

# Effects of prenylation inhibition on KRAS mutant tumors

Doktori tézisek

- Bizalmas –

**Baranyi Marcell**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Tímár József, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Kőhidai László, egyetemi docens  
Dr. Szász István, tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kárpáti Sarolta, egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Rajnai Hajnalka, egyetemi  
adjunktus  
Dr. Lövey József, egyetemi docens

Budapest  
2022

# 1. BEVEZETŐ

A *RAS* gének mutációi a tumoros elváltozások körülbelül 19%-ában megtalálhatóak, így a leggyakrabban mutációt elszenvedő onkogének közé tartoznak. A *RAS* fehérjecsalád többek között három kiemelt fontossággal bíró tagot foglal magába, ezek a *N*-, *H*- és *KRAS*. A *KRAS*-nak két izoformája ismert (*KRAS4A* és *KRAS4B*), amelyek csupán a hipervariábilis régiójukban (HVR) különböznek egymástól. A *RAS* fehérjék kis *G* fehérjék, amelyek az inaktív GDP-, valamint az aktív GTP-kötött állapot között ingáznak. Ez utóbbi folyamat a *RAS* fehérjék specifikus GAP és GEF szabályozó fehérjéinek regulációja alatt áll. A *RAS* gének mutációi elsősorban három kodont érintenek (G12, G13, Q61). Ezen mutációk következtében a fehérjék belső GTP-áz aktivitása csökken, illetve a GAP fehérjék nem képesek a fehérjékhez kötve serkenteni a GTP-GDP hidrolízist, így a *RAS* fehérjék konstitutívan aktív, GTP kötött állapotba kerülnek.

A *RAS* fehérjék számos kulcsfontosságú jelátviteli útvonal szabályozó faktoraként működnek, többek között a *RAF/MEK/ERK*, *PI3K/AKT/MTOR*, *PLC/PKC* és a *RAL* jelpályákban. Aktiváló mutációjuk ezen jelátviteliek fokozott működésén keresztül fontos szerepet tölt be a tumorprogresszióban. Számos tanulmány foglalkozik az *N*-, *H*-, *KRAS4A* és *KRAS4B* fehérjék közötti különbségekkel. Ezen különbségek közül kiemelendő az eltérő mutációs mintázatok jelenléte. Az aktiváló mutációkban leggyakrabban a *KRAS* gén érintett, ezt követi az *N*-, majd a *HRAS*. A

tüdő, kolorektális, valamint hasnyálmirigy adenokarcinómákban a *KRAS* hordoz leggyakrabban aktiváló mutációt (tüdő ~16%; kolorektális ~30-34%; hasnyálmirigy~66%). Fej-nyaki rákokban és hólyagrákban a *HRAS* érintett leggyakrabban (5 illetve 7%), míg az *NRAS* mutációi dominálnak a melanoma tumorokban (~18%).

A RAS fehérjék HVR régiója fontos szabályozó eleme a RAS - membrán interakcióknak. A preniláció – a C-terminális CAAX szekvencia által szabályozott poszttranszlációs módosítás – az egyik legfontosabb mechanizmus, amely lehetővé teszi a RAS fehérjék membránhoz horgonyzódását. Ennek során egy farnezil lipidhorgony kapcsolódik a prenilálódó fehérjékre. Kiemelendő, hogy a farneziláció gátlása esetén a *KRAS* és *NRAS* alternatív módon is képes prenilálódni, amely folyamat során egy geranil-geranil molekula kapcsolódik a C-terminális farkukra. Ugyanakkor a *HRAS* fehérje csak farnezilációra képes. A prenil horgony fehérjére kapcsolódása után az RCE1 enzim levágja az utolsó AAX szekvenciát, majd az ICMT fehérje metilálja az új C-terminális aminosavat (C185).

A *KRAS* egyike a legkorábban azonosított onkogéneknek, így számos módon próbálták gátolni az aktivitását. A *KRAS* aktiváló mutációját – tumorprogressziót segítő működése mellett - negatív prediktív faktorként azonosították többféle célzott terápiára, például az összes EGFR-t célzó kezelésre, valamint a bevacizumabra nézve, amely egy angiogenezist gátló anti-VEGF gyógyszer.

A különböző megközelítések, fejlesztések kudarcai nyomán azonban a KRAS kiérdemelte az „undruggable” elnevezést. A sikertelen próbálkozások fő oka a KRAS fehérje kompakt szerkezetében, a célozható „zsebek” hiányában, illetve a citoplazmában nagy mennyiségben jelen lévő GTP felé mutatott picomoláris affinitásában keresendő, amelyek mind ellehetetlenítették az allosztérikus vagy kompetitív inhibitorok kifejlesztését. Az egyik legnagyobb lépés a KRAS G12C allélspecifikus inhibitorok megjelenése volt. Ezek a gátlószerek specifikusan és kovalensen képesek a GDP-kötött KRAS G12C fehérjéhez kötni, rögzítve azt az inaktív konformációban. A Sotorasib (AMG510) egyike az elérhető leghatékonyabb inhibitoroknak, amely már elfogadásra került a KRAS G12C mutációt hordozó tüdő adenokarcinóma tumorok kezelésére. Sajnos, a célzott terápiáknál gyakran megjelenő *de novo* és kialakult rezisztencia miatt a betegek jelentős része nem tud profitálni a terápiából. Ennek kiküszöbölésére jelenleg számos kombinációs klinikai teszt indult, amelyek remélhetőleg elősegítik a KRAS G12C inhibitorok fokozott hatékonyságát, ugyanakkor továbbra is indokolt új kombinációs stratégiák kialakítása.

Ezen felül a más típusú KRAS mutációkat (G12D, G12V, G13D és Q61) hordozó tumorok számára továbbra sem érhető el célzott terápia, így ezek kezelésére továbbra is vizsgálják az indirekt gátlási lehetőségeket. A RAS membránasszociációja – amelyben a prenilációnak kulcsfontosságú szerepe van – kísérletes eredmények

alapján nélkülözhetetlen a fehérje fiziológiás működéséhez. A direkt gátlási lehetőségek hiányában az elmúlt évtizedekben számos kutatás vizsgálta a RAS lokalizációjának lehetséges gátlási módjait. Bár a preklinikai kísérletek során számos megközelítés ígéretesnek tűnt, egyik módszer sem bizonyult sikeresnek a klinikai tesztekben.

A szakirodalomban jól ismert a farnezil-transzferáz inhibitorok (FTi) sikeres fejlesztésének, majd a klinikai tesztekben történő bukásának története, amelynek háttérében a KRAS fehérjék alternatív geranil-geranilációja áll. Jelenleg az FTi-eket progéria kezelésére engedélyezték valamint klinikai vizsgálat alatt áll HRAS mutáns tumorok kezelésére. Ugyanakkor az FTi-ken kívül további két molekulacsoport is létezik, amely klinikai alkalmazásban van és képes a preniláció blokkolására. Mindkét vegyülettípus a mevalonát bioszintetikus útvonal gátlószere: a sztatinok és a nitrogén-tartalmú biszfoszfónátok (N-biszfoszfónát).

A klinikumban elérhető prenilációgátlók mutáns RAS függő hatásának vizsgálata rendkívül fontos, hogy teret nyithasson – akár csak kombinációs terápia keretében – a KRAS mutáns tumorok kezelésének bővüléséhez.

## **2. CÉLKITŰZÉSEK**

Jelen doktori munka célja a különböző preniláció gátló szerek tumorellenes hatásai és potenciális terápiás lehetőségei KRAS mutációt hordozó tumorokban.

Célkitűzéseink ez alapján a következők voltak:

- 1) Összehasonlítani egy újonnan kifejlesztett lipofil biszfoszfonát molekulát a klinikumban is használt zoledronsavval különböző kolorektális *in vitro* és *in vivo* modelleken.
- 2) Megvizsgálni a biszfoszfonátok mutáns *KRAS* függő hatásait.
- 3) Összevetni a különböző preniláció gátló vegyületcsoportok tumorellenes hatásait különböző eredetű human tumorsejtvonalakon a *KRAS* mutáns státusz függvényében.
- 4) Megvizsgálni a preniláció gátló szerek *KRAS* G12C inhibitorokkal való kombinációs alkalmazhatóságát.

### 3. MÓDSZEREK

#### 3.1. „*In silico*” vizsgálatok

A vizsgálatokhoz felhasznált életképességi adatok a szabadon elérhető [www.depmap.org](http://www.depmap.org) honlapról kerültek beszerzésre a Repurposing Primary Screen adatbázisából. Az adatokat a három preniláció gátló vegyülettípus (sztatin, N-biszfoszfonát, FTi) összes elérhető molekulájára beszereztük, majd csoportosítva összehasonlítottuk a *RAS* mutáns státusz alapján a <https://depmap.org/portal/interactive/> eszköz segítségével.

#### 3.2 Sejtvonalak és anyagok

A kísérletek során hét kolorektális és négy tüdő adenokarcinóma sejtvonalat, illetve a *KRAS* mutáns (*KRAS* WT/G13D) DLD1 és

HCT116 kolorektális sejtvonalak knockout izogenikus változatait (KRAS WT/-) vizsgáltuk.

- 1. táblázat** Az *in vitro* és *in vivo* kísérletek során felhasznált és vizsgált inhibitorok listája.

| NÉV         | Molekulatípus       |
|-------------|---------------------|
| Zoledronsav | N-biszfoszfónát     |
| BPH1222     | N-biszfoszfónát     |
| Simvastatin | sztatin             |
| Lonafarnib  | FTi                 |
| Tipifarnib  | FTi                 |
| ARS1620     | KRAS G12C inhibitor |
| AMG510      | KRAS G12C inhibitor |

### 3.3 Klonogén tesztek

A zoledronsav (ZA) és BPH1222 (BPH) N-biszfoszfónátok hosszú távú hatásait a sejtek klonális növekedésére klonogén tesztekkel vizsgáltuk. A letapadó sejtkultúrákat 8 napos kezelés után fixáltuk, majd kristályibolyával festettük. A sejtekhez kötődött festék optikai denzitását 2% SDS-ben oldva 570 nm-en microplate olvasó segítségével határoztuk meg.

### 3.4 2D kombinációs tesztek

A farnezil-transzferáz és KRAS G12C inhibitorok kombinációs alkalmazását SRB teszt segítségével vizsgáltuk. Az inhibitorok különböző koncentrációival és kombinációival történő 6 napos kezelést követően a sejteket fixáltuk és SRB festékkel festettük. A

sejtekhez kötött festéket beoldást követően 570 nm-en mértük le microplate olvasó segítségével. A kombinációs hatásokat a Kombinációs Index elmélet alapján vizsgáltuk és a Compusyn szoftver segítségével állapítottuk meg.

### **3.5 3D szferoid klonogén tesztek**

A szferoidokat 12 napon keresztül kezeltük ZA és BPH különböző koncentrációival 96 lyukú letapadást gátló sejttenyésztő edényeken. A szferoidokról háromnaponta fényképet készítettünk a kezelés hatásainak megállapításához.

### **3.6 3D szferoid kombinációs tesztek**

A szferoidokat polyHEMA-val kezelt 96 lyukú U aljú sejttenyésztő edényeken hoztuk létre, és kezeltük 6 napon keresztül az inhibitorok (Tipifarnib, Sotorasib) különböző koncentrációival, illetve ezek kombinációival. Minden szferoidról fénykép készült a kezelés első és hatodik napján.

### **3.7 3D szferoid fénykép analízis**

A szferoidokról készült fényképeket az ImageJ szoftver segítségével, egy erre a célra kialakított script segítségével analizáltuk. A script a szferoidok 2D projekciójának területét méri. Az eredményeket manuálisan ellenőriztük, majd a terület értékekből kiszámoltuk a sugarat és a szferoidok térfogatát a  $V = \frac{4}{3} \times \pi \times \text{sugár}^3$  képlet felhasználásával.

### **3.8 Sejtciklus kísérletek**

Tipifarnib, Sotorasib, illetve a kettő kombinációjával történő kezeléseket követően a sejtek DNS tartalma alapján a NucleoCounter NC-3000™ rendszer segítségével határoztuk meg a sejtek eloszlását a különböző sejtciklus fázisokban.

### **3.9 Western blot vizsgálatok**

Az ERK1/2, S6, AKT fehérjék aktivációját, illetve a KRAS4B, RHEB, PARP és PCNA fehérjék változásait western blot analízissel vizsgáltuk a különböző hatóanyagokkal történő 48 órás kezelést követően.

### **3.10 Videomikroszkópos vizsgálatok**

Az SW1573 sejtvonal 72 órás kezelése során fázis-kontraszt képeket készítettünk a sejtekről ZenCellOwl inkubátor mikroszkóp segítségével. A képeket videókká alakítva azokat az ImageJ Fiji szoftver segítségével analizáltuk, a sejtek mitotikus aktivitását manuálisan meghatározva.

### **3.11 Állatkísérletek**

Az állatkísérletekhez SCID egereket használtunk fel. A biszfoszfonátokkal történő vizsgálatokhoz az SW1417 és HCT116 sejtvonalak szubkután xenograft modelljeit alkalmaztuk. Az állatokat hetente kétszer kezeltük intraperitoneálisan 1.47  $\mu\text{mol/kg}$  ZA és BPH

anyagokkal steril DPBS-ben oldva. A kombinációs kísérletek során a H358 és SW1573 tüdő adenokarcinóma sejtvonalak szubkután xenograft modelljeit vizsgáltuk. Az állatokat naponta (hétvége kivételével) kezeltük intraperitoneálisan. A H358 xenograftok 5 mg/kg AMG510; 40 mg/kg Tipifarnib dózisokkal, míg az SW1573 xenograftok 25 mg/kg AMG510; 40 mg/kg Tipifarnib dózisokkal voltak kezelve. A tumorok növekedését folyamatosan monitoroztuk, heti két kaliperes mérés segítségével. A tumorok térfogatát a forgáselipszoid képletével határoztuk meg ( $V = \frac{4}{3}\pi \times (\text{hossz} \times \text{szélesség}^2)$ ) és mm<sup>3</sup>-ben fejeztük ki. A kísérletek leállítását követően a tumorok súlyát is megmértük.

### **3.12 Statisztika**

Minden statisztikai analízist a GraphPad Prism 5 szoftver segítségével végeztünk.

## **4. EREDMÉNYEK**

### **4.1 A biszfoszfonát kezelés hosszú távú hatásai a sejtek 2D klonogén növekedésére**

A biszfoszfonátok hatásában nem tudtunk különbséget megállapítani a főbb onkogén mutációk szerint csoportosítva a sejtvonalakat. Statisztikailag szignifikáns különbség egyedül a HCA7 sejtvonal esetén volt megállapítható, ahol 1 és 2 µM koncentrációnál a ZA hatékonyabban fejtett ki tumorelles hatást a BPH-hoz viszonyítva,

míg az SW480 sejtek esetén a BPH1222 volt szignifikánsan hatékonyabb 1  $\mu$ M koncentrációnál.

## **4.2 A biszfoszfonát kezelés hatásai a sejtciklus eloszlásra kolorektális tumorvonalak 2D tenyészetein**

Mindkét biszfoszfonát hatóanyag megnövelte az S-fázisú, illetve a szub-G1 fázisú (apoptotikus) sejtek arányát a *KRAS* és *BRAF* vad típusú CACO2 és a *BRAF* V600E mutáns WIDR sejtek esetén. Jelentősen csökkent ezen kívül a G0/G1 fázisú sejtek aránya. Megjegyzendő, hogy a BPH1222 kezelés esetén ezen hatások erőteljesebben érvényesültek. A *KRAS* mutációt hordozó HCT116 sejtvonal biszfoszfonát kezelése csekély hatással volt a sejtciklus eloszlásra, egyedül a szub-G1 fázisú sejtek számában figyelhettünk meg egy kis mértékű – bár szignifikáns – változást a BPH1222 kezelés esetén. A ZA kezelés okozta változások nem bizonyultak szignifikánsnak egyik vizsgált sejtvonal esetében sem.

## **4.3 A biszfoszfonát kezelés hatásai a KRAS által szabályozott jelpályákra, illetve az apoptózis indukcióra**

A biszfoszfonát kezelés jelentősen megnövelte az ERK1/2 aktivációs szintjét mindhárom *KRAS* mutációt hordozó kolorektális sejtvonalban, illetve a *BRAF* V600E mutáns SW1417 sejtvonalban. A másik *BRAF* V600E mutáns WIDR, illetve a *BRAF/KRAS* vad típusú CACO2 és HCA7 sejtvonalak esetén nem emelkedett az ERK1/2 aktivációja a kezelés hatására. Az S6 aktivációt jelző p-S6 szint jelentős csökkenést

mutatott a kezelések hatására az összes sejtvonalnál az SW1417 sejtvonalat kivéve, ahol még egy csekély növekedés is jelentkezett. A sejtciklushoz hasonlóan a BPH kezelés hatására a megfigyelhető változások erőteljesebbek voltak a ZA-hoz viszonyítva. Ezen felül mindkét biszfoszfonát anyag apoptózist indukált a hasított PARP jelenléte alapján a CACO2, HCA7 és HCT116 sejtvonalak esetén.

#### **4.4 A biszfoszfonát kezelés hatásai a szferoid növekedésre**

A hét kolorektális tumorsejtvonalból négy volt alkalmas szferoid vizsgálatokra: a KRAS G13D mutáns DLD1 és HCT116, illetve két BRAF V600E mutáns sejtvonal (SW1417 és WIDR). A lipofil BPH hatékonyabban gátolta a szferoidok növekedését a ZA-hoz viszonyítva mind a négy vizsgált sejtvonalban. A biszfoszfonát kezelés gátló hatása ugyanakkor nem függött *KRAS/BRAF* mutáns státusztól.

#### **4.5 A biszfoszfonát kezelés *in vivo* hatásai**

Mindkét biszfoszfonát kezelés képes volt lassítani a HCT116 (*KRAS G13D*) xenograft tumorok növekedését, ugyanakkor egyedül a BPH1222 kezelés eredményezett szignifikáns különbséget a kontrollhoz viszonyítva. Ezzel szemben az SW1417 (*BRAF V600E*) xenograft tumorok rezisztensnek bizonyultak a biszfoszfonát kezelésre nézve, egyik hatóanyag sem volt képes gátolni a tumorok növekedését.

## 4.6 A biszfoszfonát kezelés hatásai a *KRAS* mutáns allél jelenlétének függvényében

A DLD1 (*KRAS* G13D/WT) izogén knockout változata, a DKO4 sejtvonal (*KRAS* - /WT) a *KRAS* mutáns allél eltávolításának következtében érzékenyebb lett a BPH1222 kezelésre. Ezzel szemben a HCT116 (*KRAS* G13D/WT) izogén klónja, a HKH2 (*KRAS* - /WT) rezisztensebbé vált a BPH kezelésre az eredeti sejtvonalhoz képest. Nem jelentkezett különbség a ZA kezelésre adott válasz között az eredeti és knockout sejtvonalak között. Ugyanakkor a western blot vizsgálatok alapján a biszfoszfonát kezelés által indukált fokozott ERK1/2 aktiváció nem jelentkezett a knockout sejtvonalak esetén (DKO4 és HKH2). További különbségként mutatkozott a HCT116 és HKH2 sejtvonalak között, hogy a kezelés az eredeti sejtvonalban (*KRAS* G13D/WT) apoptózist indukált a hasított PARP jelenléte alapján, a knockout sejtvonalban (*KRAS* - /WT) ezzel szemben nem detektáltunk hasított PARP-ot.

## 4.7 „*In silico*” eredmények

A *KRAS* mutáns és vad típusú tüdő és kolorektális adenokarcinóma sejtvonalak összehasonlítása során tumoreredettől függő mintázatokat figyelhettünk meg a sztatín, N-biszfoszfonát és farnezil-transzferáz inhibitorok érzékenységi adatai között. Ugyanakkor a különbségek egyedül a tüdő adenokarcinóma sejtvonalak esetén bizonyultak szignifikánsnak, ahol a farnezil-transzferáz inhibitorok

hatékonyabban csökkentette a KRAS mutációt hordozó sejtek életképességét.

## **4.8 2D kombinációs tesztek**

A Tipifarnib dózisfüggő módon, hatékonyan gátolta mind a négy KRAS G12C mutációt hordozó tüdő adenokarcinóma sejt növekedését. A Tipifarnibra mutatott érzékenység hasonló volt a sejtvonalak között, egyedül a H1792 sejtvonal bizonyult jelentősen érzékenyebbnek. Az AMG510 kezelés a H358 sejtvonal növekedését tudta leghatékonyabban gátolni, a H1792 és PF139 sejtvonal közepes érzékenységet mutatott, míg az SW1573 sejtvonal rezisztens volt 2D körülmények között. Az összes sejtvonal *kombinációs index* értéke jelentősen kisebb volt 1-nél, amely a kombináció esetén erős szinergizmust jelez. A robosztus szinergista hatás kimutatható volt akkor is, ha más típusú FTi-t (lonafarnib) vagy KRAS G12C inhibitor (ARS1620) alkalmaztunk.

## **4.9 3D szferoid kombinációs tesztek**

A kezelőanyagokra (Tipifarnib, AMG510) mutatott érzékenység hasonló volt a 2D eredményeknél tapasztalt értékekhez, egyedül az SW1573 mutatott nagyobb érzékenységet az AMG510 kezelésre nézve. A *kombinációs index* értékek 3D körülmények között is erőteljes szinergizmust jeleztek az összes sejtvonal esetén.

## **4.10 *In vivo* eredmények az FTi és KRAS G12C inhibitorok kombinációs kezelésével**

A Tipifarnib monokezelés egyedül az SW1573 tumorokon fejtett ki erőteljes tumorellenes hatást, míg az AMG510 képes volt gátolni mind a két sejtvonal xenograft tumorjainak növekedését, amely az SW1573 modell esetén szignifikáns különbségnek bizonyult. Mindkét modellrendszerben a kombinációs kezelés mutatkozott leghatékonyabbnak a tumorok növekedésének gátlásában a relatív tumor értékek valamint a tumor tömeg értékei alapján. A H358 modellben egyedül a kombinációs kezelés volt képes szignifikánsan gátolni a tumorok növekedését, mind a kontrollhoz, mind a Tipifarnib kezeléshez viszonyítva. A kezelések toxicitásának monitorozása érdekében a kísérlet során a tumorméretekkal párhuzamosan mértük az egerek súlyát is, amely nem mutatott eltérést a kezelési csoportok között.

#### **4.11 MAPK és PI3K/AKT jelpályák változásainak vizsgálata**

A kezelések hatására jelentős változásokat tapasztaltunk mind a két jelátviteli útvonalban, ugyanakkor ezek a változások sejtvonalanként eltérő módon jelentkeztek. A legerőteljesebb hatás a H358 vonalban jelentkezett, ahol az ERK1/2, AKT és S6 aktivációs szintje jelentősen lecsökkent az AMG510 és kombinációs kezelés következtében. A p-ERK1/2 szint szintén csökkent az AMG510, illetve a kombinációs kezelés következtében az SW1573 és PF139 sejtek esetén. A H1792 sejtvonalban a Tipifarnib valamint a kombinációs kezelés csökkentette a p-S6 szintet, ugyanakkor megemelte az ERK1/2 aktivációs szintjét.

Minden kezeléstípus csökkentette az S6 fehérje aktivációs szintjét a H1792 és H358 sejtvonalakban. A monokezelések nem, csupán a kombinációs kezelés volt képes csökkenteni a p-S6 szintet a két AMG510 rezisztens sejtvonalban (PF139, SW1573). A farnezilálódó RHEB fehérje elektroforetikus mobilitásában bekövetkező változás az összes sejtvonal esetén jelentkezett a Tipifarnib, illetve a kombinációs kezelés következtében. A jelenség jelzi a sikeres farneziláció gátlást. A KRAS4B fehérje szintjében nem tapasztaltunk jelentős és konzisztens változást a sejtvonalak között.

#### **4.12 Sejtciklus eloszlás és apoptózis változásai az FTi és KRAS G12C inhibitorok kombinációs kezelése nyomán**

A G0/G1 fázisú sejtek aránya emelkedett az AMG510 kezelés hatására a H358 sejtvonalnál 48 órás kezelést követően. A másik három vizsgált sejtvonalban (H1792, SW1573, PF139) a sejtciklus fázisainak eloszlása nem változott jelentősen még 96 órás kezelést követően sem. A Tipifarnib valamint a kombinációs kezelés enyhén megemelte a G2/M fázisú sejtek arányát mindegyik sejtvonalban. Erőteljes emelkedést tapasztaltunk a szub-G1 fázisú sejtek arányában a H358 és H1792 sejtvonalak esetén az AMG510 és kombinációs kezelés következtében, míg a Tipifarnib valamint a kombinációs kezelés enyhén emelte a szub-G1 fázis szintjét az SW1573 sejtvonalban. A hasított PARP jelenléte alapján az AMG510 és a kombinációs kezelés képes volt apoptózist indukálni a H358 és H1792

sejtvonalaknál. Az SW1573 sejtvonalnál a Tipifarnib, valamint a kombinációs kezelés következményeként jelent meg hasított PARP. A kombinációs kezelés az SW1573 sejtvonal kivételével mindegyik sejtvonalban lecsökkentette a PCNA fehérje (proliferációs marker) szintjét. További, videomikroszkópos vizsgálatok során meghatározásra került a kezelések hatása az SW1573 mitózisainak számára. 24 órás kezelés után a kombinációs kezelés drasztikusan csökkentette az osztódások számát mind a kontrollhoz, mind a monokezelésekhez viszonyítva.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK

Jelen doktori munka célja a klinikai használatban lévő prenilációgátlók szerek tumorellenes szerként történő alkalmazhatóságának vizsgálata volt, különös hangsúllyal a mutáns KRAS-sal való lehetséges kapcsolatra. A következtetések a Célkitűzésekkel együtt kerülnek a következőkben bemutatásra.

*Összehasonlítani egy újonnan kifejlesztett lipofil biszfoszfónát molekulát a klinikumban is használt zoledronsavval különböző kolorektális in vitro és in vivo modelleken.*

Kolorektális tumorsejtvonalaink preklinikai modelljeinek vizsgálata során a lipofil BPH1222 erősebb tumorellenes hatást fejtett ki a klinikai alkalmazásban lévő zoledronsavhoz képest 3D és in vivo kísérleteink során. Kiemelendő, hogy a hagyományos N-

biszfoszfonátokkal ellentétben a lipofil N-biszfoszfonátok alkalmasak lehetnek nem csonthoz kötődő tumorok kezelésére is.

*Megvizsgálni a biszfoszfonátok mutáns KRAS függő hatásait. Összevetni a különböző preniláció gátló vegyületcsoportok tumorelles hatásait különböző eredetű humán tumorsejtvonalakon a KRAS mutáns státusz függvényében.*

Az izogenikus, KRAS knockout kolorektális eredetű sejtvonalaink vizsgálata alapján az N-biszfoszfonátok hatása részben a KRAS mutáns allél jelenlététől függ. Ezen felül az „*in silico*” vizsgálatokból származó alapján a KRAS mutációs státusz, illetve a tumoreredet befolyásolta a különböző preniláció gátló szerekre való érzékenységet (sztatin, N-biszfoszfonát, FTi). A KRAS mutáns tüdő adenokarcinóma sejtvonalak érzékenyebbek voltak a farnezil-transzferáz inhibitorokra a vad típusú sejtvonalakhoz képest. Összességében az eredményeink alapján a preniláció gátlása jelentős tumorelles hatást képes kifejteni KRAS mutációt hordozó sejtvonalakon is, valamint képes a KRAS biológiai funkciójában is változásokat okozni. Ezek a hatások azonban nagy valószínűséggel indirekt módon működnek és nem érintik közvetlenül a KRAS fehérjét.

*Megvizsgálni a preniláció gátló szereket KRAS G12C inhibitorokkal való kombinációs alkalmazhatóságát.*

Eredményeink alapján az egyik újonnan kifejlesztett, potens KRAS G12C inhibitor (AMG510) a farnezil-transzferáz inhibitor

Tipifarnibbal kombinációban jelentős szinergizmust mutatott a KRAS G12C mutációt hordozó tüdő adenokarcinóma sejtvonalak mindegyikén *in vitro* 2D és 3D rendszereken, valamint *in vivo* is. Megjegyzendő, hogy a farnezil-transzferáz inhibitorok (Tipifarnib, lonafarnib) a klinikai tesztek alapján tolerálható, ismert biztonsági profillal rendelkezik. Az FTi és KRAS G12C allél-specifikus inhibitorok kombinációjának szinergista tumorelles hatásainak így jelentős klinikai relevanciája lehet.

## 6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### 6.1 Disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

**M. Baranyi**, L. Buday, and B. Hegedűs, KRas prenylation as a potential anticancer target. Cancer and Metastasis Reviews, 2020. 39: p. 1127–1141.**IF:9,264, Q1**

**M. Baranyi**, D. Rittler, E. Molnár, S. Shirasawa, I. Jalsovszky, I. K. Varga, L. Hegedűs, A. Németh, M. Dank, C. Aigner, J. Tóvári, J. Tímár, B. Hegedűs, T. Garay, Next Generation Lipophilic Bisphosphonate Shows Antitumor Effect in Colorectal Cancer In Vitro and In Vivo. Pathol Oncol Res, 2020. 26(3): p. 1957-1969. **IF: 3,201, Q2**

**Patent:** Combination therapy to treat G12C KRAS mutant cancers; **PATENT NUMBER: 133077**; Inventors: J. Tímár; B. Hegedűs; M.Baranyi; E. Molnár; J. Tóvári; I. Randelovic

**M. Baranyi;** E.Molnar; D. Rittler;; B.Hegedus; J. Timar;  
Prenilációgátlás hatása RAS-mutáns daganatokra kísérleti  
rendszerekben [Impact of prenylation inhibition on RAS mutant  
tumors in preclinical studies]; *MAGYAR ONKOLÓGIA* 63 : 4 pp.  
320-329. , 10 p. (2019) **IF:0**

## **6.2 Disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk:**

Hegedüs, L. ; Okumus, Ö. ; Livingstone, E. ; **Baranyi, M.** ;  
Kovács, I. ; Döme, B. ; Tóvári, J. ; Bánkfalvi, Á. ; Schadendorf, D. ;  
Aigner, C. et al; Allosteric and ATP-competitive MEK-inhibition in a  
novel spitzoid melanoma model with a raf-and phosphorylation-  
independent mutation; *Cancers* 13 : 4 Paper: 829 , 12 p. (2021) **IF:**

**6.639**

D. Rittler; E.Molnar;; **M. Baranyi**;; T.Garay; L. Hegedus; C.  
Aigner;; J. Tovari;; J. Timar;; B.Hegedus; Horizontal Combination  
of MEK and PI3K/mTOR Inhibition in BRAF Mutant Tumor Cells  
with or without Concomitant PI3K Pathway Mutations;  
*International Journal of Molecular Sciences* 21 : 20 Paper: 7649 , 18  
p. (2020) **IF: 5.924**

E.Molnar; T.Garay; M. Donia; **M. Baranyi**; D. Rittler; W.  
Berger; J. Timar; M. Grusch; B.Hegedus;; Long-Term Vemurafenib  
Exposure Induced Alterations of Cell Phenotypes in Melanoma:  
Increased Cell Migration and Its Association with EGFR  
Expression; *International Journal of Molecular Sciences* 20 : 18  
Paper: 4484 , 13 p. (2019) **IF: 5.924**

K. Nyíri; G.Koppány; Gy. Pálffy; I. Vida; Sz. Tóth; Z. Orgován; I. Randelović; **M. Baranyi**; E.Molnar; Gy. M. Keserű, et al. Allélspecifikus inhibitorok nyomában: a RASopátia konzorcium célpontjában a KRAS fehérje onkogén mutációi [Allele-specific inhibitors of mutant kras are in the focus of rasopathy consortium]; *Magyar Onkológia* 63 : 4 pp. 310-323., 10 p. (2019) **IF: 0**

D. Rittler; E.Molnar,; **M. Baranyi**; E.Molnar; T.Garay; I. Jalsovszky, I. K. Varga ; L. Hegedus; C. Aigner,; J. Tovari,; J. Timar,et al.The Antitumor Effect of Lipophilic Bisphosphonate BPH1222 in Melanoma Models: The Role of the PI3K/AKT Pathway and the Small G Protein RHEB; *International Journal of Molecular Sciences* 20 : 19 p. 4917 , 15 p. (2019) **IF: 5.924**

E.Molnar; D. Rittler; **M. Baranyi**; M. Grusch; W.Berger,; B.Dome; J.Tovari, ; C. Aigner; J.Timar; T.Garay, \*\* et al.; Pan-RAF and MEK vertical inhibition enhances therapeutic response in non-V600 BRAF mutant cells; *BMC CANCER* 18 : 1 Paper: 542 , 11 p. (2018) **IF: 4.430**

A.Gaál,; V.G. Mihucz; Sz. Bősze; I. Szabó; **M. Baranyi**; P. Horváth; C. Strel; N. Szoboszlai; Comparative in vitro investigation of anticancer copper chelating agents; *Microchemical Journal* 136 pp. 227-235. , 9 p. (2018) **IF: 4.821**

**M. Baranyi**; M. Lippai ; Zs. Szatmari; A stroma szerepe a tumorok kialakulásában és progressziójában.; *Orvosi Hetilap* 156 : 45 pp. 1816-1823. , 8 p. (2015) **IF: 0.540**