

Helena Isabel Martins Pópulo

Porto, 2011

Abstract/Resumo

Relevance of mTOR pathway in the initiation/progression of human tumours

Relevância da via de sinalização do mTOR na iniciação/progressão de
tumores humanos



Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto

Abstract

The conserved serine/threonine kinase mTOR (the mammalian target of rapamycin), a downstream effector of the PI3K/AKT pathway, is a major regulator of survival, growth, proliferation and motility, in response to mitogens, energy and nutrient levels. mTOR is an attractive therapeutic target, as it is a member of a pathway in which deregulation of multiple elements (PI3K amplification/mutation, PTEN loss of function, AKT overexpression, and S6K1 and eIF4E amplification/overexpression) has been reported in many types of cancers. mTORC1 inhibitors, including the rapamycin analogues deforolimus, everolimus and temsirolimus, are undergoing clinical trials for treating multiple cancers, alone or in combination with inhibitors of other pathways.

Cutaneous melanoma represents less than 5% of all skin cancer but is responsible for the majority of skin cancer-related deaths. Ocular melanoma is the most common primary eye tumour in adults, and accounts for approximately 5% of all melanomas. Despite new diagnostic and therapeutic tools, the overall survival of patients treated for melanoma did not improve and most patients die of metastatic disease. Indeed, metastatic melanoma remains one of the malignancies most resistant to treatment. Therefore, clarification of the molecular mechanisms underlying the etiopathogenesis of ocular and cutaneous melanoma may help tailoring therapy and determining the prognosis of patients harbouring melanomas.

In view of the possible involvement of the mTOR pathway in melanoma development, as well as its potential role as a therapeutic target, in this thesis we aimed to determine whether the mTOR pathway is activated in ocular and cutaneous melanoma tumours, if it correlates with MAPK pathway activation and if the expression of mTOR pathway proteins can have prognostic value. In addition, we tested *in vitro* the effect of mTOR pathway inhibitors in the behaviour of ocular and cutaneous melanoma cell lines.

Our results showed that the mTOR pathway is activated and interconnected with MAPK pathway activation both in ocular and in cutaneous melanomas. BRAF mutations are the most prevalent genetic alteration in cutaneous melanoma whereas in uveal melanoma are GNAQ mutations, being both genetic alterations unrelated with clinical prognostic features, which points to an early event in melanoma development. The mTOR pathway activation seems to be linked to genetic alterations of the MAPK pathway, namely BRAF, since in cutaneous melanoma an association between BRAF mutations and higher mTOR

pathway activation was found. Moreover, higher PI3K/AKT/mTOR pathway effectors expression seems to be associated with worse prognosis in both locations (ocular and cutaneous melanoma), particularly pAKT Thr308 expression that associates with shorter disease-free survival in uveal melanoma and pS6 Ser235/236 expression that associates with shorter overall and disease-free survival in cutaneous melanoma. The association between higher mTOR pathway activation and BRAF mutations, and the lack of association with GNAQ mutational status were confirmed *in vitro*, where we also found an association between BRAF mutations and higher tumour cells sensitivity to mTOR inhibition.

In conclusion, our results suggest that inhibition of mTOR (alone or in combination with MAPK pathway inhibition) may benefit patients with melanoma and pS6 Ser235/236 expression and BRAF mutational status might help in the stratification of melanoma patients, respectively as prognostic and therapy predictive markers.

Resumo

O mTOR (mammalian target of rapamycin) é uma cínase serina/treonina, que pertence à via de sinalização PI3K/AKT. Desempenha um papel central como regulador de sobrevivência, crescimento celular, proliferação e motilidade, funcionando como um sensor da mitogénese, nível de energia e nutrientes. O mTOR constitui um bom alvo terapêutico, porque as alterações da sua via são comuns em cancros humanos (amplificação/mutação da PI3K, perda de função do PTEN, sobreexpressão do AKT e amplificação/sobreexpressão do S6K1 e eIF4E). Os inibidores do mTORC1, incluindo os análogos da rapamicina deforolimus, everolimus e temsirolimus, estão a ser testados em ensaios clínicos, isoladamente ou combinados com outros inibidores de outras vias de sinalização, como terapêuticas para vários tipos de cancro.

O melanoma cutâneo constitui menos de 5% de todos os cancros da pele, sendo no entanto responsável pela maioria das mortes causadas por cancros cutâneos. O melanoma ocular é o tumor primário ocular mais frequente e constitui aproximadamente 5% de todos os melanomas. Apesar dos novos sistemas de diagnóstico e terapêuticas, a taxa de sobrevivência dos pacientes com melanoma não aumentou e muitos pacientes morrem devido a melanoma metastático, que é resistente aos tratamentos disponíveis. A clarificação dos mecanismos moleculares envolvidos na etiopatogénese do melanoma ocular e cutâneo poderá auxiliar na selecção da terapia adequada e na determinação do prognóstico dos pacientes com melanoma.

Admitindo o possível envolvimento da via mTOR no desenvolvimento de melanoma, assim como a possibilidade desta via permitir identificar novos alvos terapêuticos, pretendemos nesta tese esclarecer se a via mTOR está activada no melanoma ocular e cutâneo, se esta activação se associa com a activação da via de sinalização das MAPK e se a expressão de proteínas desta via terá valor prognóstico. Pretendeu-se também testar *in vitro* o efeito de inibidores de mTOR no comportamento de linhas celulares de melanoma ocular e cutâneo.

Os resultados obtidos indicam que a via do mTOR está activada e ligada à activação da via das MAPK nos melanomas ocular e cutâneo. As mutações do BRAF constituem as alterações genéticas mais frequentes no melanoma cutâneo, enquanto no melanoma uveal as alterações genéticas mais frequentes são as mutações do GNAQ. Não identificamos relação entre as mutações de ambos os genes e parâmetros clinico-patológicos, o que

parece indicar que estas mutações são eventos iniciais no desenvolvimento dos melanomas. A activação da via do mTOR parece estar ligada a alterações genéticas da via da MAPK, nomeadamente do BRAF, já que identificamos uma associação entre a presença de mutações do BRAF e uma activação maior da via do mTOR. Identificamos também uma associação entre a expressão aumentada das moléculas da via PI3K/AKT/mTOR e o prognóstico pior dos pacientes, tanto em melanoma ocular como em melanoma cutâneo. Verificamos que a expressão da pAKT Thr308 se associa com a sobrevida livre de doença em pacientes com melanoma da uvea e a expressão da pS6 Ser235/236 se associa com a sobrevida global e a sobrevida livre de doença em pacientes com melanoma cutâneo. A associação entre a maior activação da via do mTOR e a presença de mutações do BRAF e a não associação desta via com o estado mutacional do GNAQ foi confirmada em estudos *in vitro*, onde também se observou uma associação entre mutações do BRAF e uma maior sensibilidade de linhas celulares tumorais à inibição da via do mTOR.

Os nossos resultados sugerem que a inibição do mTOR (isoladamente ou combinada com a inibição da via da MAPK) poderá ser benéfica em pacientes com melanoma, e que a expressão de pS6 Ser235/236 e o estado mutacional do BRAF podem ser úteis na estratificação dos pacientes, podendo ser usados, respectivamente, como marcadores de prognóstico e preditivos da resposta terapêutica.