

Prenilációgátlás hatása RAS-mutáns daganatokra kísérleti rendszerekben

BARANYI MARCELL, MOLNÁR ESZTER, RITTLER DOMINIKA, HEGEDŰS BALÁZS, TÍMÁR JÓZSEF

Semmelweis Egyetem, II. Sz. Patológiai Intézet, Budapest

Finanszírozási adatok: A kutatást az NVKP_16-1-2016-0020 számú „RASopátiák diagnosztikájának és terápiájának fejlesztése” c. pályázat támogatta.

Levelezési cím:

Dr. Tímár József, Semmelweis Egyetem, II. Sz. Patológiai Intézet, 1091 Budapest, Üllői út 93. E-mail: jtimar@gmail.com

Közlésre érkezett:

2019. október 22.

Elfogadva:

2019. október 30.

A RAS onkogén mutációja a daganatos megbetegedések 20–25%-ában fordul elő. Kutatócsoportunk a RAS-preniláció gátlásának hatását vizsgálta a RAS-mutáció jelenlétének függvényében melanóma, kolorektális daganat és tüdőadenokarcinóma preklínikai modelljeiben. Vizsgálataink során a klinikai használatban lévő biszfoszfonát, a zoledronsav és annak lipofil származéka, a BPH1222 hatását tanulmányoztuk elsősorban a sejtvonalak életképességére és jelátvitelére. Melanómában és kolorektális daganatban nem figyeltünk meg releváns különbséget az érzékenységekben a mutáns, illetve vad típusú RAS-t hordozó daganatok között. Tüdőadenokarcinómában eddigi eredményeink alapján felvetődhet annak lehetősége, hogy bár mind a vad, mind a mutáns K-RAS-státuszú daganatok növekedését gátolta a biszfoszfonátkezelés, a K-RAS-vad tüdőadenokarcinóma-sejtek érzékenyebbek lehetnek a kezelésre. Összefoglalva, további vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy azonosításra kerüljenek olyan daganattípusok, amelyeknél a biszfoszfonátkezelés hatékony tumorellenes terápiaként funkcionálhat. *Magy Onkol* 63:320-329, 2019

Kulcsszavak: RAS-mutáció, prenilációgátlás, biszfoszfonát

Oncogenic mutation of RAS occurs in 20-25% of all malignancies. Our research group have examined inhibition of RAS prenylation on RAS wild type and RAS mutated melanoma, colorectal cancer and lung adenocarcinoma cell lines. Effects of clinically approved bisphosphonate (zoledronic acid) and its lipophilic derivate (BPH1222) on cell viability and cell signaling were determined. In models of melanoma and colorectal cancer we found no relevant difference in sensitivity to the drugs in light of RAS mutation presence. In case of lung adenocarcinoma bisphosphonate treatment inhibited both wild-type and mutated K-RAS, although tumor cells carrying mutated K-RAS seemed to be more sensitive to the bisphosphonate treatment. In summary, further investigations are warranted to identify tumor subgroups where bisphosphonates could have an effective therapeutic potential.

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

Keywords: RAS mutation, prenylation-inhibition, bisphosphonate

BEVEZETÉS

RAS gének

A rosszindulatú daganatokban található genetikai elváltozások között a RAS gének onkogén mutációi a leggyakoribbak közé tartoznak. A RAS protoonkogének közé a H-, N- és K-RAS gének tartoznak, ez utóbbinak két izoformája, a K-RAS4B és K-RAS4A ismert [1]. A RAS fehérjék kis G-proteinek, amelyek GTP-áz aktivitásuk révén fontos szabályozó molekulaként vesznek részt a sejtek számos létfontosságú jelátviteli útjában. Szerkezetük alapvetően megegyezik, funkcionálisan két fő részre lehet felosztani őket: a GTP-áz aktivitásért és az effektor fehérjékhez való kapcsolódásért felelős G-doménre, illetve a hipervariábilis régióra. A három gén G-doménje 90%-os homológiát mutat egymással, azonban a hipervariábilis régióban jelentős különbségek lelhetők fel. A G-domén két további régióra osztható, az effektor [1–86 as.] és az allosztérikus hurkokra [87–166 as.] [2].

Dacára a nagymértékű homológiának a RAS gének között, a humán mutációs adatok alapján a H-, N- és K-RAS szövetenként eltérő mutációs mintázatot mutat a különböző daganatokban. Például a tüdő- és kolorektális rákokban zömével a K-RAS (~30% és ~35%), míg melanómában az N-RAS mutációi figyelhetők meg [20%], a pajzsmirigyrákban pedig mind a három gén mutációi egyforma arányban képviseltetik magukat [3%]. Továbbá érdekes megfigyelés, hogy a konstitutív aktivációval járó mutációk más-más aminosavat érintenek a három génben. Így a K-RAS-ban főleg a 12., illetve 13. kodon, N-RAS-ban a 61. kodon aminosav-cseréjével járó mutációi figyelhetők meg. A H-RAS a kettő között található, benne mind a három kodon érintettsége közel azonos arányú [3].

A különbségek egyik oka a szöveteket érő eltérő karcinogén ágensekben keresendő, például a melanóma etiológiájában fontos UV által okozott timidin-dimerek elsősorban a Q61-es kodonban okoznak mutációt, míg az adduktképző ágensek – például a dohányzás, mint a tüdőrák elsődleges etiológiai faktora – a G12-es aminosav cseréjével járó mutációval hozhatók összefüggésbe [3].

Azonban számolni kell azzal is, hogy a RAS gének funkcionálisan nem redundánsak, így szövettípusonként eltérő szerepük és fontosságuk lehet. Egérben a K-RAS gén hiánya letális, míg az N- és H-RAS hiánya nem [4, 5]. *In vitro* kísérletek alapján a különböző jelpályák aktivációját a három változat eltérő hatékonysággal valósítja meg: a H-RAS hatékonyabb aktivátora a PI3K/AKT jelpályának, míg a K-RAS inkább a RAF és RAC fehérjéket aktiválja jobban [6–8]. A funkcionális különbségeikért a három génben található eltérésekben kereshetjük a választ. Az egyik lehetséges ok a G-domén minimális varianciája lehet: míg az effektor régió 100%-os homológiát mutat a három génben, az allosztérikus hurkokban találhatóak génspecifikus különbségek, amelyek intramolekuláris kölcsönhatásokban megnyilvánuló eltérésekhez is vezethetnek [2]. Másik lehe-

tőség a hipervariábilis régióban található eltérések szerepe, amelyek az itt található poszttranszlációs módosításokat is nagyban befolyásolják. A poszttranszlációs módosítások a fehérjék eltérő lokalizációs mintázatához vezethetnek, így ezek vizsgálata ígéretes és funkcionálisan is fontosnak tűnő része a RAS-biológiának [9].

A RAS poszttranszlációs módosításai

A RAS fehérjék farneziláció, és – a K-RAS4B izoforma kivételével – egy második poszttranszlációs módosítás, a palmitoiláció segítségével kapcsolódnak a membránhoz [1. ábra]. A farnezilcsoport a C-terminális hipervariábilis régió CAAX motívumán kapcsolódik a fehérjére [C – cisztein, A – alifás aminosavszármazék, X – bármilyen aminosav] a ciszteinen keresztül. Ezt a reakciót a farnezil-transzferáz enzim (FT) katalizálja. Ezután az utolsó 3 aminosav lehasítódik a fehérjéről, végül a terminális aminosav metilálódik [10].

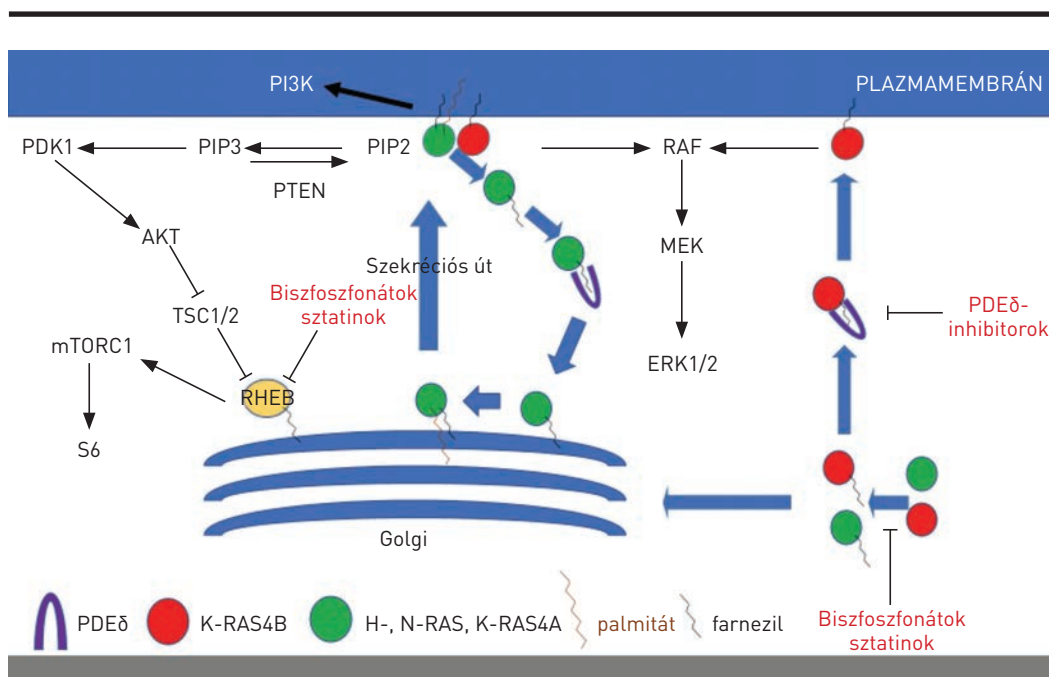
A palmitoilációban már nagyobb mértékű változatoság figyelhető meg: a H-RAS fehérjén kettő, az N-RAS és K-RAS4A fehérjéken pedig egy palmitoilációs hely van. Ez a poszttranszlációs módosítás reverzibilis, dinamikus szabályozott folyamat, amely fontos szerepet tölt be a RAS szabályozásában. A K-RAS4B fehérjén nem történik palmitoiláció, itt egy specifikus polibázikus szekvencia biztosítja a preniláció mellett a megfelelő lokalizációt a negatív töltésű plazmamembránhoz [11].

A fenti eltéréseknek több kísérleti eredmény alapján gyakorlati következményei is vannak, az eltérő poszttranszlációs módosításoknak köszönhetően lokalizációs különbségek figyelhetők meg a RAS fehérjék között. Az N-RAS fehérjék például jelentős abundanciában találhatóak meg az endomembrán rendszer – az ER és a Golgi – membránjához kihorgonyozva, míg a K-RAS4B fehérje a plazmamembránhoz lokalizálódik [2, 3].

Eltérések találhatóak továbbá a fehérjék sejten belüli szállításában is. Az N-RAS és K-RAS4A fehérjék elsősorban az endomembrán rendszerből – az itt történő palmitoiláció következtében – a plazmamembránhoz jutnak a szekréciós úton, innen vissza pedig – depalmitoiláció után – szintén vezikuláris transzporttal jutnak. Ezzel szemben a K-RAS4B transzportját különböző szállítófehérjék – például a foszfo-diészteráz-delta (PDEδ) – szabályozzák és valósítják meg [9].

A RAS-gátlás lehetőségei

Annak ellenére, hogy a RAS géneket a leggyakrabban mutált onkogének között tartják számon, jelenleg nincs hatékony célzott terápiás lehetőség a gátlásukra. Szemben az EGFR, B-RAF és egyéb kinázaktivitású molekulák mutánsspecifikus gátlásával, amely elsősorban ATP-kötő zsebükön keresztül történhet, a RAS fehérjéknél ez a paradigma nem kivitelezhető. Ennek oka elsősorban az, hogy a GTP-kötő zseb GTP iránti affinitása nagyon nagy, pikomól nagyságrendű, míg az előbbi fehérjék ATP felé mutatott affinitása mikromólos. Ez



1. ÁBRA. A RAS fehérjék poszttranszlációs módosulásai és az általuk szabályozott jelátviteli utak sematikus ábrája

a tény, valamint a GTP magas citoplazmatikus koncentrációja lehetetlenné teszi a GTP-analógok használatát [12].

Az intenzív kutatásoknak hála a RAS fehérjék mutánspecifikus gátlásával egyes mutációk esetén történt előrelépés az utóbbi években. Ilyen a G12C mutáció, amely a K-RAS-mutáns tüdő-adenokarcinóma egyik leggyakoribb mutációja. A K-RAS G12C fehérjére specifikus kovalens inhibitorok közül néhány klinikai vizsgálatig is eljutott, vizsgálatuk jelenleg is zajlik [13]. A direkt inhibitorok fejlesztése azonban a többi mutációra jelentős nehézségekkel jár, mivel a G12D/V, Q61K/L aminosavak a ciszteinnel szemben nem reaktívak, így a G12C-nél megvalósított kovalens inhibitor paradigma nem tervezhető ezekben az esetekben. Emiatt a RAS-gátlás indirekt megvalósítása igen fontos szerepet kap a rákkutatásban. Ilyen megoldás lehet a downstream komponensek (MEK, AKT) gátlása, a RAS intracelluláris szállításának célzása – például PDE-inhibitorokkal – valamint poszttranszlációs módosítások, így a preniláció és palmitoiláció gátlásán keresztül a RAS membránhoz való kihorgonyzásának megakadályozása [1].

Ez utóbbi, tehát a RAS fehérjék membránhoz horgonyzódása rendkívül fontos a megfelelő szignalizáció szempontjából. Ennek fő oka a megfelelő lokalizáció: a jelátvitelben a RAS-aktivációt szabályozó elemek, például a tirozinkináz-receptorok, és az azokhoz kapcsolódó adaptorfehérjék is itt helyezkednek el. Ezenkívül a RAS fehérjék által szabályozott effektorok is membránhoz vagy membránkött állványfehérjéhez kapcsolódnak, így igazán hatékony jelátvitel kialakításához elengedhetetlen a megfelelő lokalizáció.

RAS és a prenilációgátlás

A prenilációhoz szükséges motívum mutációja esetén a mutáns K-RAS nem képes transzformálni egér fibroblasztsejteket [14], valamint olyan egerekben, ahol a prenilációhoz szükséges farnezil-transzferáz (FT) és geranilgeranil-transzferáz (GGT) géneket kiütötték, megnövekedett élethosszot figyeltek meg mutáns K-RAS által indukált tüdő-tumormodellel. Egy másik egérmodellben pedig ezen enzimek hiánya szintén hatékonyan gátolta a tumorok kialakulását [15]. Ezenkívül a nem prenilálódott K-RAS citoplazmatikus lokalizációt és fokozott degradációt mutat [16].

A fent ismertetett lehetőségek közül a legszélesebb spektrumú, legtöbb RAS gént és izoformát gátló mechanizmus a prenilációgátlás, amely ígéretes lehetőség lehet a RAS fehérjék terápiás célzására.

Farnezil-transzferáz-inhibitorok

A preniláció gátlásának egyik lehetséges megoldása a farnezil-transzferáz enzim aktivitásának gátlása, amely megvalósítható farnezil-pirofoszfát-analógokkal vagy a CAAX motívumot utánzó kompetitív inhibitorokkal [17]. A kezdeti kísérletek során az FT-inhibitorok (FTI) ígéretes eredményt mutattak mutáns H-RAS-t hordozó tumorsejtek ellen *in vitro* és *in vivo* is [18–20]. Azonban az első klinikai vizsgálatok nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket, ugyanis az FTI-k K- vagy N-RAS-mutáns tumorok esetén nem voltak képesek pozitív hatást kifejteni [21, 22].

Az FTI-k sikertelensége során derült fény arra, hogy N- és K-RAS esetén a farneziláció gátlásakor alternatív

geranilgeranilációval megoldódik a fehérjék membránhoz horgonyzása [23]. A felfedezés után kifejlesztett GGT-inhibitorok (GGTI) *in vitro* – FTI-ekkel kombináltan – sikeresnek bizonyultak a RAS fehérjék farnezilációjának és alternatív geranilgeranilációjának együttes gátlására, azonban az *in vivo* kísérletekben tapasztalt súlyos mellékhatások és toxicitás miatt nem jutott el a kombinációs kezelés a klinikai vizsgálatokig [24, 25]. Bár a transzferáz enzimek gátlása nem bizonyult sikeresnek a RAS fehérjékkel szemben, az FTI-k használata monoterápiaként vagy kemoterápiával kombináltan még jelenthet terápiás előnyt mutáns H-RAS-t hordozó tumorok esetén, mivel a H-RAS fehérjéken nem történik alternatív geranilgeraniláció.

Az FTI és GGTI vegyületek bukása után a kutatások inkább a prenilációgátlás más lehetséges célpontjaira, elsősorban a prenilcsoportok bioszintetikus gátlószereire koncentráltak. Konvencionálisan két nagy vegyületcsoportot tartanak számon, amely a prenilcsoportok szintéziséhez tartozó mevalonát-bioszintetikus útvonal gátlószerei: a sztatínok és biszfoszfónátok.

Sztatínok

A sztatínok a mevalonát-út első lépését, a HMG-CoA vegyület mevalonáttá redukálását katalizáló HMG-CoA-reduktáz enzim aktivitását gátolják, ennek következményeként pedig a teljes izoprénalapú bioszintézis-útvonalat. Eleinte hiperkoleszterinémia kezelésére lettek kifejlesztve, azonban hamarosan fény derült rákellenes hatásaikra is, amelyeket elsősorban a preniláció gátlásán keresztül fejtenek ki. Számos ráktípusban hatékonyan bizonyultak *in vitro* preklínikai kísérletekben, például prosztatata-, emlő-, tüdőrák- és mielóma-sejtvonalakon proapoptotikus és osztódást gátló hatást fejtenek ki [26–29]. Azonban, mivel a sztatínkezelés következményeként rendkívül sokféle molekuláris változást írtak már le, hatásmechanizmusuk feltehetőleg nem korlátozódik csupán a preniláció gátlására [30]. Ezenkívül a sztatínok hatékony működéséhez szükséges magas dózisok a monoterápiaként való alkalmazásukat kérdőjelessé teszik, valamint számolni kell a súlyosabb mellékhatásokkal is, például miopátiával, hepatotoxicitással és rabdomiózissal [30, 31].

Biszfoszfónátok

A biszfoszfónátok szintetikus pirofoszfát-analógok, melyek annak P-O-P alapszerkezetétől eltérően a központi oxigén helyett szénatomot tartalmaznak (P-C-P). Két fő csoportra oszthatóak, amelyek mind szerkezetükben, mint hatásmechanizmusukban eltérőek: nitrogént nem tartalmazó biszfoszfónátokra és a nitrogéntartalmú amino-biszfoszfónátokra [32]. Szerkezetükből kifolyólag nagy affinitással kötődnek a kalciumionokhoz, így élőlényekben a csontok szerves állományához is. Ez a tulajdonságuk határozza meg elsődleges felhasználási területüket; klinikumban csontreszorpció, lízis csökkentésére, oszteoklasztok gátlására, oszteoporózis, valamint csontátérték kezelésére alkalmazzák a biszfoszfo-

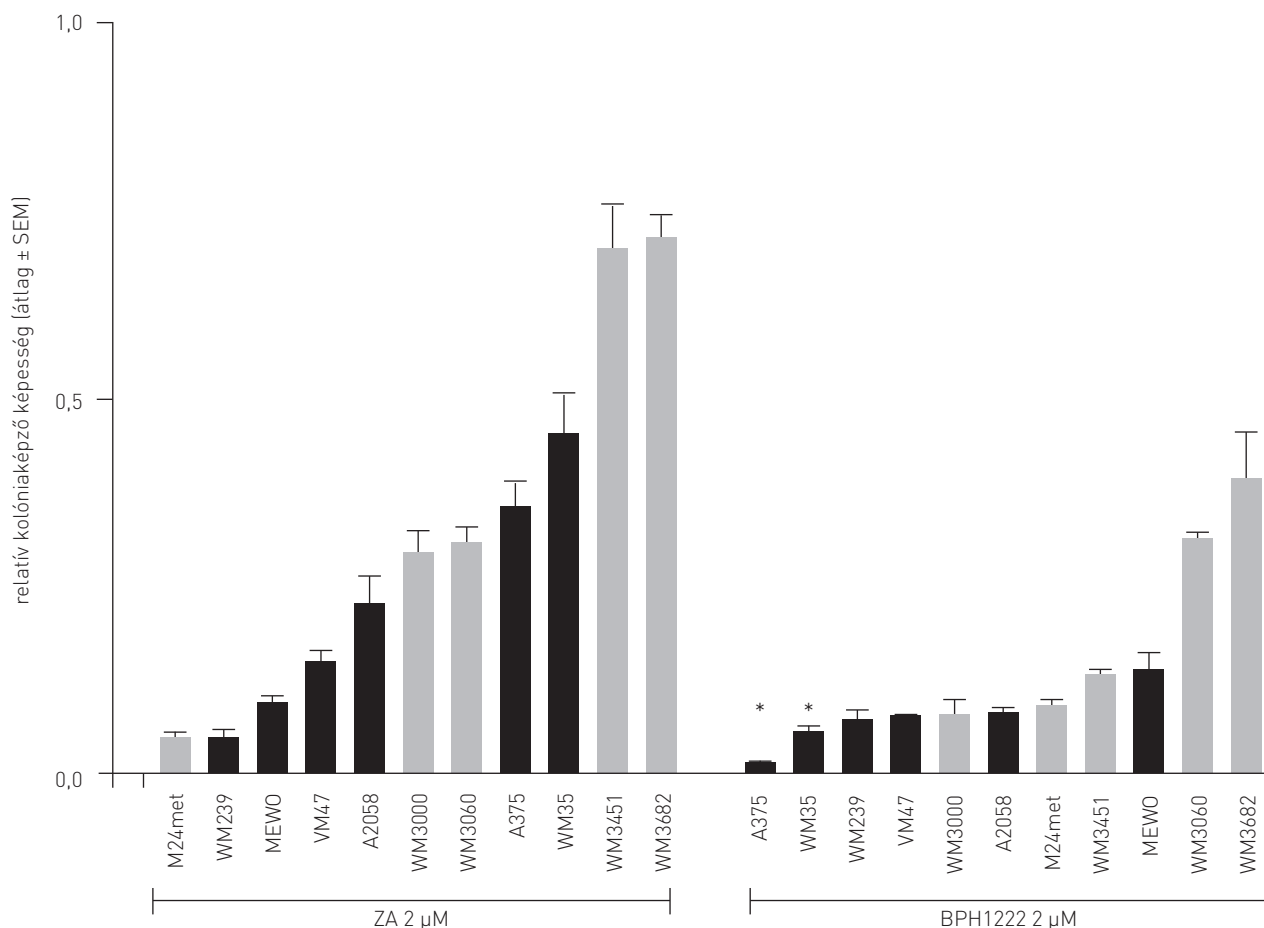
nátokat [33, 34]. Az amino-biszfoszfónátok a nitrogént nem tartalmazó elődjeiktől eltérő mechanizmuson keresztül fejtik ki hatásukat: a mevalonát-útvonalban szereplő farnezil-pirofoszfát-szintáz enzimet gátolva akadályozzák a farnezil-pirofoszfát, valamint az erre épülő bioszintetikus útvonal szereplő vegyületek, például a geranilgeranil-pirofoszfát szintézisét, valamint a szkvalénalapú koleszterinszintézist is [34, 35]. E hatásuk miatt a prenilációgátlás hatékony eszközeiként tartják számon őket, azonban erősen csontszelektív tulajdonságuk miatt terápiás felhasználásuk limitált. Bár a vérplazmából a csontokhoz való nagy affinitásuk miatt pár óra alatt teljesen eltűnnek [36], a csontokhoz tapadva ebben a mikrokozmoszban egyes elképzelések szerint magas lokális koncentrációt érhetnek el, illetve innen felszabadulva hosszú időn keresztül jelen lehetnek a perifériás keringésben, igaz, nagyon alacsony anyagmennyiségben [34]. Tumorelles hatásként csontmetasztázis esetén valószínűleg főleg a tumor mikrokozmoszának modulálásán keresztül valósul meg, elsősorban a csontállomány lízisét okozó oszteoklasztok gátlásának segítségével. Ennek számtalan következménye lehet, például a csontállományban kötött nagy mennyiségű növekedési faktor így nem szabadul fel, elvágvá a tumorsejteket a proliferációjukat elősegítő mikrokozmoszi tényezőtől.

Az egyik leggyakrabban alkalmazott képviselőjük a zoledronsav, mely hidrophil karakterének és csontszövethez való nagy affinitásának köszönhetően csontátérték megelőzésére és kezelésére hatékony, ugyanakkor csontszövetből független daganatok kezelésére nem használható [37, 38]. Számos lipofil karakterű biszfoszfónátot vizsgáltak már, melyek között az egyik legígéretesebbnek a BPH1222 (BPH) adódott [16, 39]. A BPH hatékonyan gátolta a sejtek növekedését K-RAS-mutáns tüdő-adenokarcinóma preklínikai modellrendszereiben [16]. További nagyon fontos eredmény, hogy a lipofil karaktere miatt a BPH nem rakódik le a csontállományba, hanem hosszabb ideig megtalálható a vérplazmában. Ez felveti a lipofil biszfoszfónátok csontátértéktől eltérő helyen történő alkalmazásának lehetőségét is.

A RAS citoplazmatikus transzportjának gátlása

Egy másik ígéretesnek tűnő próbálkozás szintén a K-RAS4B fehérje foszfodiészteráz-deltával való kapcsolatát gátolja. A PDE δ egy citoplazmatikus dajkafehérje, amely – többek között – a farnezilált K-RAS4B fehérje citoplazmatikus szállításáért felel. Az inhibitorok – az egyik legismertebb a deltarasin – a PDE δ -K-RAS4B interakciót gátolják, így megakadályozva a fehérje plazmamembránhoz történő szállítását [40].

Kutatócsoportunk háromféle daganattípuson *in vitro* vizsgálta a prenilációgátlás különböző módjait. Elsősorban annak összefüggésében végeztük a vizsgálatokat, hogy a prenilációgátló szerek hatékonysága függ-e attól, hogy hordoz-e a daganatsejt RAS-mutációt. Kolorektális és tüdő-adenokarcinóma, valamint melanóma malignum sejtvonalakon teszteltük a klinikumban is használt zoledronsavat (ZA),



2. ÁBRA. Melanomasejtek relatív kolóniaképző képessége 10 napos kezelés után. Szürke színnel az N-RAS-mutáns, feketével az N-RAS tekintetében vad típusú sejtek vannak jelölve. A kontrollhoz viszonyítva a 2 µM-os kezelések szignifikáns hatást mutattak, míg az A375 és a WM35 esetén a BPH hatékonysága a ZA-hoz képest is szignifikáns volt (*)

a lipofil biszfoszfonát BPH1222-t (BPH), illetve a deltarasin (DELT) kismolekulájú inhibitorát. A ZA, illetve a BPH vizsgálata nemcsak a mutáns RAS összefüggésében lehet fontos, hanem annak eldöntésére is, hogy a lipofil biszfoszfonát tumorelles hatása – amely csontmetasztázistól eltérő helyen is megnyilvánulhat – a klinikumban használt ZA-éval összemérhető-e.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgálatainkba tizenegy humán melanóma-sejtvonalat vontunk be, melyeket mutációjuk alapján 2 csoportba osztottuk, N-RAS-mutáns (M24met, WM3060, WM3000, WM3451, WM3682) és N-RAS-ra nézve vad típusú (A375, WM35, A2058, WM239, MEWO, VM47) vonalakra. Az A375, A2058 és MEWO vonalakat az ATCC-től, a WM35, WM239, WM3060, WM3000, WM3451, valamint WM3682 sejteket a Wistar Intézetből (Philadelphia, Pennsylvania) vásároltuk. Továbbá, az M24met sejtvonalat melanóma nyirokcsomó-metasztázisából hozták

létre (Scripps Research Institute, La Jolla, CA) [41], míg a VM47 sejtvonalat agyi metasztázisból alapították a Bécsi Rákkutató Intézetben (Institute of Cancer Research, Medical University of Vienna, Ausztria) [42]. A H838 tüdő-adenokarcinóma izogenikus sejtvonalpárt (ahol az eredeti sejtvonalba a K-RAS G12V mutációt bevitték) a Horizon Csoporttól vásároltuk (HorizonDiscovery, Cambridge, UK). A kolorektális rák sejtvonalakat (HCT116, DLD1, WIDR, SW1417) az ATCC-től szereztük be. Minden sejtvonal 37 °C-on, 5%-os CO₂-szinten volt tartva sejtenyésztő flasksokban 4500 mg/dm³ glükóz-, piruvát- és L-glutamin-tartalmú DMEM-ben (Lonza, Svájc) 10% FBS-sel (Gibco-BRL Life Technologies, UK) és 1% antibiotikummal (penicillin, sztreptomycin, amfotericin B) (Lonza) kiegészítve. A zoledronsavat a Novartistól (Basel, Svájc), a deltarasint a Selleckchemtől (Houston, TX) vásároltuk, míg a lipofil BPH1222-t az Eötvös Loránd Tudományegyetem Szerves Kémiai Tanszékén szintetizálták [43]. Kezelőanyagaink hosszú távú (6–12 nap) hatását vizsgáltuk 2 dimenziós

1. TÁBLÁZAT. 3D melanómaszferoid kontrollhoz viszonyított térfogata százalékban kifejezve 2, ill. 5 µM ZA- vagy BPH-kezelés hatására 6 (A375), illetve 12 nap (A2058, M24met, VM47) után

Szferoidtérfogat	A375	A2058	VM47	M24met (NRAS Q61R)
2 µM ZA	73,7±9,7%	89,3±2,3%	106,3±5,9	5,7±1,6
2 µM BPH	9,2±3,6%	64,3±7,2%	66,8±3,0%	16,1±4,3%
5 µM ZA	32,9±8,1%	56,8±7,2%	54,4±4,5%	1,2±0,3%
5 M BPH	0,5±0,2%	34,8±4,9%	2,1±0,8%	0,8±0,2%

Az adatok jelentése: átlag±SEM, *szignifikáns különbség a két kezelőszer hatékonysága között

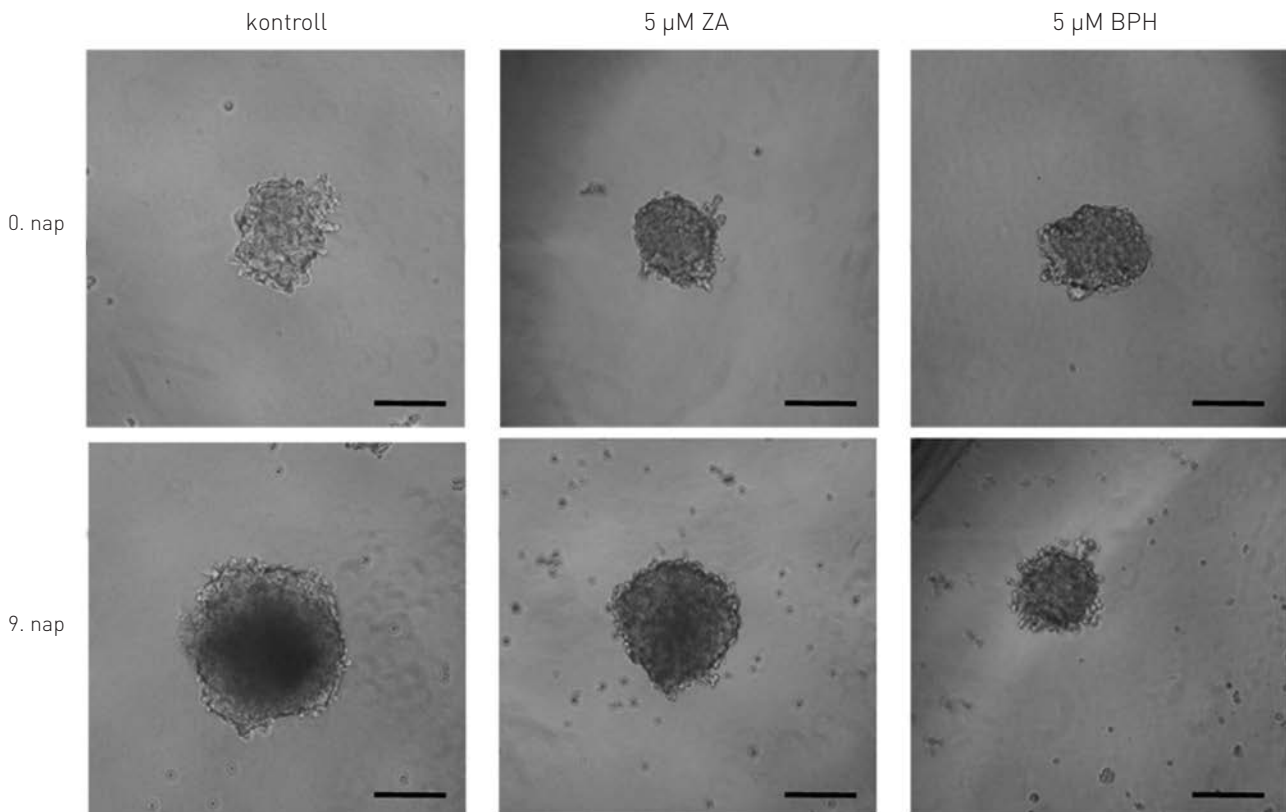
klonogenitási, valamint 3 dimenziós szferoid növekedési esszék segítségével. A jelátviteli útvonalak aktiválódását immunoblot módszerrel vizsgáltuk.

Statistikai analízis során egyutas ANOVA-tesztet alkalmaztunk Dunn- és Tukey-féle post-hoc teszttel a 2D és 3D hosszú távú kísérleti eredmények elemzéséhez. Két csoport esetén kétmintás t-próbát végeztünk. Szignifikáns eltérésnek a p<0,05 értéket tekintettük. Statistikai analíziseinket a GraphPad Prism 5 program segítségével végeztük el (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

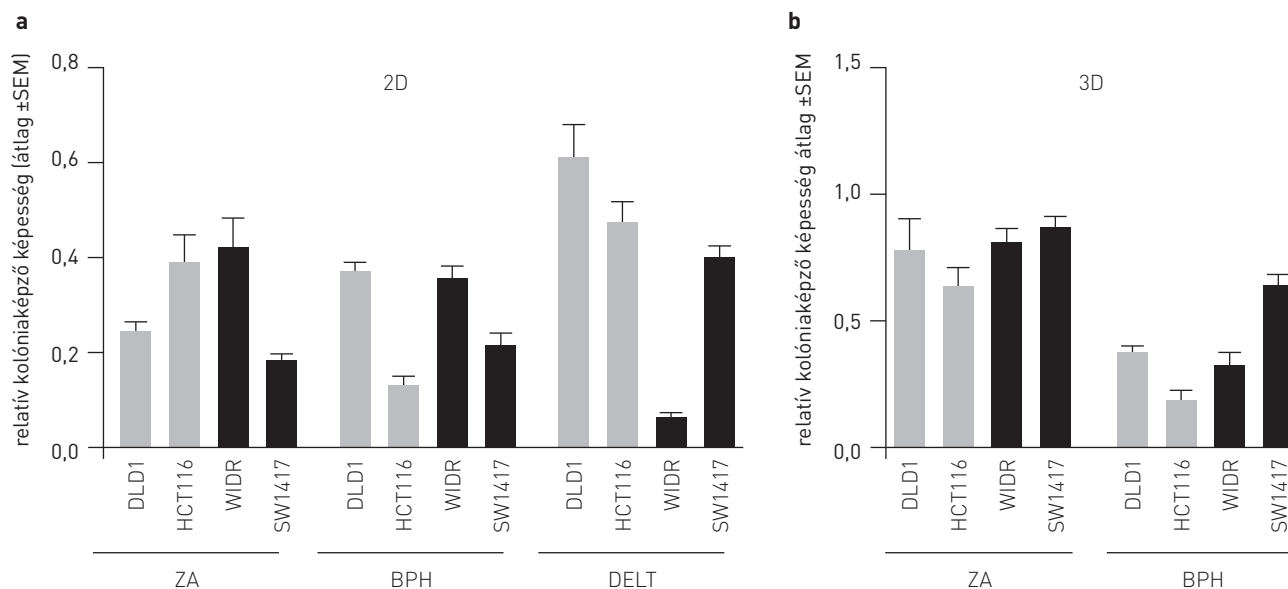
EREDMÉNYEK

Melanóma

Hosszú távú (10 nap) klonogenitási esszék alapján azt találtuk, hogy a lipofil BPH a legtöbb esetben hatékonyabban gátolta a sejtek kolóniaképző képességét, mint a konvencionális ZA; A375 és WM35 sejtek esetén ez a különbség szignifikánsnak adódott (2. ábra). Jelentős mutációfüggést a sejtek érzékenységében nem találtunk. Kivételt képezett az M24met N-RAS-mutáns sejtvonallal, mely igen érzékenynek bizonyult mindkét szerrel, különösen a ZA-val szemben.



3. ÁBRA. Reprezentatív képek a VM47 sejtek szferoidjainak kezelés hatására bekövetkezett méretbeli változásáról. A skála 200 µm-t jelöl



4. ÁBRA. a) Zoledronsav (ZA), BPH1222 (BPH) és deltarasin (DELT) gátlószerek hatása kolorektális adenokarcinóma-vonalak klónképző potenciáljára 2 μ M koncentrációban. b) ZA és BPH hatása 2 μ M koncentrációban a szferoidnövekedésre 12 napos kezelés során. Az értékek a kontrollhoz viszonyított százalékos értékeket mutatják. Szürke színnel a K-RAS-mutáns, feketével a K-RAS tekintetében vad típusú sejtek vannak jelölve

3D szferoid rendszerben is vizsgáltuk a BPH és a ZA hosszú távú daganatellenes hatását négy sejtvonalon. Eredményeink megmutatták, hogy a sejtek 3D környezetben szignifikánsan érzékenyebbek voltak a lipofil BPH-ra, mint a ZA-ra, az M24met sejtvonalat kivéve (1. táblázat, 3. ábra).

Kolorektális adenokarcinóma

Hosszú távú (8 nap) klonogenitási esszéknél vizsgáltuk a BPH és ZA hatását a két K-RAS-mutáns, illetve két K-RAS-vad típusú humán sejtvonalon. A melanómán kapott eredményekhez hasonlóan ez esetben sem találtunk K-RAS-mutációra specifikus érzékenységet. Továbbá a K-RAS4B fehérje sejten belüli szállításáért felelős PDE fehérje gátlószerevel, a deltarasinnal kezelve a sejteket is hasonló eredményt kaptunk (4.a ábra).

A 3D szferoid kultúrákon való vizsgálatok során sem tártunk fel K-RAS-mutációra specifikus érzékenységekülönbséget (4.b ábra).

Tüdő-adenokarcinóma

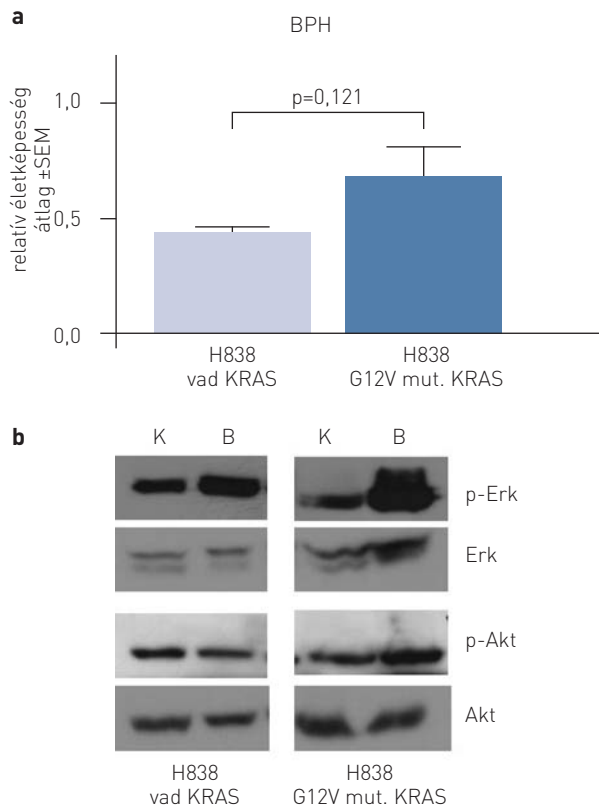
Kutatócsoportunk vizsgálta a BPH tumorelles hatását egy K-RAS-vad/G12V mutáns izogenikus tüdő-adenokarcinóma sejtvonal párban. Azt találtuk, hogy mindkét sejtvonal növekedését gátolta a BPH-kezelés, továbbá a vad típusú K-RAS-t expresszáló sejtvonal, bár nem szignifikáns mértékben, de érzékenyebbnek bizonyult a BPH-gátlásra, mint a K-RAS G12V mutáns párja. Továbbá immunoblot-vizsgálat segítségével megállapítottuk, hogy érdekes módon a K-RAS

G12V mutáns sejtvonalban az ERK és az AKT aktívabb állapotba kerül BPH-kezelésre a kontrollhoz képest. A jelenségek magyarázata még további vizsgálatokat igényel, azonban az eredmények fényében azt elmondhatjuk, hogy tüdő-adenokarcinómában a K-RAS-mutáció jelenléte befolyásolhatja a biszfoszfonátkezelésre adott választ a sejtekben (5. ábra).

MEGBESZÉLÉS

Melanóma

Az utóbbi évtizedekben a melanóma progressziójának a lipidútvonalakkal való kapcsolatát számos tanulmányban bemutatták már. Egyik lehetséges támadáspontnak a preniláció gátlását találták, melynek igen hatékony képviselői a sztatinok és a biszfoszfonátok [44]. Ugyanakkor, annak ellenére, hogy a biszfoszfonátok direkt daganatellenes hatását már az évszázad elején leírták [45], jelentős előrelépés e vegyületekkel a daganatterápiában nem történt. A legaktívabb vegyületek fizikokémiai tulajdonságai és csontszövethez való affinitása miatt nem alkalmazhatóak széles körben a daganatok kezelésére. Ennek nyomán indultak el a kísérletek lipofil karakterű biszfoszfonátok kifejlesztésére, melynek egyik leghatékonyabb képviselője a BPH [39]. Korábbi vizsgálataink megmutatták, hogy melanóma-sejtvonalakon a BPH hatékonyabb, mint a ZA 2D, 3D és *in vivo* kísérleti rendszerekben [43]. Jelen vizsgálatunk eredményei arra utalnak, hogy feltehetően nem az N-RAS-mutáció jelenléte határozza meg a sejtek bisz-



5. ÁBRA. a) A H838 sejtvonal vad típusú és G12V K-RAS-mutációt hordozó változatának BPH-érzékenysége. Koncentráció: 0,5 μ M, 6 napos kezelés. b) ERK- és AKT-aktiváció BPH1222-kezelés hatására. K=kontroll, B=BPH1222

foszfonátérzékenységét, hasonlóan a korábbi vizsgálataink eredményeihez [38]. A legtöbb N-RAS-mutáns sejtet inkább kevésbé érzékenynek találtuk, mint az N-RAS-ra nézve vad típusúakat. A ZA-ra legérzékenyebb N-RAS-mutáns sejtvonal, az M24met esetében feltételezhető, hogy a sejtvonal EGFR-t fokozottan expresszált státusza is szerepet játszhat a nagyobb érzékenységben. Irodalmi adatok szerint a ZA az EGFR-t is gátolhatja [46], továbbá bizonyos adatok szerint hatékonyabban, mint a BPH [47]. Ismeretes továbbá, hogy bár a prenilációnak a RAS fehérje az egyik jelentős célpontja, mellette számos másik kis G-fehérje aktiválódása gátolható a biszfoszfonátok segítségével [45]. Korábbi vizsgálatunkban kimutattuk, hogy melanóma-sejtvonalakban elsősorban a PI3K/AKT/mTOR jelpálya aktivitása csökken a BPH-kezelés hatására. Továbbá a PI3K/AKT/mTOR jelpálya elemei közül az RHEB kis G-fehérje aktivitásának csökkenésében találtunk összefüggést a sejtek BPH-érzékenységeivel [43]. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a biszfoszfonátokkal való kezelés hatásának mechanizmusa jelenleg még nem teljesen tisztázott melanómában, és további vizsgálatokra lenne szükség, hogy a célzott és személyre szabott terápiában

hatékonyabban lehessen alkalmazni. Az azonban biztató, hogy a RAS-mutáns sejtvonalak is érzékenyek bizonyultak a biszfoszfonátkezelésre.

Kolorektális adenokarcinóma

A prenilációt gátló biszfoszfonátok tumorelles határait a kolorektális daganatokon is igazolták. *In vitro* humán vastagbélrák-sejtvonalak növekedését, proliferációját, valamint kolóniaformáló képességét is gátolták [48, 49]. Más tanulmányok alapján ez a hatás – legalábbis részben – annak tudható be, hogy akadályozták a kis G-fehérjék, például a RAS prenilálódását, ezáltal gátolták a RAS által szabályozott jelátviteli utakat [50]. Eredményeink alapján – bár a limitált számú sejtvonalból óvatosan lehet következtetést levonni – a biszfoszfonátok hatása elsősorban nem a mutáns K-RAS gátlásán keresztül valósult meg, hiszen a mutáns sejtvonalak érzékenysége hasonló volt a vad típusú vonalakéhoz. Továbbá a deltarasin – amely a K-RAS4B és a PDE fehérje preniláción alapuló kölcsönhatását gátolva akadályozza annak sejten belüli szállítását [40] – esetében sem mutattunk ki különbséget a K-RAS-mutáns és K-RAS-vad sejtek érzékenységében.

A fenti eredmények mellett, amelyek a biszfoszfonátok általános tumorelles hatását demonstrálják, a klinikumban is számos tanulmány sugallja, hogy a hosszú távú biszfoszfonátkezelés protektív hatású, és csökkenti a vastagbélrák kialakulásának valószínűségét [51–54], bár a K-RAS-mutáció jelenlétének szerepét ezekben a tanulmányokban nem vizsgálták. A szakirodalmi és saját eredményeink alapján nem mutatható ki eltérő érzékenység K-RAS-mutáció függvényében a prenilációgátlásra.

Tüdő-adenokarcinóma

Tüdő-adenokarcinómában a K-RAS driver mutációja az esetek 30–35%-ában fordul elő [55]. A K-RAS mutáció leggyakrabban a 12-es, ritkábban a 13-as és 61-es kodonon jelennek meg [56]. A K-RAS-mutáció jelenlétének prognosztikus és prediktív jelentősége még nem teljesen tisztázott tüdő-adenokarcinómában [57]. Ugyanakkor egy nagy hazai beteganyagon végzett vizsgálat során azt találtuk, hogy a K-RAS-mutáció jelenlétének csak a csontáttétes tüdőrákok esetében volt kedvezőtlen kihatása a betegek teljes túlélésére [58]. Miután a csontáttétes betegeket amino-biszfoszfonáttal kezelik, felmerült ezeknek a szerepnek a K-RAS-mutációtól függő hatása. Korábbi preklinikai vizsgálatainkban azt találtuk, hogy tüdő-adenokarcinóma sejtvonalak esetében a vad K-RAS-t expresszálo sejtek érzékenyebbek mutatkoztak a ZA-val történő prenilációgátlásra, mint a K-RAS-mutációt hordozó sejtvonalak [59]. E feltételezésünket amino-biszfoszfonáttal kezelt tüdőrákos betegek vizsgálatának előzetes eredményei is igazolták: a csontáttétes betegek között a K-RAS-vad betegek teljes túlélése kedvezőbbnek bizonyult, mint a K-RAS-mutánsoké. *In vitro* tesztekben vizsgáltuk a BPH hatását izogénikus K-RAS-vad/G12V mutáns tüdőráksejtvonal-páron. Eredményeink alátámasztották az eddigi adata-

inkat, miszerint a vad típusú K-RAS-t hordozó daganatsejtek érzékenyebbek lehetnek a biszfoszfonátkezelésre, mint a K-RAS-mutációt hordozók.

KÖVETKEZTETÉSEK

A RAS fehérjék gátlása évtizedek óta foglalkoztatja a kutatókat, azonban jelenleg sem létezik olyan univerzális megközelítés, amely áttörést jelentene a RAS-mutáns daganatok gyógyításában. A számtalan összefoglaló közlemény, amely az évek során a témában megjelent, megemlíti a poszttranszlációs módosítások gátlását – többek között a prenilációgátlást – mint az egyik potenciálisan kiaknázható módszert a mutáns RAS blokkolására. Mivel a preniláció számtalan kis G-fehérjét is érint – például a vezikuláris transzportban fontos RAB, a motilitást szabályozó RAC és RHO, illetve a PI3K/AKT/mTOR jelpályában szereplő RHEB fehérjéket –, a biszfoszfonátkezelésre adott tumorelles válasz molekuláris hátterének feltérképezése nem egyszerű feladat. Munkánk során az egyik fő kérdés az volt, hogy a RAS-mutáció jelenléte önmagában érzékenyít-e a prenilációgátlásra. Erre a szakirodalom, illetve a saját eredmé-

nyeink alapján azt a választ adhatjuk, hogy melanómában és kolorektális daganatban kimutatható egyértelmű különbség nincs az érzékenységekben mutáns, illetve vad típusú RAS-t tartalmazó daganatok között. Tüdő-adenokarcinómában azonban az eddigi eredményeink alapján felvetődhet annak lehetősége, hogy bár mind a vad, mind a mutáns K-RAS státuszú daganatok növekedését gátolta a biszfoszfonátkezelés, a K-RAS-vad tüdőadenokarcinóma-sejtek érzékenyebbek lehetnek a kezelésre, aminek klinikai következményeire is vannak eredményeink. Másik fontos kérdés, hogy rezisztenciát okozhat-e a RAS-mutáció jelenléte prenilációgátló szerekre, például a klinikumban is használt zoledronsavra. Eredményeink alapján a biszfoszfonátok a RAS-mutáns daganatokra is fejtenek ki tumorelles hatást *in vitro*, azonban fontos leszögezni, hogy *in vivo* számtalan egyéb faktor – például a csontmetasztázis mikrokörnyezetének modulálása – is befolyásolhatja a választ. Összefoglalva, szelektív, mutáns RAS elleni hatás valószínűleg nem várható a prenilációgátló vegyületektől, azonban további vizsgálatok fényt deríthetnek olyan altípusokra, amelyeknél hatékony terápiás eszközként funkcionálhatnak.

IRODALOM

- Singh H, Longo DL, Chabner BA. Improving prospects for targeting RAS. *J Clin Oncol* 33:3650–3659, 2015
- Parker JA, Mattos C. The K-RAS, N-RAS, and H-RAS isoforms: unique conformational preferences and implications for targeting oncogenic mutants. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8: pii: a031427, 2018
- Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of RAS mutations in cancer. *Cancer Res* 72:2457–2467, 2012
- Esteban LM, Vicario-Abejón C, Fernández-Salguero P, et al. Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. *Mol Cell Biol* 21:1444–1452, 2001
- Koera K, Nakamura K, Nakao K, et al. K-RAS is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene* 15:1151–1159, 1997
- Walsh AB, Bar-Sagi D. Differential activation of the Rac pathway by H-RAS and K-RAS. *J Biol Chem* 276:15609–15615, 2001
- Yan J, Roy S, Apolloni A, et al. RAS isoforms vary in their ability to activate RAF-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 273:24052–24056, 1998
- Voice JK, Klemke RL, Le A, et al. Four human RAS homologs differ in their abilities to activate RAF-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *J Biol Chem* 274:17164–17170, 1999
- Ahearn I, Zhou M, Philips MR. Posttranslational modifications of RAS proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8: pii: a031484, 2018
- Wang M, Casey PJ. Protein prenylation: unique fats make their mark on biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17:110–122, 2016
- Tsai FD, Lopes MS, Zhou M, et al. K-RAS4A splice variant is widely expressed in cancer and uses a hybrid membrane-targeting motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:779–784, 2015
- Stephen AG, Esposito D, Bagni RK, McCormick F. Dragging Ras back in the ring. *Cancer Cell* 25:272–281, 2014
- AMG 510 first to inhibit “undruggable” K-RAS. *Cancer Discov* 9:988–989, 2019
- Jackson JH, Cochrane CG, Bourne JR, et al. Farnesol modification of Kirsten-ras exon 4B protein is essential for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:3042–3046, 1990
- Liu M, Sjogren AKM, Karlsson C, et al. Targeting the protein prenyltransferases efficiently reduces tumor development in mice with K-RAS-induced lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:6471–6476, 2010
- Xia Y, Liu YL, Xie Y, et al. A combination therapy for K-RAS-driven lung adenocarcinomas using lipophilic bisphosphonates and rapamycin. *Sci Transl Med* 6:263ra161, 2014
- Thurnher M, Nussbaumer O, Gruenbacher G. Novel aspects of mevalonate pathway inhibitors as antitumor agents. *Clin Cancer Res* 18:3524–3531, 2012
- Barrington RE, Subler MA, Rands E, et al. A farnesyltransferase inhibitor induces tumor regression in transgenic mice harboring multiple oncogenic mutations by mediating alterations in both cell cycle control and apoptosis. *Mol Cell Biol* 18:85–92, 1998
- Kohl N, Mosser S, deSolms S, et al. Selective inhibition of ras-dependent transformation by a farnesyltransferase inhibitor. *Science* 260:1934–1937, 1993
- Kohl NE, Wilson FR, Mosser SD, et al. Protein farnesyltransferase inhibitors block the growth of ras-dependent tumors in nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9141–9145, 1994
- Rao S, Cunningham D, Gramont Ad, et al. Phase III double-blind placebo-controlled study of farnesyl transferase inhibitor R115777 in patients with refractory advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 22:3950–3957, 2004
- Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ. Farnesyltransferase inhibitors: a detailed chemical view on an elusive biological problem. *Curr Med Chem* 15:1478–1492, 2008
- Whyte DB, Kirschmeier P, Hockenberry TN, et al. K- and N-RAS are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J Biol Chem* 272:14459–14464, 1997
- deSolms SJ, Ciccarone TM, MacTough SC, et al. Dual protein farnesyltransferase-geranylgeranyltransferase-I inhibitors as potential cancer chemotherapeutic agents. *J Med Chem* 46:2973–2984, 2003
- Lobell RB, Omer CA, Abrams MT, et al. Evaluation of farnesyl:protein transferase and geranylgeranyl:protein transferase inhibitor combinations in preclinical models. *Cancer Res* 61:8758–8768, 2001
- Marcelli M, Cunningham GR, Haidacher SJ, et al. Caspase-7 is activated during lovastatin-induced apoptosis of the prostate cancer cell line LNCaP. *Cancer Res* 58:76–83, 1998
- Sivaprasad U, Abbas T, Dutta A. Differential efficacy of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors on the cell cycle of prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 5:2310–2316, 2006
- Yu X, Pan Y, Ma H, et al. Simvastatin inhibits proliferation and induces apoptosis in human lung cancer cells. *Oncol Res* 20:351–357, 2013

29. Spampinato C, De Maria S, Sarnataro M, et al. Simvastatin inhibits cancer cell growth by inducing apoptosis correlated to activation of Bax and down-regulation of BCL-2 gene expression. *Int J Oncol* 40:935–941, 2012
30. Matuszewicz L, Meissner J, Toporkiewicz M, et al. The effect of statins on cancer cells—review. *Tumour Biol* 36:4889–4904, 2015
31. Bellosa S, Paoletti R, Corsini A. Safety of statins: focus on clinical pharmacokinetics and drug interactions. *Circulation* 109:iii50–57, 2004
32. Fleisch H. Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res* 4:30–34, 2002
33. Coleman RE. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treat Rev* 27:165–176, 2001
34. Takeshi Y, Shinya K, Eishi A, et al. Zoledronic acid – a multiplicity of anti-cancer action. *Curr Med Chem* 14:2126–2135, 2007
35. Green JR. Bisphosphonates: preclinical review. *Oncologist* 9:3–13, 2004
36. Chen T, Berenson J, Vescio R, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. *J Clin Pharmacol* 42:1228–1236, 2002
37. Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone* 38:617–627, 2006
38. Garay T, Kenessey I, Molnar E, et al. Prenylation inhibition-induced cell death in melanoma: reduced sensitivity in B-RAF mutant/PTEN wild-type melanoma cells. *PLoS One* 10:e0117021, 2015
39. Zhang Y, Cao R, Yin F, et al. Lipophilic bisphosphonates as dual farnesyl/geranylgeranyl diphosphate synthase inhibitors: an X-ray and NMR investigation. *J Am Chem Soc* 131:5153–5162, 2009
40. Zimmermann G, Papke B, Ismail S, et al. Small molecule inhibition of the K-RAS–PDE δ interaction impairs oncogenic K-RAS signalling. *Nature* 497:638–642, 2013
41. Mueller BM, Romerdahl CA, Trent JM, et al. Suppression of spontaneous melanoma metastasis in scid mice with an antibody to the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 51:2193–2198, 1991
42. Pirker C, Holzmann K, Spiegl-Kreinecker S, et al. Chromosomal imbalances in primary and metastatic melanomas: over-representation of essential telomerase genes. *Melanoma Res* 13:483–492, 2003
43. Rittler D, Baranyi M, Molnár E, 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. *Int J Mol Sci* 20:pii: E4917, 2019
44. Tímár J, Hegedüs B, Rásó E. The role of lipid signaling in the progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 37:245–255, 2018
45. Green JR, Clezardin P. Mechanisms of bisphosphonate effects on osteoclasts, tumor cell growth, and metastasis. *Am J Clin Oncol* 25:S3–9, 2002
46. Yuen T, Stachnik A, Iqbal J, et al. Bisphosphonates inactivate human EGFRs to exert antitumor actions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:17989–17994, 2014
47. Malwal SR, O’Dowd B, Feng X, et al. Bisphosphonate-generated ATP-analogs inhibit cell signaling pathways. *J Am Chem Soc* 140:7568–7578, 2018
48. Gao X, Jiang B, Zou S, et al. Zoledronate can promote apoptosis and inhibit the proliferation of colorectal cancer cells. *Tumour Biol* 36:5315–5322, 2015
49. Sewing L, Steinberg F, Schmidt H, et al. The bisphosphonate zoledronic acid inhibits the growth of HCT-116 colon carcinoma cells and induces tumor cell apoptosis. *Apoptosis* 13:782–789, 2008
50. Kato J, Futamura M, Kanematsu M, et al. Combination therapy with zoledronic acid and cetuximab effectively suppresses growth of colorectal cancer cells regardless of K-RAS status. *Int J Cancer* 138:1516–1527, 2016
51. Bonovas S, Nikolopoulos G, Bagos P. Bisphosphonate use and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol* 76:329–337, 2013
52. Rennert G, Pinchev M, Rennert HS, et al. Use of bisphosphonates and reduced risk of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 29:1146–1150, 2011
53. Thosani N, Thosani SN, Kumar S, et al. Reduced risk of colorectal cancer with use of oral bisphosphonates: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 31:623–630, 2013
54. Yang G, Hu H, Zeng R, et al. Oral bisphosphonates and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *J Clin Gastroenterol* 47:741–748, 2013
55. Wood K, Hensing T, Malik R, Salgia R. Prognostic and predictive value of K-RAS in non-small-cell lung cancer: a review. *JAMA Oncology* 2:805–812, 2016
56. Ferrer I, Zugazagoitia J, Herbertz S, et al. K-RAS-mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy. *Lung Cancer* 124:53–64, 2018
57. Tímár J. The clinical relevance of K-RAS gene mutation in non-small-cell lung cancer. *Curr Opin Oncol* 26:138–144, 2014
58. Lohinai Z, Klikovits T, Moldvay J, et al. K-RAS-mutation incidence and prognostic value are metastatic site-specific in lung adenocarcinoma: poor prognosis in patients with K-RAS mutation and bone metastasis. *Sci Rep* 7:39721, 2017
59. Kenessey I, Kóí K, Horváth O, et al. K-RAS-mutation status dependent effect of zoledronic acid in human non-small cell cancer preclinical models. *Oncotarget* 7:79503–79514, 2016