

Prof. Dr. Balázs Margit DSc

Humán malignus melanoma gyógyszerrezisztencia kialakulásának molekuláris háttere



2022. május 10.

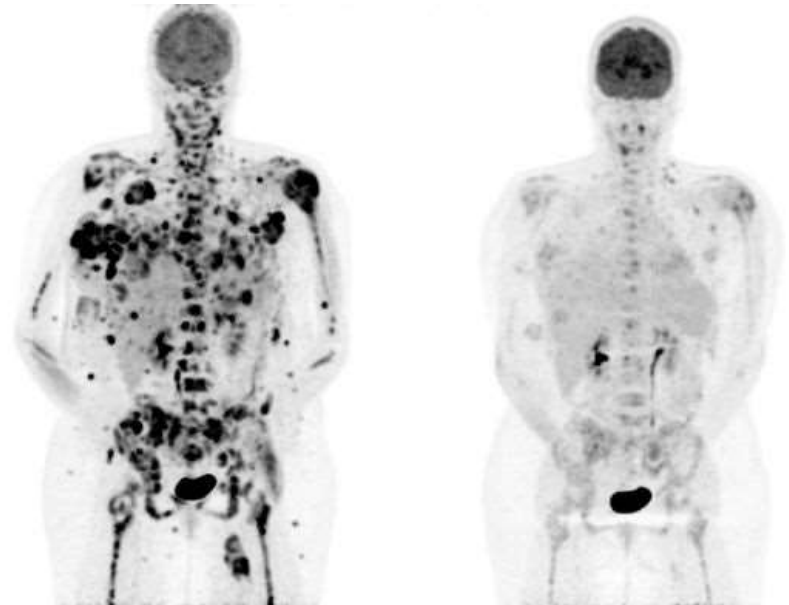
*Debreceni Egyetem
Általános Orvostudományi Kar
Népegészség és Járványtani Intézet
MTA-DE Népegészségügyi Kutatócsoport*

HUMÁN MALIGNUS MELANOMA

- ❖ Melanocitákból kiinduló rosszindulatú daganat (bőrdaganatok 3-6%-a)
- ❖ Primer daganatok radikális sebészi eltávolítása
- ❖ Gyakori áttétképzés; 10 éves túlélés >10 %
- ❖ Sztenderd kemoterápia: 5- 20 % hatékonyság
- ❖ Mérőöldkő: $BRAF^{V600E}$ mutáció: melanomák 40-60%



Célzott terápiák



*Before and after scans of a patient treated with Vemurafenib
(Courtesy of the Peter MacCallum Cancer Centre)*

A terápia hatékonyságát beárnyékolja a gyógyszerrel szembeni viszonylag gyorsan kialakuló rezisztencia

AZ ELSŐ SIKERES TARGET SPECIFIKUS TERÁPIA VEMURAFENIB

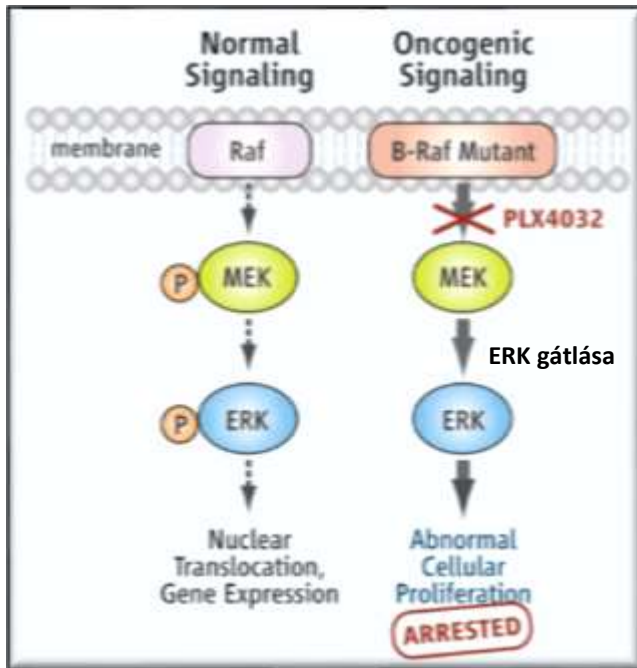
Normál sejtek



Melanoma sejtek



> 50% melanoma
(BRAFV600E)



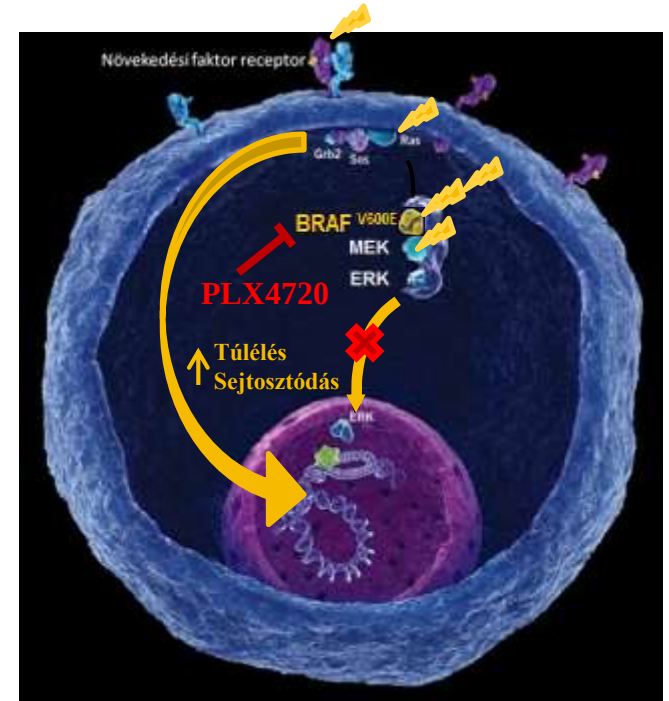
mutáns BRAF fehérje
az első legfontosabb
terápiás célpont

vemurafenib

gyógyszerrezisztencia

rezisztencia háttérében álló
mechanizmusok jelentős
része tisztázatlan

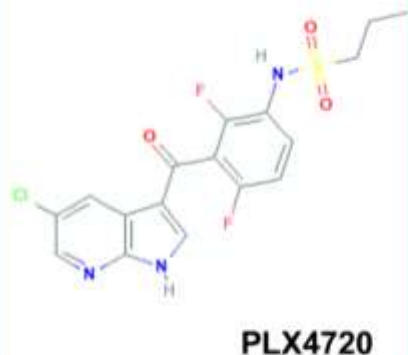
Metasztatikus melanomák



Serine/Threonine Kinase
Mitogen-Activated Protein Kinase
Extracellular signal-regulated kinase

MOLEKULÁRIS MECHANIZMUSBAN ELTÉRŐ CÉLZOTT GYÓGYSZER KEZELÉSEKKEL ÖSSZEFÜGGŐ REZISZTENCIA KIALAKULÁSÁNAK HÁTTERE

MONOTERÁPIA



BRAF mutáns fehérje
működésének gátlása

2011 FDA

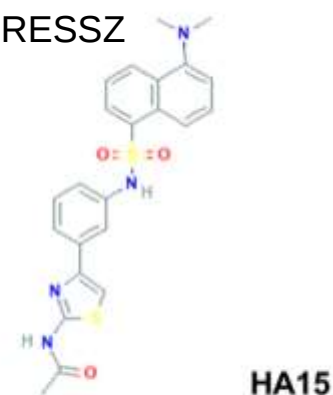
KOMBINÁLT TERÁPIA



BRAF inhibitor és **MEK** inhibitor párhuzamos
kezelés

2018 FDA

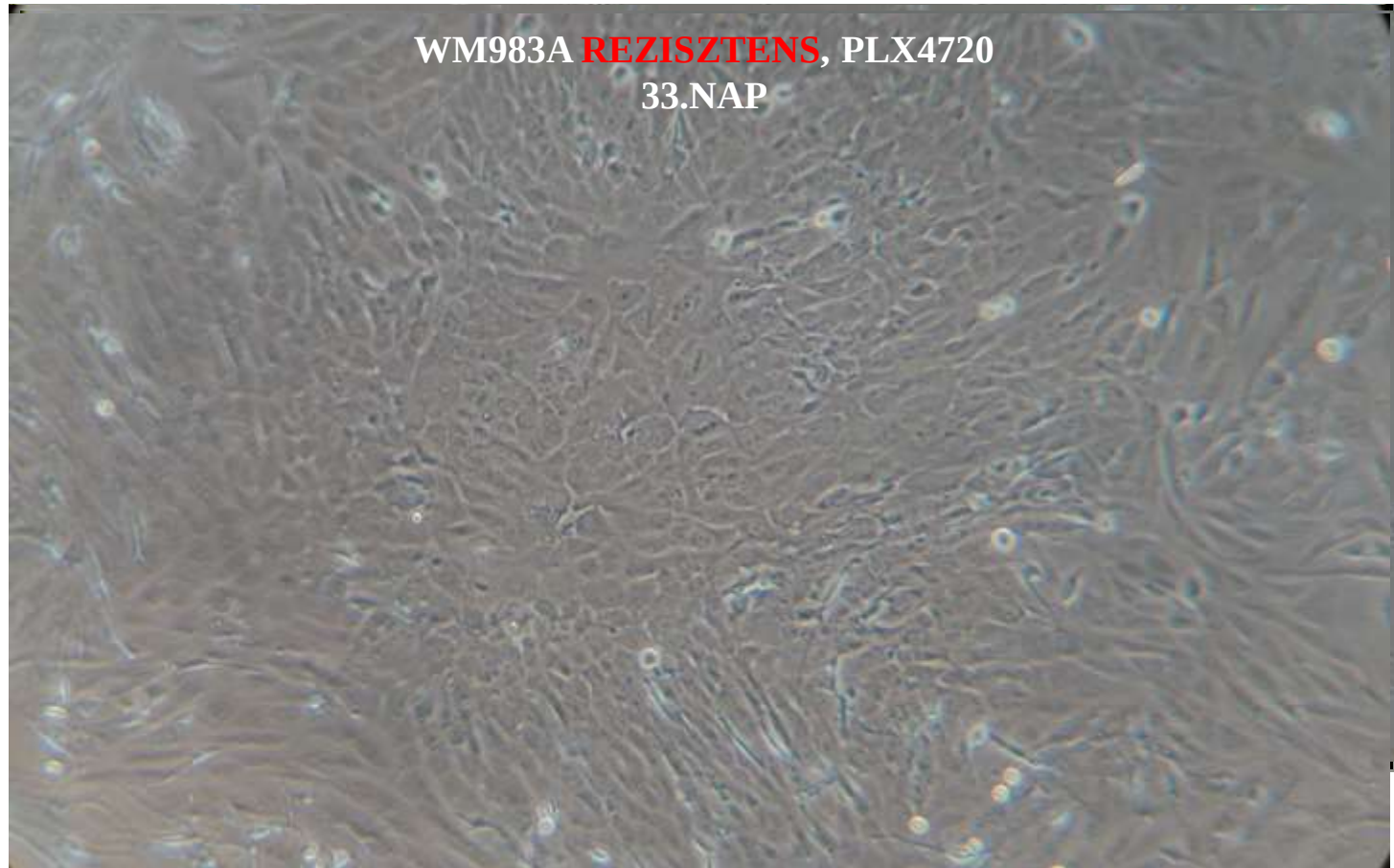
ER STRESSZ



Daganat sejtekben ER
stresszt indukál
Szelektíven csökkenti a
melanoma sejtek
proliferációját

2016

BRAF INHIBITOR REZISZTENS SEJTEK LÉTREHOZÁSA



MELANOMA SEJTVONALAK

BRAF^{V600E}

MELANOMÁS BETEGEK PRIMER TUMORÁBÓL ÉS MELANOMA METASZTÁZISÁBÓL LÉTREHOZOTT SEJTVONALAK

4 primer és 4 metasztázis eredetű sejtvonal

wt-BRAF^{V600E} sejtvonal

NRAS^{61L}-wt-BRAF^{V600E} sejtvonal



- ✓ BRAFinhibitor (vemurafenib) rezisztens sejtvonalak
- ✓ Encorafenib + Binimetinib rezisztens sejtvonalak
- ✓ HA15 rezisztens sejtvonalak

NAGYFELBONTÁSÚ ARRAY ANALÍZISEK

Array comparative genom hibridizáció

Affymetrix CytoScan 750K microarray

Rezisztenciával összefüggő genetikai eltérések azonosítása

Génexpressziós array analízisek

Affymetrix Human Gene 1.0 microarray, RNS-seq

Géneltérések funkcionális szerepe

Fehérje expressziós analízisek

Proteome Profiler Human XL Oncology Array

Adat elemzések, analízisek

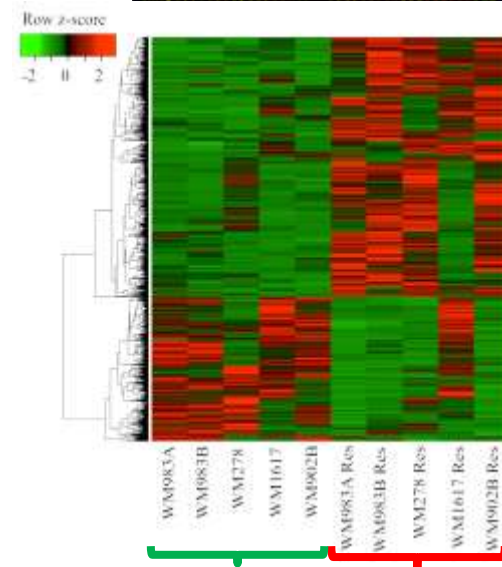
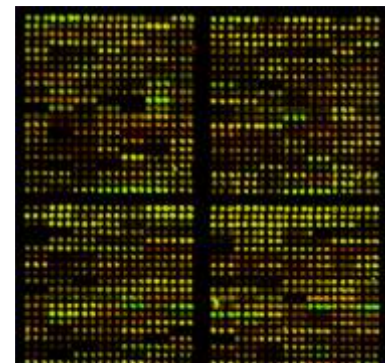
*Jelátviteli útvonalak, gének funkcionális elemzése,
funkcionális gén network analízisek*

DNS metilációs chipek

Illumina Infinium II Human Methylation 450K (HM450K) BeadChip

Genom strukturális eltérések nélküli változások

Array CGH

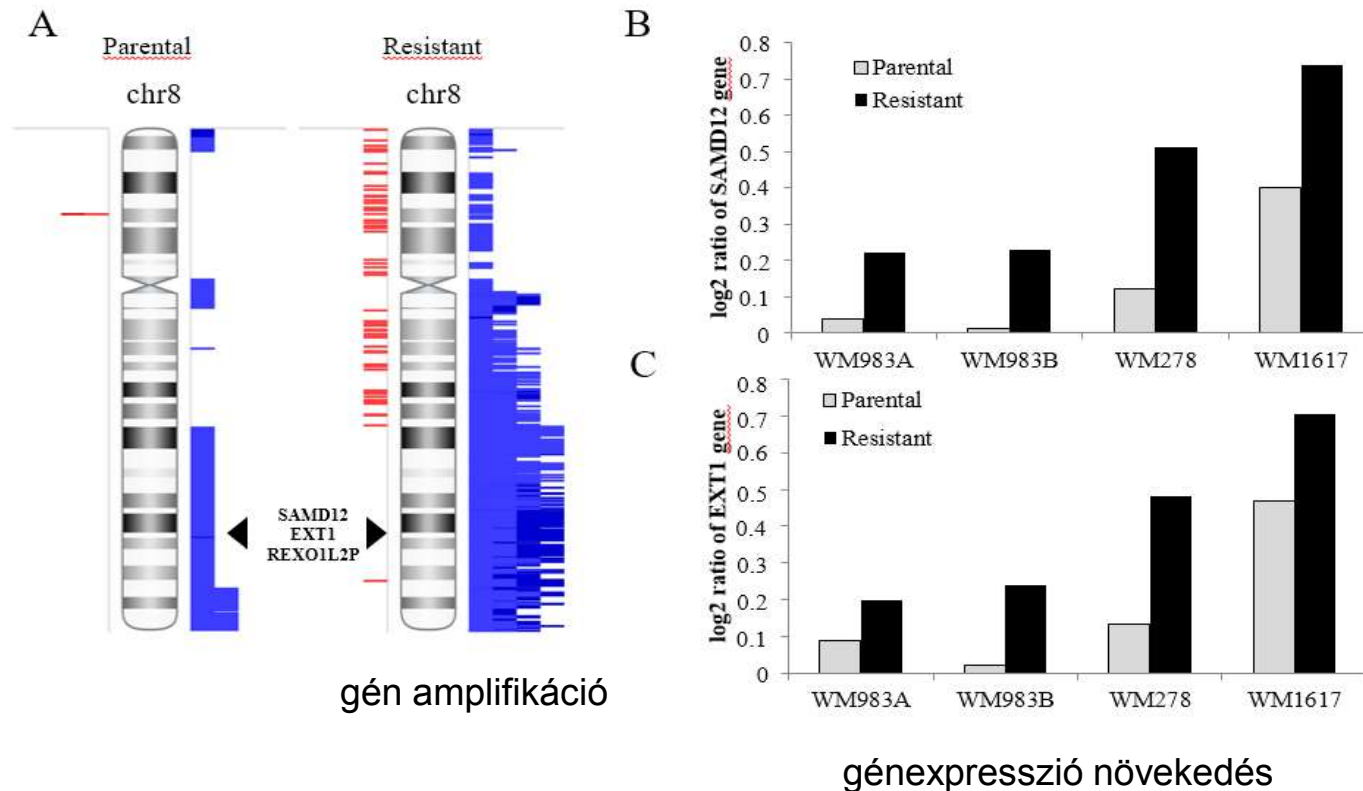


B RAFi szenzitív

BRAFi rezisztens

Monoterápia: BRAFi vemurafenib analóg

Array CGH: szignifikáns különbség a rezisztens sejtekben



***SAMD12* (8q24.12); *REXO1L2P* (8q21.2)**

***EXT1* (8q24.11): doxorubicin-rezisztens emlődaganatok**



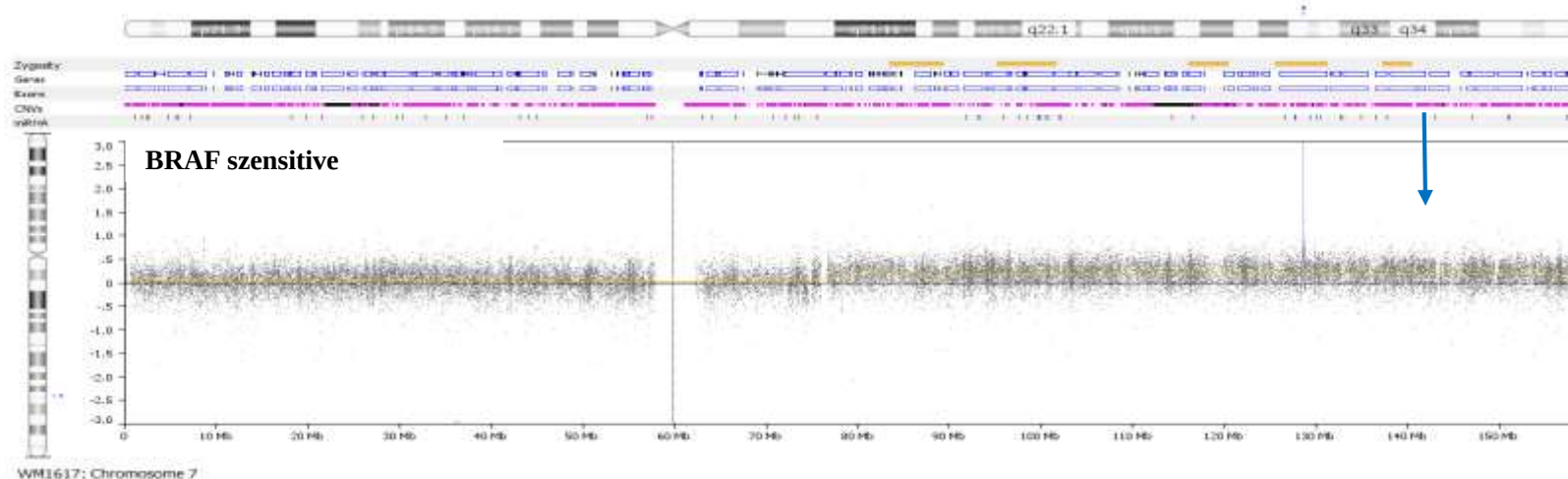
új célpont lehet egyes daganatok antraciklin terápiával szemben kialakuló rezisztencia leküzdésében

Monoterápia: BRAFi vemurafenib analóg

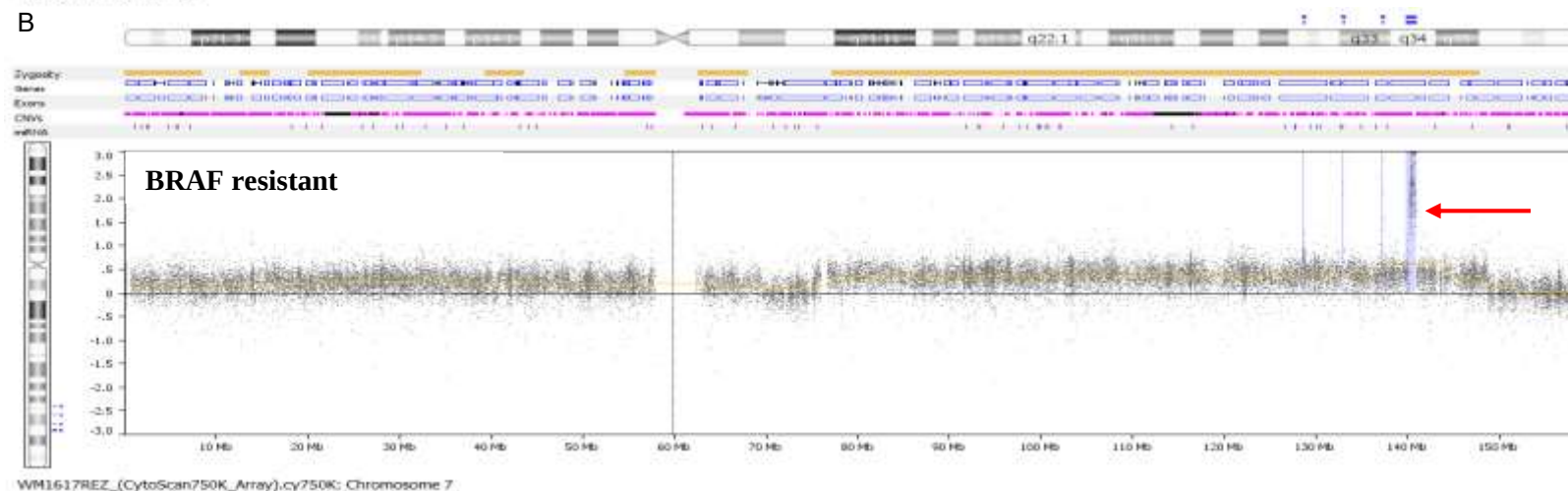
Array CGH: szignifikáns különbség a rezisztens sejtekben

7q34: BRAF

A



B



BRAFamplifikáció → NRAS mutáció → MEK1/2 mutáció

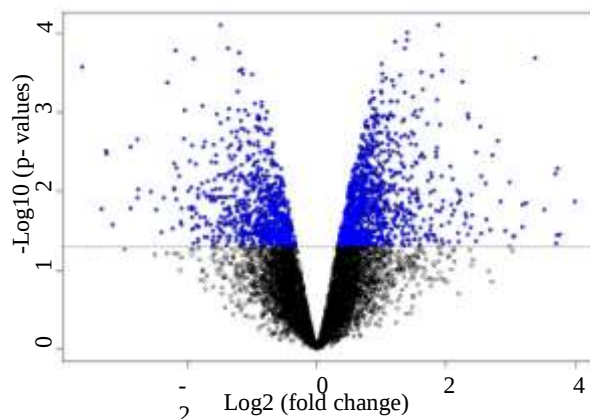
BRAF INHIBITOR REZISZTENCIA KIALAKULÁSÁVAL ÖSSZEFÜGGŐ GÉNEXPRESSZIÓS ELTÉRÉSEK

Molecular alterations associated with acquired resistance to BRAFV600E targeted therapy in melanoma cells.

Szász I, Koroknai V, Kiss T, Vízkeleti L, Ádány R, Balázs M.

Melanoma Res. 2019 Aug;29(4):390-400. doi: 10.1097/CMR.0000000000000568.

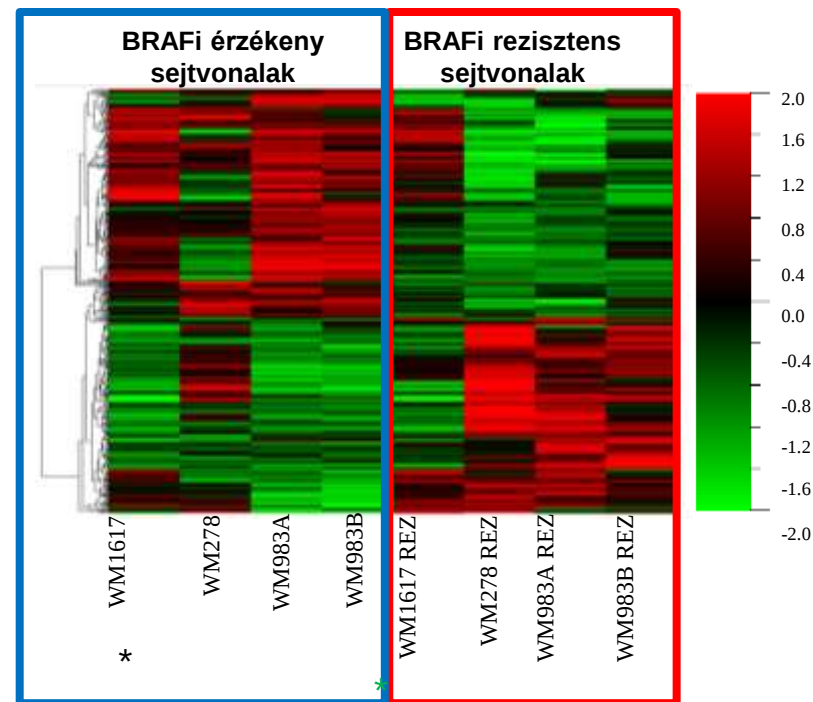
Szignifikáns eltérést mutató gének

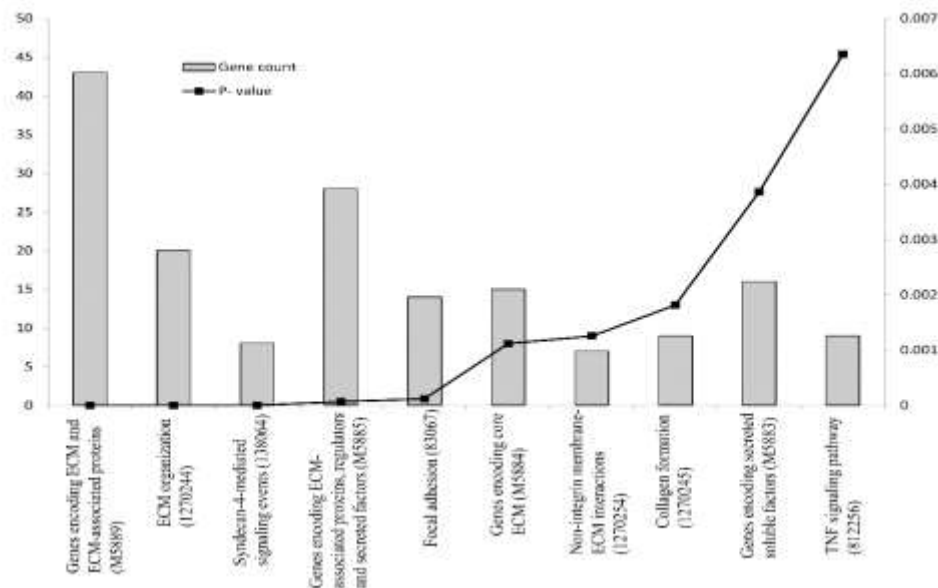


437 szignifikánsan eltérő gén expressziója a rezisztens sejtekben (2x)

204 megnövekedett expresszió

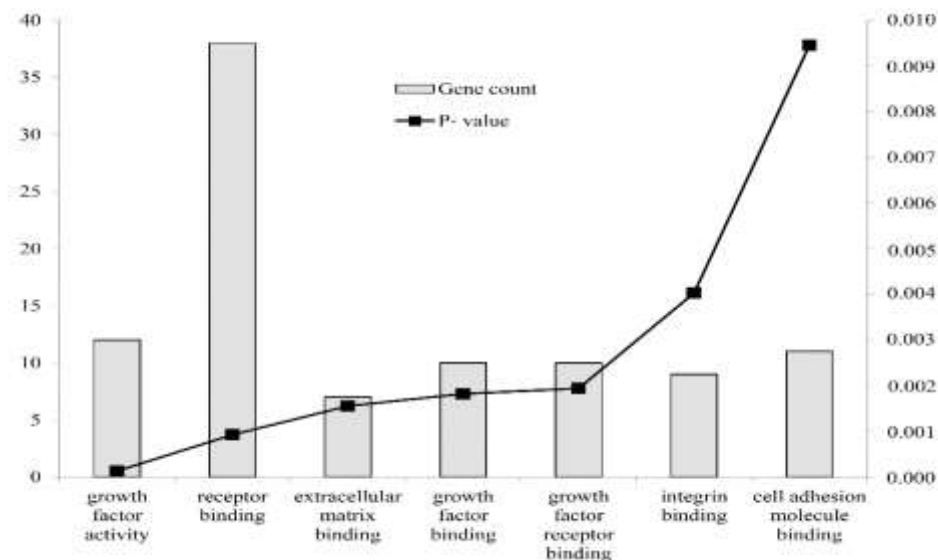
233 csökkent expresszió





Rezisztencia kialakulása során szignifikánsan megváltozott jelátviteli útvonalak (legalább öt gén)

- extracelluláris mátrixot szabályozó gének
- ECM-hez kapcsolódó fehérjéket kódoló gének
- fokális adhézcióban részt vevő gének
- TNF jelátviteli útban részt vevő gének

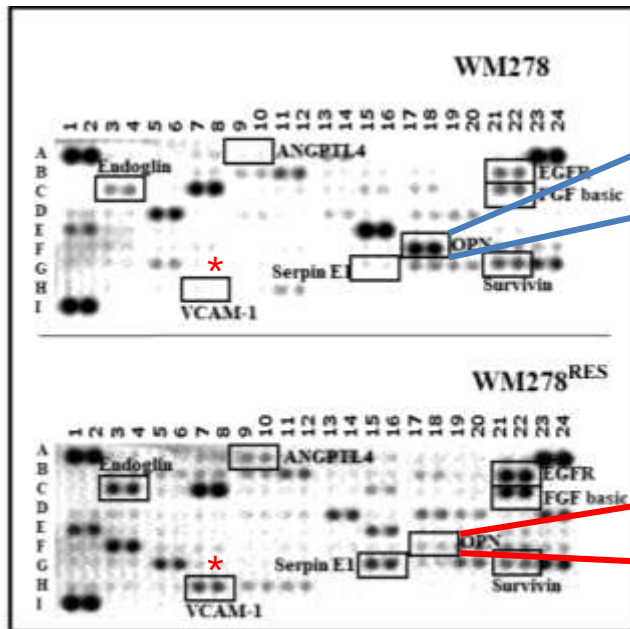


Megnövekedett expressziójú gének

- növekedési faktorokhoz
- növekedési faktor receptorokhoz
- extracelluláris mátrixhoz
- integrinekhez
- sejtheadhéziós molekulákhoz

REZISZTENCIÁVAL ÖSSZEFÜGGŐ FEHÉRJE EXPRESSZIÓ VÁLTOZÁSOK

Proteome Profiler Human XL Oncology
Array 84 daganatokkal összefüggő fehérje

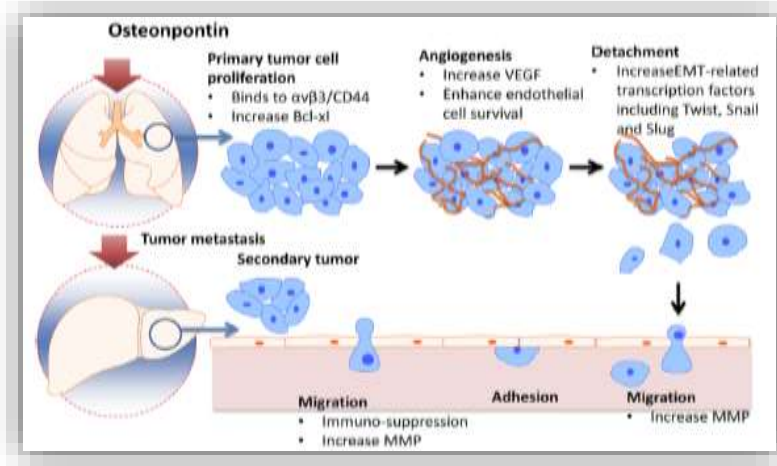


* **Osteopontin**

**BRAFi érzékeny
melanoma sejtek**

**BRAFi rezisztens
melanoma sejtek**

Multifunkcionális fehérje



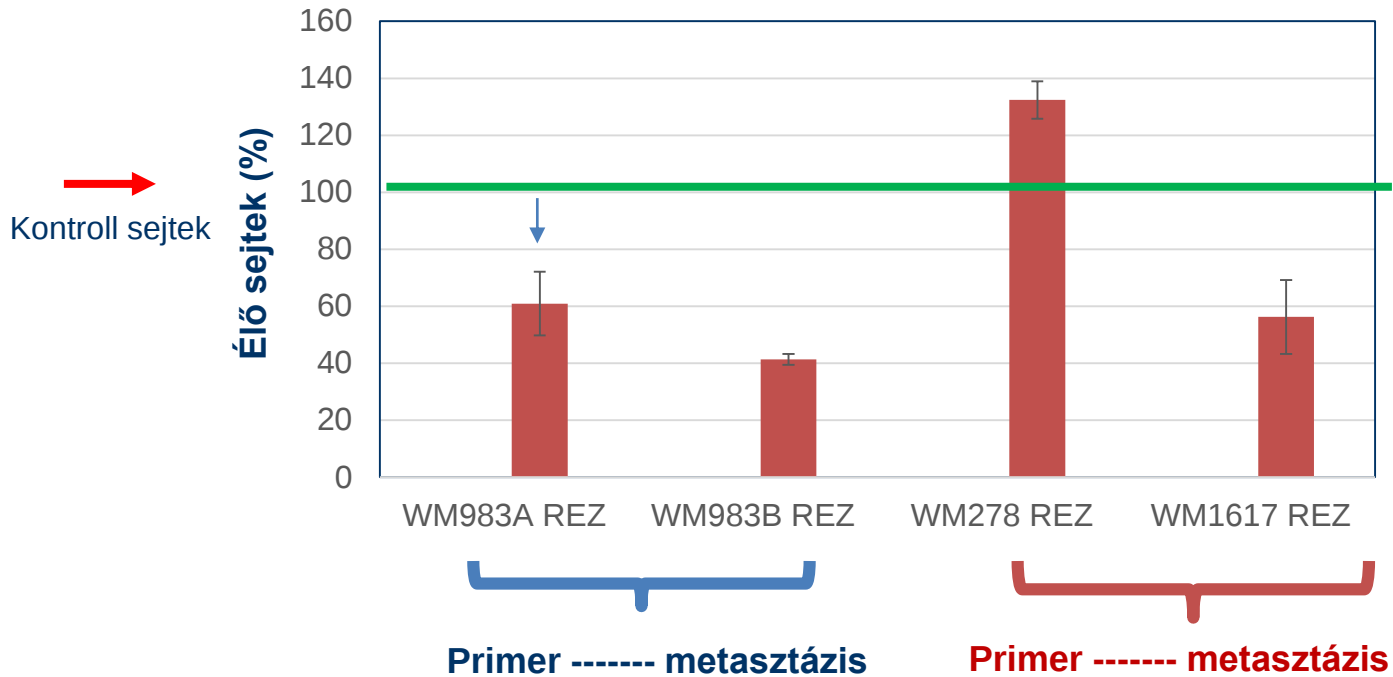
Zhao et al: Cell Death and Disease, 9:356. 2018

OPN gyógyszerrezisztencia
kialakulásában betöltött szerepe ?

Hat fehérje (ANGPTL4, EGFR, Endoglin, FGF2, Serpin E1, és VCAM1)
expressziója az összes rezisztens sejtvonalban megemelkedett

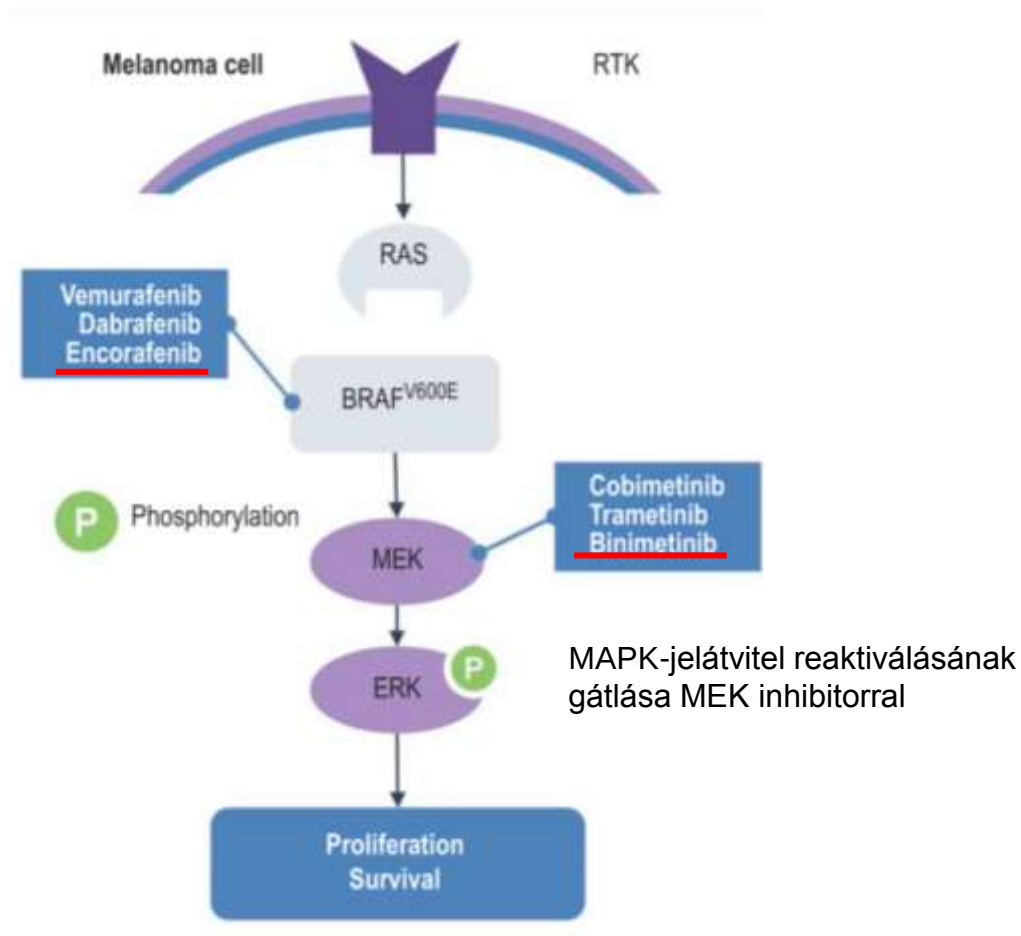
Két fehérje (OPN és a Survivin) expressziója csökkent

„BRAf INHIBITOR MEGVONÁS” HATÁSA A REZISZTENS SEJTEK ÉLETKÉPESSÉGÉRE



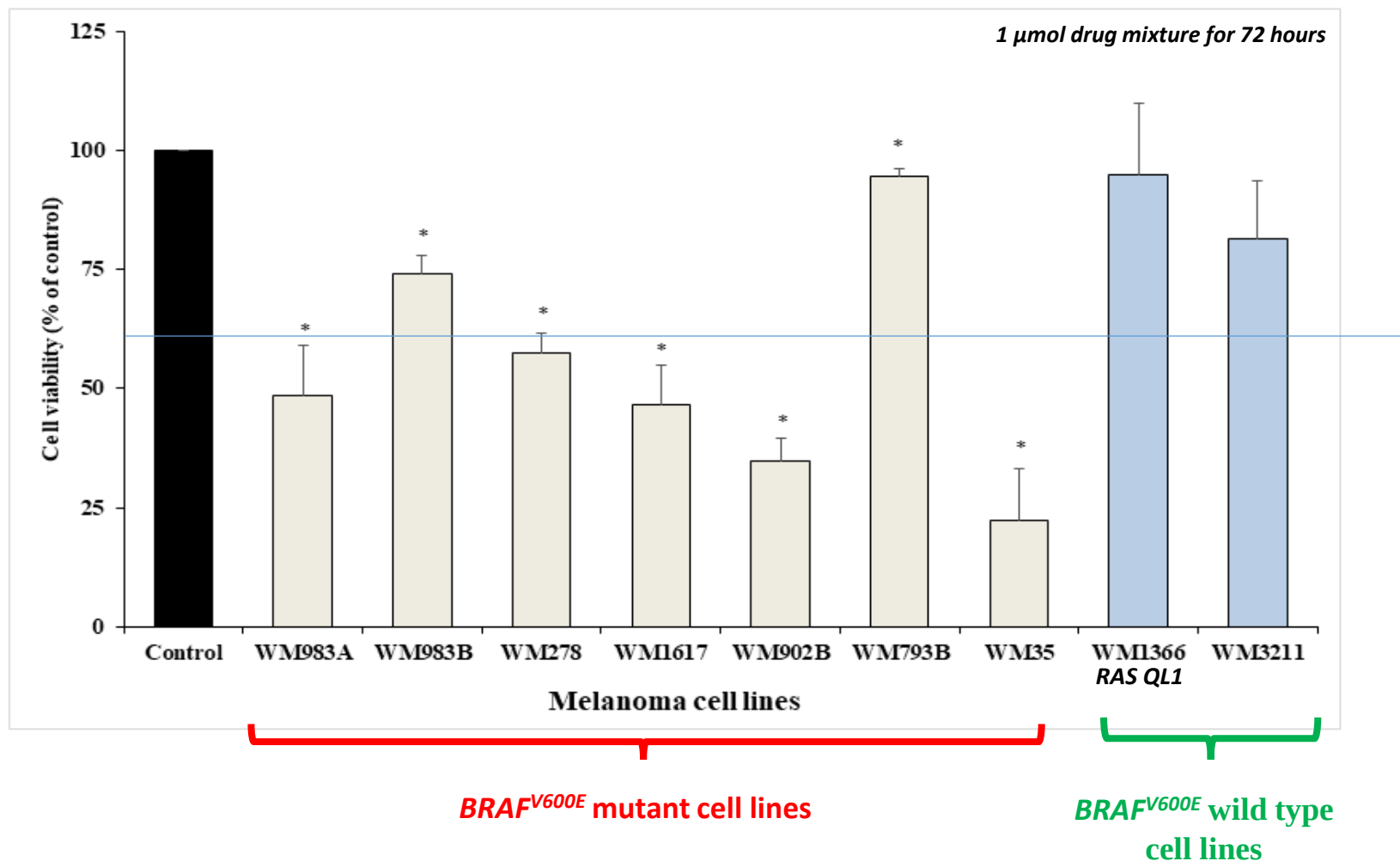
- A rezisztens sejtvonalak a BRAf inhibitor megvonására különböző mértékben reagálnak
- Az eredmények az inhibitorok folyamatos dozírozása helyett a „szüneteltetett” adagolás hatékonysága mellett szólhatnak
- KEZELÉS IDŐTARTAMÁNAK MEGHATÁROZÁSA SZEMPONTJÁBÓL FONTOS MEGFIGYELÉS

Monoterápiával együttjáró rezisztencia prolongálása: kombinált BRAF és MEK inhibitor kezelés



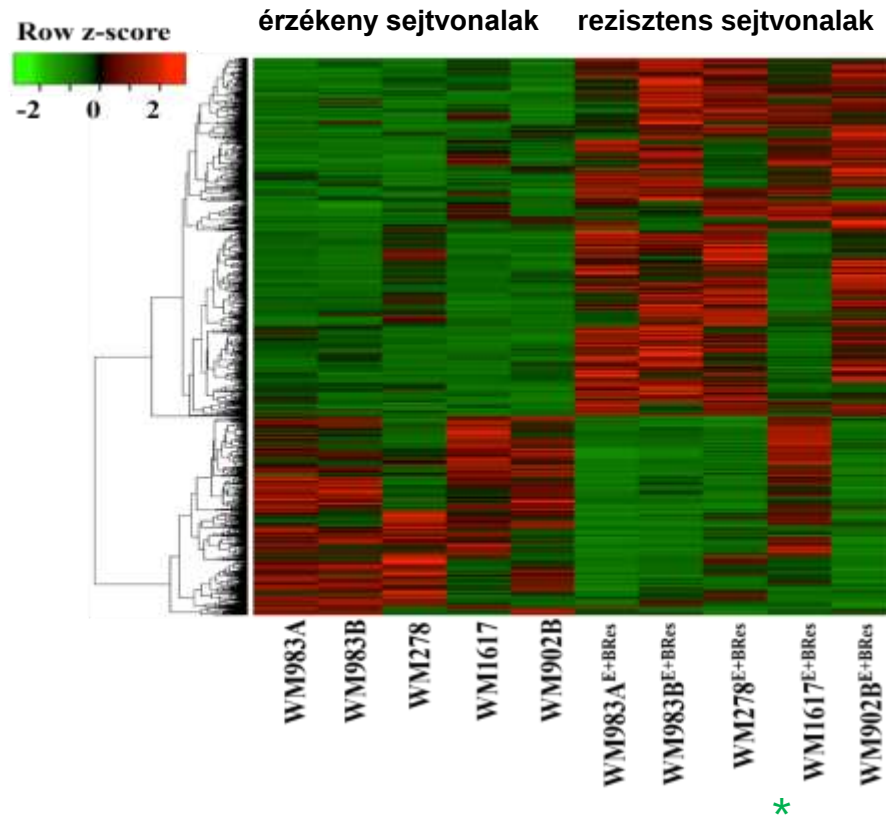
A kombinált BRAF-MEK inhibitor terápiákkal jelentősen meghosszabbítható a molekulárisan célzott kezelésekre kialakult kedvező daganatellenes hatás

Encorafenib + Binimetinib kombinált kezelés hatása melanoma sejtek életképességére *BRAF*^{V600E} mutáns és mutációt nem hordozó melanoma sejtvonalakra



Az életképesség csökkenése nem volt egységes, több mint 30%-os csökkenés a 5 *BRAF* mutációt hordozó sejtvonalnál

KOMBINÁLT KEZELÉS SORÁN KIALAKULÓ GYÓGYSZERREZISZTENCIÁVAL ÖSSZEFÜGGŐ GÉNEXPRESSZIÓS VÁLTOZÁSOK

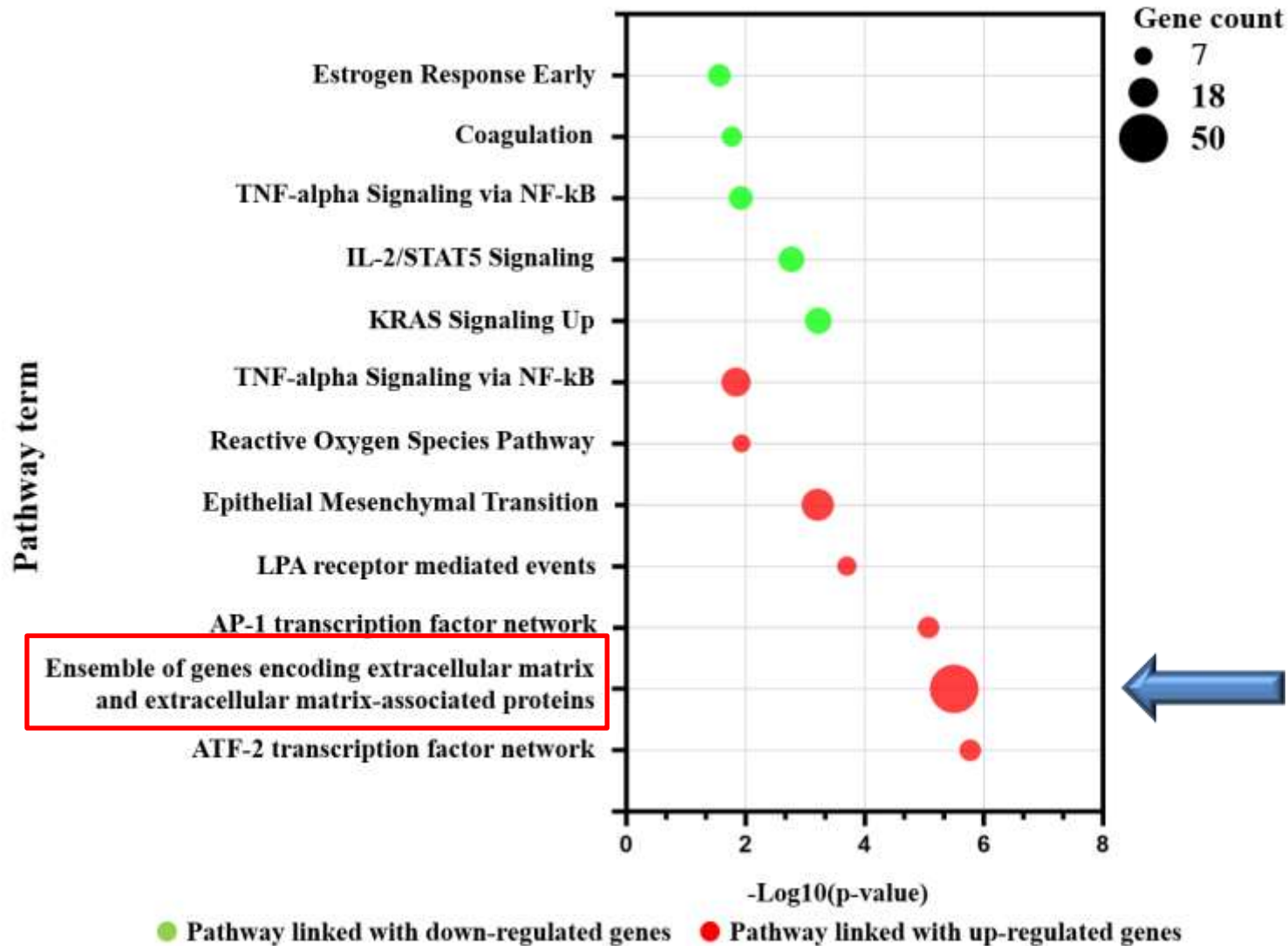


1591 szignifikánsan eltérő gén expressziója a
rezisztens sejtekben

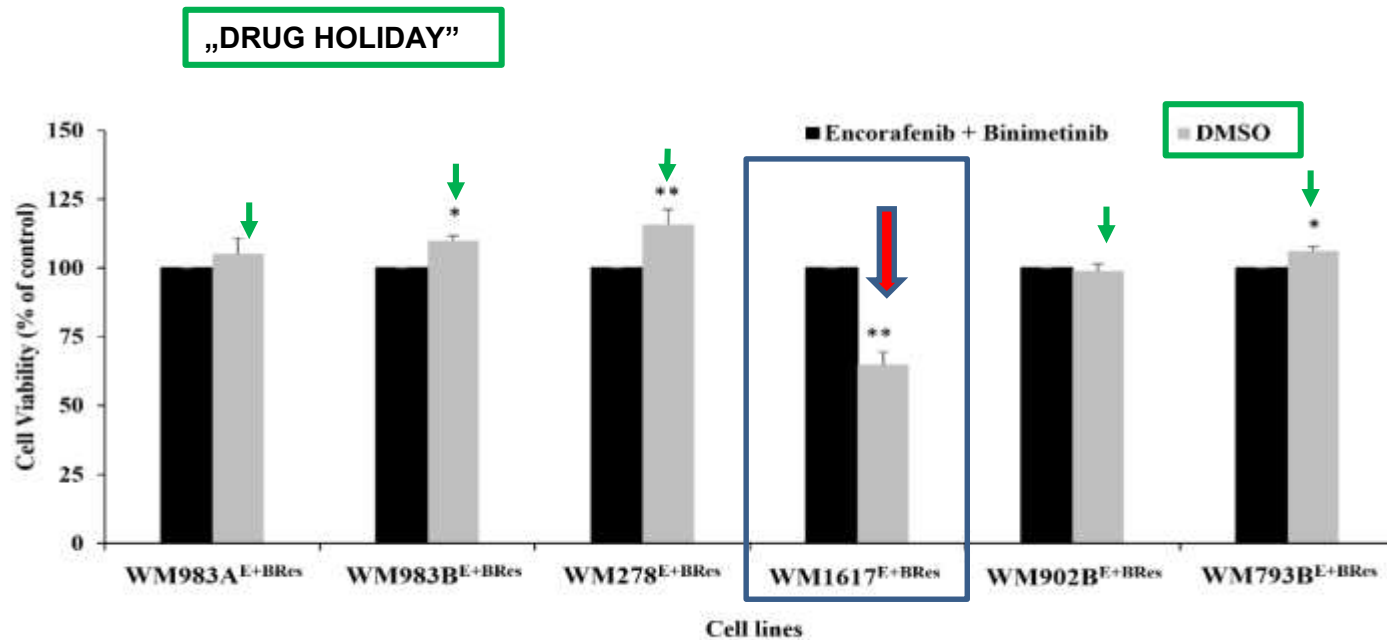
↑ 1024 gén

↓ 567 gén

Jelátviteli útvonala analízis: Eltérően expresszálódó gének a rezisztens sejtvonalakban

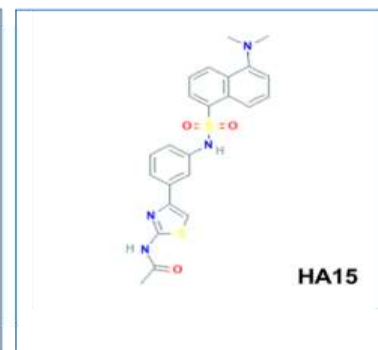
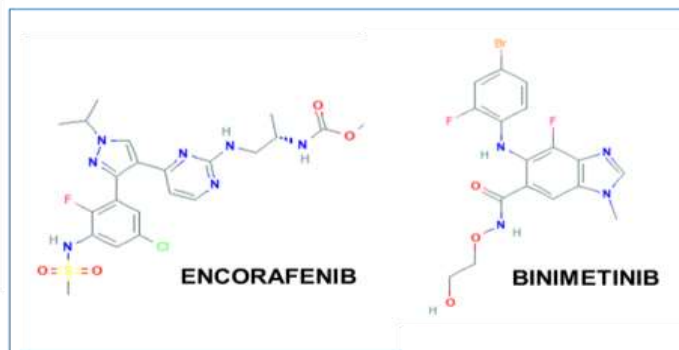
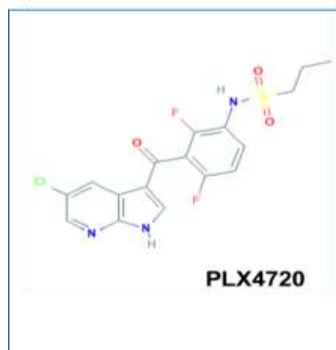


BRAF INHIBITOR ÉS MEK INHIBITOR „MEGVONÁS” HATÁSA A REZISZTENS SEJTEK ÉLETKÉPESSÉGÉRE



A kombinált kezelés szüneteltetése 5 sejtvonalnál proliferáció növekedést, a **WM1617^{E+BRES}** a sejtvonalnál a proliferáció szignifikáns csökkenését eredményezte

1. Folyamatos BRAF és MEK inhibitor kezeléssel $BRAF^{V600E}$ mutáns sejtvonalakból stabil, gyógyszer-rezisztens sejtvonalakat hoztunk létre.
2. A rezisztens sejtek invazivitása megnőtt az eredetileg inhibitor érzékeny sejtekhez képest.
3. Új, BRAFi rezisztenciával összefüggő gén eltéréseket figyeltünk meg.
4. Az inhibitor megvonása **MONOTERÁPIÁNÁL** 3 rezisztens sejtvonalban a sejtek csökkent proliferációját eredményezte, egy sejtvonalnál BRAF-inhibitor “függőség” jött létre.
Gyógyszermegvonás: pozitív klinikai hatás; alternatív jelátviteli útvonal aktiválása
5. **KOMBINÁLT KEZELÉS** szüneteltetése a sejtproliferáció növekedését eredményezte, negatív hatás
6. **EREDMÉNYEK:**
 - Hozzájárulnak a személyre szabott célzott terápiával szemben kialakult rezisztencia molekuláris hátterének megismeréséhez
 - Lehetőséget szolgáltatnak olyan új gyógyszer-kombinációk kifejlesztéséhez, melyek gátolják a rezisztencia kialakulását és így jelentősen megnövelhetik a kezelések hatékonyságát, a betegek túlélését



On the road to cure?

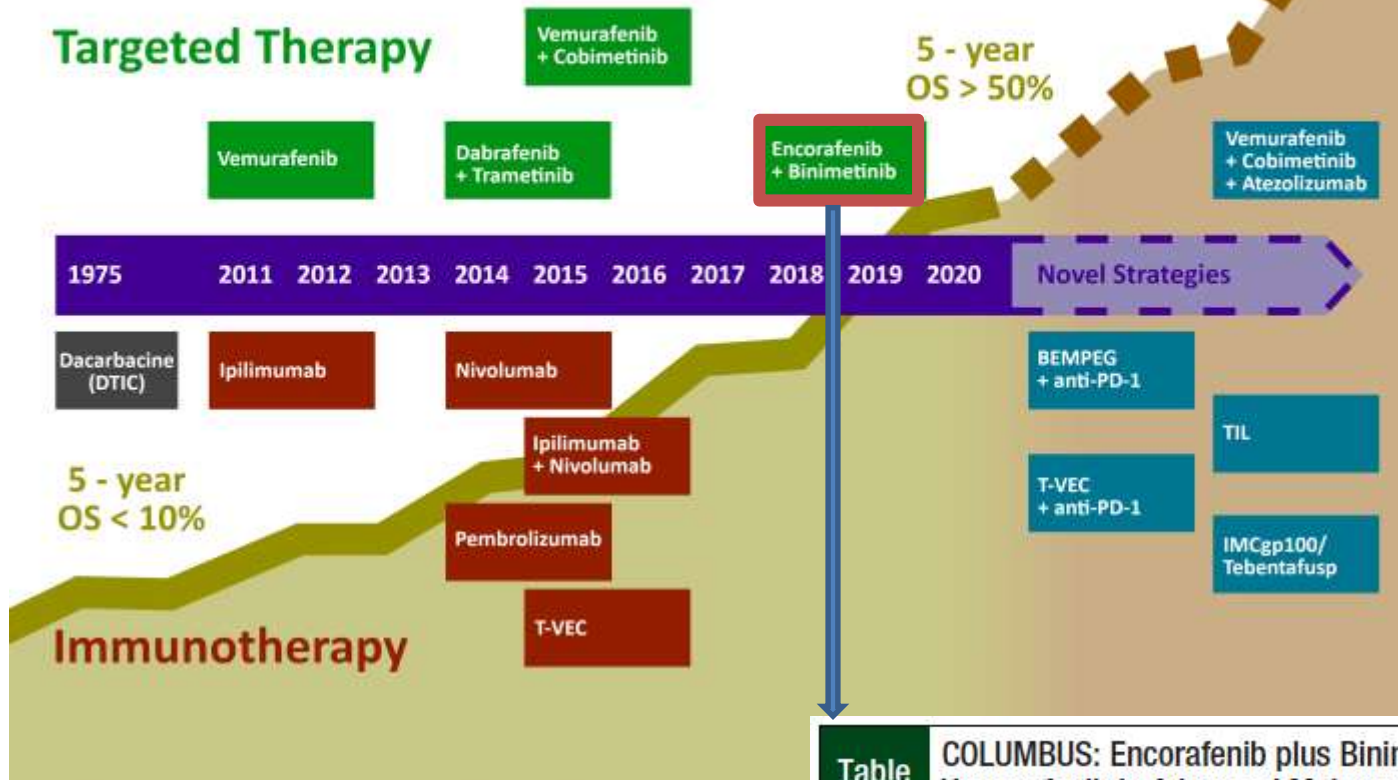


Table	COLUMBUS: Encorafenib plus Binimetinib versus Vemurafenib in Advanced Melanoma with <i>BRAF</i> Mutation	
Efficacy end point	Encorafenib plus binimetinib (N = 192)	Vemurafenib (N = 191)
Overall response rate, %	63 (95% CI, 56-70)	40 (95% CI, 33-48)
Duration of response, mo	16.6 (95% CI, 12.2-20.4)	12.3 (95% CI, 6.9-16.9)
Median progression-free survival, mo	14.9 (95% CI, 11.0-18.5)	7.3 (95% CI, 5.6-8.2)

J. Steining, et al., *Cancers (Basel)* 2021.

R. Dummer, et al., *Lancet Oncol* 2018.

3 Phd fokozat

1. Koroknai V, Szász I, Jámbor K, Balázs M. Cytokine and Chemokine Receptor Patterns of Human Malignant Melanoma Cell Lines. *Int J Mol Sci.* **2022** Feb 28;23(5):2644.
2. Patel V, Szász I, Koroknai V, Kiss T, Balázs M. Molecular Alterations Associated with Acquired Drug Resistance during Combined Treatment with Encorafenib and Binimetinib in Melanoma Cell Lines. *Cancers (Basel).* **2021** Dec 1;13(23):6058
3. Kiss T, Jambor K, Koroknai V, Szász I, Bárdos H, Mokánszki A, Ádány R, Balázs M Silencing Osteopontin Expression Inhibits Proliferation, Invasion and Induce Altered Protein Expression in Melanoma Cells *Frontiers Pathol. Oncol. Res.* **2021.** 05 March.
4. Szász I, Koroknai V, Patel V, Hajdú T, Kiss T, Ádány R, Balázs M.: Cell Proliferation Is Strongly Associated with the Treatment Conditions of an ER Stress Inducer New Anti-Melanoma Drug in Melanoma Cell Lines. *Biomedicines.* **2021**;20;9(2):96.
5. Koroknai V, Patel V, Szász I, Ádány R, Balazs M. Gene Expression Signature of BRAF Inhibitor Resistant Melanoma Spheroids. *Pathol Oncol Res.* **2020** Jul 1. doi: 10.1007/s12253-020-00837-9.
6. Koroknai V, Szász I, Hernandez-Vargas H, Fernandez-Jimenez N, Cuenin C, Herceg Z, Vízkeleti L, Ádány R, Ecsedi S, Balázs M.: DNA hypermethylation is associated with invasive phenotype of malignant melanoma. *Exp Dermatol.* **2020**;29(1):39-50.
7. Szász I, Koroknai V, Kiss T, Vízkeleti L, Ádány R, Balázs M.: Molecular alterations associated with acquired resistance to BRAFV600E targeted therapy in melanoma cells. *Melanoma Res.* **2019**;29(4):390-400.
8. Balázs M, Koroknai V, Szász I, Ecsedi S.: Detection of CCND1 Locus Amplification by Fluorescence In Situ Hybridization. *Methods Mol Biol.* **2018**;1726:85-100.
9. Vízkeleti L, Kiss T, Koroknai V, Ecsedi S, Papp O, Szasz I, Adany R, Balazs M.: Altered integrin expression patterns shown by microarray in human cutaneous melanoma. *Melanoma Res.* **2017**;27(3):180-188.
10. Szász I, Koroknai V, Vízkeleti L, Balázs M. [Molecular background of BRAF inhibitor induced resistance in BRAFV600E mutant melanoma cell lines. *Magy Onkol.* 2021 Jun 3;65(2):149-156. Epub **2021** May 18.

KÖSZÖNÖM A FIGYELMET!

Dr. Ádány Róza
Dr. Koroknai Viktória
Dr. Szász István
Kiss Timea
Jámbor Krisztina
Vikas Patel

Új, anti-melanoma gyógyszerjelölt molekula (HA-15) in vitro karakterizálása

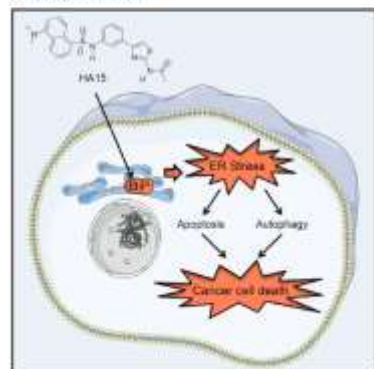


Kérdés: kísérleti körülmények hogyan befolyásolják a kezelés eredményeit

Cancer Cell

Compounds Triggering ER Stress Exert Anti-Melanoma Effects and Overcome BRAF Inhibitor Resistance

Graphical Abstract



Authors

Michaël Cerezo, Abdelali Lehnak, Antoine Millet, ..., Robert Ballotti, Rachid Benhida, Stéphane Rochoy

Correspondence

benhida@unice.fr (R.B.),
srochoy@unice.fr (S.R.)

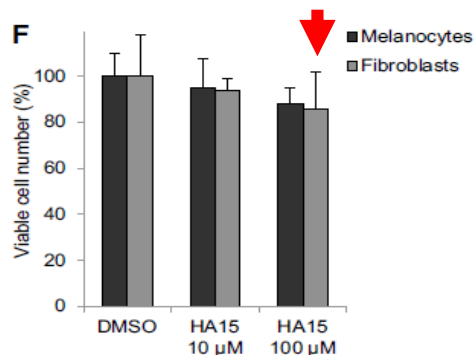
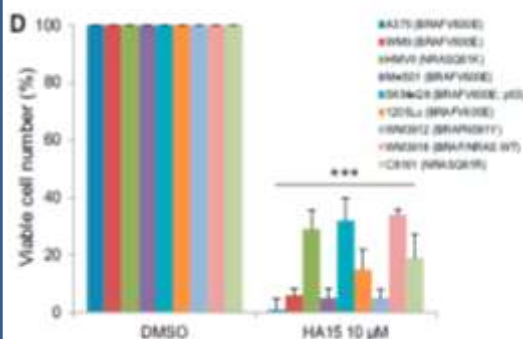
In Brief

Cerezo et al. show that HA15, the lead compound of a series of thiazole benzoxasulfonamides that they have developed, kills cancer cells by targeting BIP to increase ER stress. HA15 exhibits strong efficacy in melanoma cells, including those resistant to BRAF inhibitors.

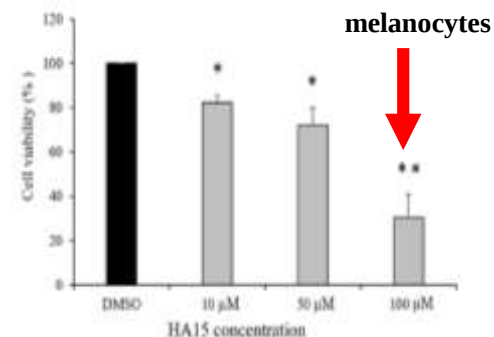
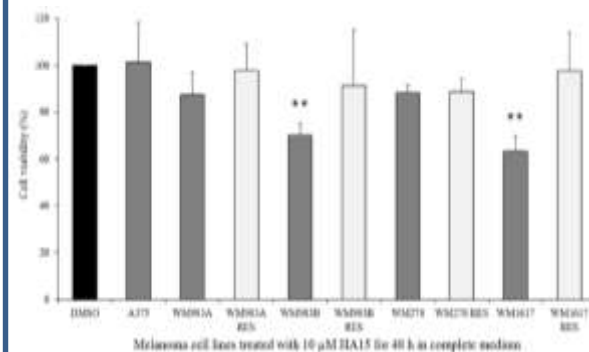
Article

HA15 a HSPA5/BiP fehérje (az unfolded protein response (UPR) fő szabályozó fehérjéje) működését gátolja

Irodalmi adatok

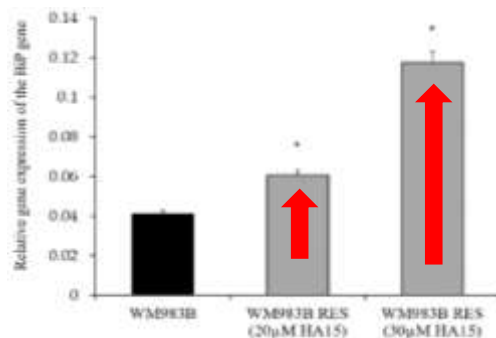
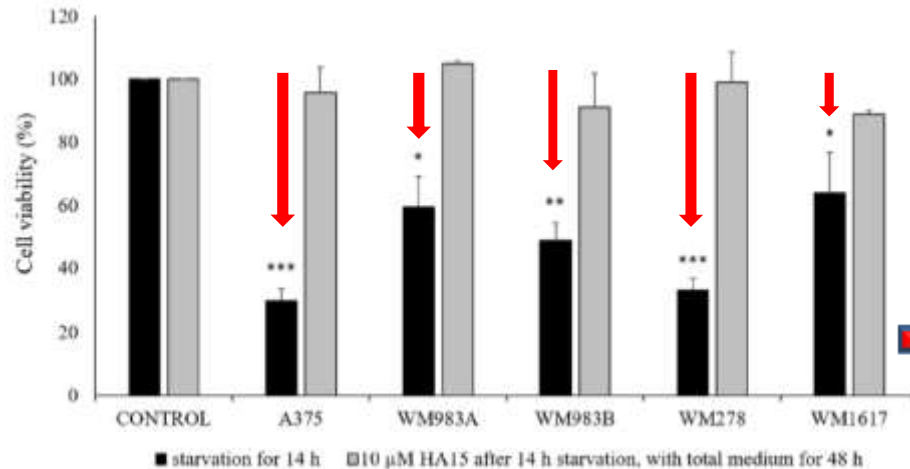


Saját eredmények



AZ ÚJ GYÓGYSZERJELÖLT MOLEKULA ÖNMAGÁBAN NEM OKOZ ANTI-MELANOMA HATÁST

Irodalomban alkalmazott kísérleti körülmények: FBS megvonás a sejtek életképessége a HA15 nélkül is csökken



BiP gén expresszió szignifikáns emelkedése a rezisztens sejtekben

➤ Az irodalmi adatokkal ellentétben

➤ a HA15 kezelés nem okozza a melanoma sejtek életképességének szignifikáns csökkenését

➤ A gyógyszer által kiváltott „anti-melanoma” hatás a kísérleti körülményeknek és nem kizárólagosan a HA15 hatásával kapcsolatos

➤ Sikerült HA15 rezisztens sejtvonalat létrehozni

➤ Az ER stressz és az autofágia markerek kvantitatív mérése alapján a HA15 nem önmagában váltja ki az ER stresszt.

➤ Ugyanakkor a HA15 célfehérje (BiP) fokozott expresszióját figyeltük meg a rezisztens sejtvonalakban, ami arra utal, hogy a BiP gén szerepet játszhat a HA15 rezisztencia kialakulásában.

BiP: HSPA5 (Heat shock 70kDa protein 5) (Immunoglobulin heavy-chain-binding protein)

Characteristics of human melanoma cell lines

Cell lines	Sex/age (years)	Origin ^a	Growth Phase ^b	Histologic Type ^c	BRAF mutation status ^d	NRAS status mutation status ^e
WM983A ^{p1}	Male/54	Primary	VGP	NM	V600E	wt
WM983B ^{m1}	-	Metastasis	-	-	V600E	Wt
WM278 ^{p1}	Female/62	Primary	VGP	NM	V600E	wt
WM1617 ^{m1}	Female/62	Metastasis	-	-	V600E	wt
WM902B	Female	Primary	VGP	SSM	V600E	wt
WM793B	Male/37	Primary	RGP/VGP	SSM	V600E	wt
WM35	Female/24	Primary	RGP/VGP	SSM	V600E	wt
WM1366	Male/79	Primary	VGP	-	wt	61L
WM3211	Male/74	Primary	RGP	SSM	wt	wt

^atumor type of melanomas which the cell lines were derived from, ^bVGP: vertical growth phase, ^cNM: nodular melanoma, ^dV: valine, E: glutamic acid, ^ewt: wild type, ^pprimary tumour derived cell line with metastatic pair from the same patient, ^mmetastatic pair of primary derived cell line

GYÓGYSZERREZISZTENS SEJTVONAL MODELRENDSZEREK

Cell line	Origin ^a	Growth Phase ^b	Histologic Type ^c	BRAF mutation status ^d	NRAS mutation status ^e
WM983A ^{p1}	primary	VGP	NM	V600E	wt
WM983A ^{PLX4720RES}	primary	VGP	NM	V600E	wt
WM983B ^{m1}	metastasis	-	-	V600E	wt
WM983B ^{PLX4720RES}	metastasis	-	-	V600E	wt
WM278 ^{p2}	primary	VGP	NM	V600E	wt
WM278 ^{PLX4720RES}	primary	VGP	NM	V600E	wt
WM1617 ^{m2}	metastasis	-	-	V600E	wt
WM1617 ^{PLX4720RES}	metastasis	-	-	V600E	wt
WM983B ^{HA15RES}	metastasis	-	-	V600E	wt
A375	primary	-	-	V600E	wt

^atumor type of melanomas which the cell lines were derived from; ^bVGP: vertical growth phase; ^cNM: nodular melanoma, n.d.: no data; ^dV: valine, E: glutamic acid; ^ewt: wild-type; ^{p1, p2}primary tumor derived cell line with metastatic pair from the same patient; ^{m1, m2}metastatic pair of primary derived cell line