS, TP53 vagy PI3K mutációk nem találhatók meg ebben a sejtvonalaiban.

*In vitro* kísérleteinkben, rövidtávú életképességi SRB teszt segítségével megvizsgáltuk a PF49 sejtvonala érzékenységét a RAF gátló sorafenib, a BRAF gátló dabrafenib és vemurafenib, valamint a MEK gátló selumetinib kezeléssel szemben. Kontrollként egy BRAF V600E mutáns melanóma sejtvonala (A375) használtunk. Eredményeink megmutatják,

hogy a gátlószerek képesek voltak csökkenteni a PF49 sejt életképességét, azonban csak kisebb mértékben, mint az A375 sejt vonalét. Megvizsgáltuk továbbá a MEK gátló selumetinib, és a BRAF gátló vemurafenib különböző koncentrációban alkalmazott kombinációjának a sejtek életképességére kifejtett hatását. A számított kombinációs index (CI) értékek alapján elmondható, hogy a legtöbb koncentrációban a két anyag erősen szinergista ( $CI < 1$ ) gátló hatást fejt ki a sejtek életképességére. Továbbá, a PF49 sejt vonal rendkívüli migrációs kapacitással bír, ezért megvizsgáltuk a gátlószerek sejtmozgásra kifejtett hatását. Eredményeink alapján mind a vemurafenib mind a selumetinib gátolja a migrációt, de a kombinációs kezelés a leghatékonyabb.

#### 4.3 A lipofil biszfoszfonát BPH tumorellenes hatása melanóma sejt vonalakon

Összehasonlítottuk a zoledronsav (ZA) és a BPH hatását a sejtek életképességére különböző koncentrációknál rövidtávon (72h), SRB teszt alkalmazásával, valamint hosszútávon (10 nap) klonogenitási teszt segítségével. Adataink szerint a legtöbb sejt vonal esetében rövid- és hosszútávon egyaránt a lipofil BPH volt hatékonyabb a hidrofil ZA-hoz képest. Érdekes, hogy az M24met sejt vonal esetén, a ZA nagyobb mértékben gátolta az életképességet és a kolóniaképzést is, mint a lipofil BPH. Megvizsgáltuk a hatóanyagok apoptózis indukáló hatását sejt ciklus elemzés és immunoblot segítségével. Legnagyobb arányban az M24met,

A375 és a VM47 vonalalnál észleltünk subG1 fázisban levő sejteket, ugyanakkor M24met esetében a ZA által indukált apoptózis mértéke magasabb volt a BPH-hoz képest. Immunoblot segítségével detektáltuk a kezelés hatására megjelenő hasított PARP fehérjét. Elmondható, hogy 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 mennyiségű c-PARP-t, mint a BPH kezelés. A RAS/RAF (Erk) és PI3K/Akt (Akt, S6, Rheb) jelpályák fehérjéinek aktivációs változását is vizsgáltuk kezelés hatására a sejtekben. Eredményeink megmutatták, hogy az Erk fehérje foszforilációja nem változik meg vagy megnő a kezelés hatására a legtöbb sejtben. Akt és S6 aktivációs szint az A375, VM47 és M24met sejtekben csökkent le, különösen BPH kezelés hatására. Továbbá A375, VM47 és WM35 sejtekben BPH kezelés hatására a prenilált Rheb szint csökkenését detektáltuk, míg M24met esetén ZA és BPH hatására is lecsökkent a Rheb fehérje teljes mennyisége. Videomikroszkóp segítségével meghatároztuk a sejtek átlagos elmozdulását és alap motilitásuk szerint a sejteket két csoportra osztottuk: gyors és lassú sejtek (határérték 50  $\mu$ m átlagos elmozdulás 18 óra alatt). A négy gyors sejt közül háromban mértünk jelentős mozgékonyág csökkenést BPH kezelés hatására (WM239, A2058, VM47). Ezzel szemben a ZA négyből három gyors sejtben növelte a migrációt. Emellett, a lassabb sejtekben nem változott meg szignifikánsan a sejtek mozgása egyik kezelés hatására sem. Szferoid

növekedési vizsgálatba 1-1 spontán szferoid képzésre alkalmas sejtvonalat vontunk be mutációs csoportonként (A375, A2058, M24met, VM47). 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 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. Ezért az M24met sejtvonalat vontuk be *in vivo* kísérletbe. A sejtet szubkután oltottunk nőstény SCID egerekbe, majd ZA és BPH anyagokkal kezeltük őket 23 napig. Eredményeink azt mutatták, hogy a BPH szignifikánsan nagyobb tumorelles hatást fejtett ki *in vivo* körülmények között a ZA-val szemben. A vizsgálat végén eltávolított tumorok tömegét tekintve a BPH-val kezelt csoportban adódott a legalacsonyabb érték a másik két csoporthoz képest.

## 5. Következtetések

1. A nyolc általunk vizsgált BRAF és BRAF+PI3K/PTEN mutáns sejtvonalak közül két kettős mutáns sejtvonalban mutatkozott szinergista gátló hatás a MEK és PI3K/mTOR szerek kombinálásával. A legérzékenyebb SW1417 sejtvonal 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. A BRAF V600E mutációt hordozó PF49 sejtvonal életképességét pan-RAF, BRAF és MEK gátló hatóanyagokkal is tudtuk gátolni. A BRAF+MEK kombinációs gátlás a legtöbb koncentráción erős szinergista hatást mutatott. Illetve elsőként mutattuk meg, hogy a BRAF+MEK kombinációs gátlás a rendkívüli migrációs kapacitással rendelkező anaplasztikus pajzsmirigy-rák PF49 sejtvonal esetén hatékonyabb, mint az egyszeres kezelések.

3. Munkacsoportunk igazolta először, 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 gátolni a tumornövekedést. Eredményeink alátámasztják előzetes feltételezésünket, miszerint a lipofilabb BPH hatékonyabb melanóma

sejtvonalakon, vélhetően jobb diffúziós tulajdonságai és biohasznosulása miatt.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

### 6.1 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.

Hegedús 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, Hegedús 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.

### 6.2 Disszertációtól független publikációk listája

Molnár E, **Rittler D**, Baranyi M, Grusch M, Berger W, Döme B, Tóvári J, Aigner C, Tímár J, Garay T, Hegedús 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.