

特约综述



邵焕杰, 陕西师范大学生命科学学院教授。本课题组重点开展以下两方面的研究: (1) 中药单体抗肿瘤作用及机制研究, 针对癌症发生发展的特性, 利用体内外肿瘤模型, 对我国中药材中有效成分单体的抗肿瘤作用机制及应用开发进行研究; (2) 脂肪酸代谢异常促癌症发生发展的作用及机制研究。脂肪酸代谢异常与癌症的发生发展密切相关, 对癌症细胞脂肪酸异常代谢与癌症发生发展间的关系进行研究, 可为肿瘤的检测及治疗提供新的靶标。

*Kras*突变与肿瘤发生及治疗

李鹏飞[#] 詹益红[#] 祁苗 闫小慧 邵焕杰^{*}

(陕西师范大学生命科学学院, 西安 710119)

摘要 RAS蛋白是一类与GTP/GDP结合并具有GTP水解酶活性的小G蛋白。作为分子开关, RAS通过结合GTP而激活下游MAPK及PI3K-AKT等信号通路, 从而调控细胞生长、增殖、分化和凋亡等生命过程, 其突变与癌症发生发展密切相关。KRAS是RAS家族中最常见的突变类型。*Kras*突变将导致其丧失GTP水解酶活性, 从而持续激活下游信号通路, 促使细胞增殖失控而癌变; 同时, *Kras*突变是肿瘤细胞的维持生长增殖所必需条件, 也是肿瘤获得性耐药的关键原因之一。然而迄今为止, 临床上尚无有效治疗*Kras*突变肿瘤的药物, 探索针对*Kras*突变肿瘤的有效治疗策略与方法也成为近年来的研究热点。该文从KRAS的功能、信号通路、突变与肿瘤的关系及目前*Kras*突变肿瘤的不同治疗策略和研究现状进行简要综述。

关键词 *Ras*; KRAS; 突变; 肿瘤治疗

Kras Mutation in Tumorigenesis and Cancer Therapy

Li Pengfei[#], Zhan Yihong[#], Qi Miao, Yan Xiaohui, Shao Huanjie^{*}

(College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China)

Abstract RAS proteins belong to a superfamily of small GTPase that act as molecular switch to control cell growth, proliferation, senescence and apoptosis by activating multiple downstream signaling pathways, including MAPK and PI3K-AKT. The mutation of RAS is tightly correlated with tumorigenesis. KRAS is the

陕西省自然科学基金(批准号: 2016JM8102)、中央高校基本科研业务资助项目(批准号: GK201603062)和大学生创新项目(批准号: 2016CSY013、2017CSY017)资助的课题

[#]共同第一作者

^{*}通讯作者。Tel: 029-85310266, E-mail: hshao@snnu.edu.cn

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shaanxi Province (Grant No.2016JM8102), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No.GK201603062) and the Innovation Fund for Graduate Students (Grant No.2016CSY013, 2017CSY017)

[#]These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding author. Tel: +86-29-85310266, E-mail: hshao@snnu.edu.cn

网络出版时间: 2018-01-29 17:28:37

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180129.1728.006.html>

isoform most frequently mutated in RAS-driven cancers. Once mutated, KRAS will lose its GTP hydrolase activities and continues to activate its downstream signals, thereby driving tumorigenesis. The existence of *Kras* mutant is not only necessary for tumor maintenance, but one of the key mechanisms of tumor acquired drug resistance. Therefore, KRAS is a useful drug target for cancer therapy. Unfortunately, up to now, there are still no effective pharmacological inhibitors of KRAS developed in clinic. Exploring the effective treatment strategies and methods for *Kras* mutant tumors has become a hot research topic in recent years. Here, we briefly review the functions of KRAS, its downstream signaling pathways, the relationship between *Kras* mutation and tumorigenesis, and the current treatment strategies of *Kras* mutations.

Keywords *Ras*; KRAS; mutation; tumor therapy

作为分子开关, RAS通过与GTP或GDP结合的相互转换来控制生长因子和细胞因子等激发的信号在细胞中的传递,从而调控细胞的生长、增殖、分化和凋亡等生命活动。在肿瘤的发生发展中, KRAS是RAS家族中最常见的突变类型,如在胰腺导管腺癌中,其突变频率高达97.7%。一旦*Kras*发生突变,则将丧失GTP水解酶的活性,从而持续活化,促使细胞增殖失控而癌变。由于*Kras*在肿瘤组织及细胞中的高突变率及其对维持肿瘤细胞生长所必需的特性, KRAS成为肿瘤治疗的有效作用靶点。但由于KRAS本身的结构特点,迄今为止临床上尚未开发出有效治疗*Kras*突变肿瘤的药物,因此,探索针对*Kras*突变肿瘤的有效治疗策略与方法也一直是本领域的研究热点。本文将从*Ras*的发现及其结构功能、KRAS下游信号通路、*Ras*突变类型及其与肿瘤的关系和目前针对*Kras*突变肿瘤的治疗策略等方面作一简要综述。

1 *Ras*的发现及其结构功能

*Ras*是首个被发现的人类原癌基因,其有三个家族成员: *Hras*、*Kras*和*Nras*^[1]。*Hras*和*Kras*是从大鼠肉瘤急性反转录病毒中分离得到的,可使NIH/3T3细胞发生恶性转化。*Nras*则是在人神经母细胞瘤DNA感染NIH/3T3细胞时发现的,但它与病毒无关。*Hras*、*Kras*和*Nras*分别定位在人11、12和1号染色体上^[2]。三种*Ras*基因编码四种蛋白亚型: HRAS、KRAS4A、KRAS4B和NRAS。这些蛋白前165个氨基酸几乎具有相同的序列^[3],只有在C-端的25个氨基酸有差异。如图1所示,在结构和序列上,三者都含有五个外显子:一个非编码外显子和四个编码外显子,编码产生的蛋白含有188或189个氨基酸,且相对分子质量为21 kDa,因此也称为P21蛋白(P21ras)。

RAS作为一类小G蛋白,具有GTP水解酶活性,定位于胞质膜内侧,通过与GTP/GDP的不同结合而调控其活性。当它与GTP结合时即被活化(开),而当与GDP结合时则处于非活化状态(关)。RasGTP激酶在许多信号网络中是至关重要的,它们具有信号整合的作用并将信号传递至下游效应器,参与细胞运动、细胞骨架组装、囊泡以及核运输等生命活动,进而调控细胞增殖、分化、衰老和凋亡等生命过程^[4]。因此, RAS蛋白被视为细胞信号传递中的重要分子开关蛋白。

2 KRAS下游信号通路

KRAS是RAS家族的重要成员且自身具有高突变率,一直备受关注。目前,对KRAS下游效应途径研究较多的是RAF-MEK-ERK、PI3K-AKT及RalGDS-Ral等信号通路。

2.1 RAF-MEK-ERK信号通路

作为有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路之一, RAS-RAF-MEK-ERK信号通路是控制细胞生长、增殖、分化和凋亡的众多信号通路中的关键性通路^[5],可调节不同类型细胞的周期进程以及凋亡,通路中的信号分子突变常与人类癌症发生密切相关^[6],针对信号通路中关键分子而研发的抑制剂也被广泛运用于临床癌症治疗。该通路由生长因子、有丝分裂原、抗原受体或GPCR(guanosine-binding protein coupled receptor)等激活,将胞外信号传递入细胞核内。当GTP取代GDP与KRAS结合时, KRAS被激活, GTP结合的KRAS将RAF(rapidly accelerated fibrosarcoma)募集到质膜并激活RAF蛋白激酶,包括CRAF、BRAF和ARAF。活化的RAF将磷酸化双特异性激酶MEK1和MEK2的丝氨酸/苏氨酸残基,进而导致MEK的激活。MEK作

为一种双特异性蛋白激酶,能进一步磷酸化ERK的苏氨酸和酪氨酸残基而使之激活。被激活的ERK既能磷酸化细胞溶质信号蛋白,包括p90核糖体S6激酶(ribosomal s6 kinase, RSK)以及MAPK相关的丝氨酸/苏氨酸激酶(MAPK-interacting serine/threonine kinase, MNK),又能转至细胞核内,直接激活cAMP反应结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)、c-Jun、c-Fos等转录因子,从而调控细胞生长、增殖和分化^[7]。

2.2 PI3K-AKT通路

磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, PI3K)也是KRAS的下游效应因子,可受RAS的作用而被激活,参与细胞增殖、分化、凋亡和葡萄糖转运等多种细胞功能的调节。激活的PI3K催化细胞质膜上的二磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP₂)转化而生成三磷酸磷脂酰肌醇(PIP₃),为细胞内含有PH结构域的信号蛋白AKT和磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1(phosphoinositide dependent kinase 1, PDK1)等在质膜上提供了停泊位点,促使PDK1磷酸化AKT的Thr308,同时,PDK2磷酸化AKT的Ser473,从而完全激活AKT^[8-9]。活化的AKT通过磷酸化激活多种下游的酶、激酶和转录因子等,进而调节细胞的功能。AKT能对下游多种靶蛋白进行磷酸化而发挥抗凋亡作用。AKT磷酸化Bcl-2家族成员BAD(B-cell lymphoma 2-associated agonist of cell death),使其与14-3-3结合而阻止其激活细胞凋亡^[10-11]。此外,AKT可介导MDM2(mouse double minute 2 homolog)蛋白Ser166和Ser186的磷酸化,增加MDM2的核易位并促进p53的泛素化和降解,进而促进细胞周期转变和存活^[12]。除了通过激活AKT等靶蛋白来调控细胞生存外,PI3K还能通过Rac(Ras-related C3 botulinum toxin)/Cdc42(cell division control protein 42 homolog)等来调控细胞骨架运动^[13]。

2.3 RalGDS-Ral通路

鸟嘌呤解离刺激因子(Ral guanine nucleotide dissociation stimulator, RalGDS)家族的所有成员都是RAS的效应分子,它们在RAS的下游起作用,并且与RAS或RAS家族成员的GTP活性形式相关。RalGDS是RAS家族的小GTP酶——Ral的GTP/GDP交换因子(guanine exchange factor, GEF),能促进Ral从GDP到GTP的转换。在这一过程中,RalGDS充

当了连接RAS和Ral的桥梁^[14]。此外,已知能激活RAS的生长因子,如表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)或胰岛素,也以RAS依赖的方式导致Ral的快速活化^[15]。Ral蛋白的潜在下游靶标包括Cdc42/Rac和磷脂酶D(phospholipases D, PLD)等。研究表明,Cdc42能够促进细胞G₁期和S期的有序进展^[16]。另外,Cdc42还能够激活JNK和p38,参与细胞的生长和增殖调控^[17]。

3 *Ras*突变与肿瘤发生

3.1 *Ras*基因突变种类、类型

原癌基因*Ras*被激活以后就变成有致癌活性的癌基因。*Ras*基因激活的方式有三种:点突变、过表达、插入激活。其中,*Ras*基因被激活最常见的方式就是点突变,*Ras*原癌基因主要通过点突变的方式而起致癌作用。目前已发现,151种不同的*Ras*点突变,主要集中在12、13位甘氨酸以及61位谷氨酰胺的突变。据统计,在*Hras*中,这三种点突变的比例由高到低分别为G12、Q61、G13,在*Kras*中则是G12、G13、Q61,*Nras*中为Q61、G12、G13^[18]。由此可见,G12点突变最为常见,G12突变在*Kras*和*Hras*中占主导地位。在*Kras*突变中,现已发现G12存在15种不同的点突变,包括G12A、G12D、G12F、G12K、G12N、G12S、G12V、G12Y、G12C、G12E、G12I、G12L、G12R、G12T和G12W。其中,G12D突变约占G12全部突变的41%,G12V约占28%,G12C约占14%^[19]。Q61突变在*Nras*中有优势,而*Hras*中12和61位的突变比例相近。

3.2 *Ras*突变在不同肿瘤类型中的分布

*Ras*突变是促进多种癌症发生的一个重要原因,常出现在肿瘤发生早期。突变的RAS蛋白对GTP酶激活蛋白具有不敏感性并且被组成型激活。这些激活的RAS蛋白引起无刺激的过度信号,导致不受控制的细胞生长及增殖。据统计,*Ras*突变频率最高的5种癌症分别是胰腺导管腺癌、结直肠癌、多发性骨髓瘤、肺癌和皮肤黑色素瘤,突变频率分别为97.7%、52.2%、42.6%、32.2%和29.1%^[20]。值得注意的是,在这些*Ras*突变中,*Kras*的突变频率明显高于其他两种突变。例如,在胰腺导管腺癌中,*Kras*的突变率高达97.7%,而*Nras*和*Hras*则全部为0。而在结直肠癌中,52.2%的*Ras*突变率中*Kras*突变率高达44.7%。反过来,*Kras*和*Nras*则被认为在多发性

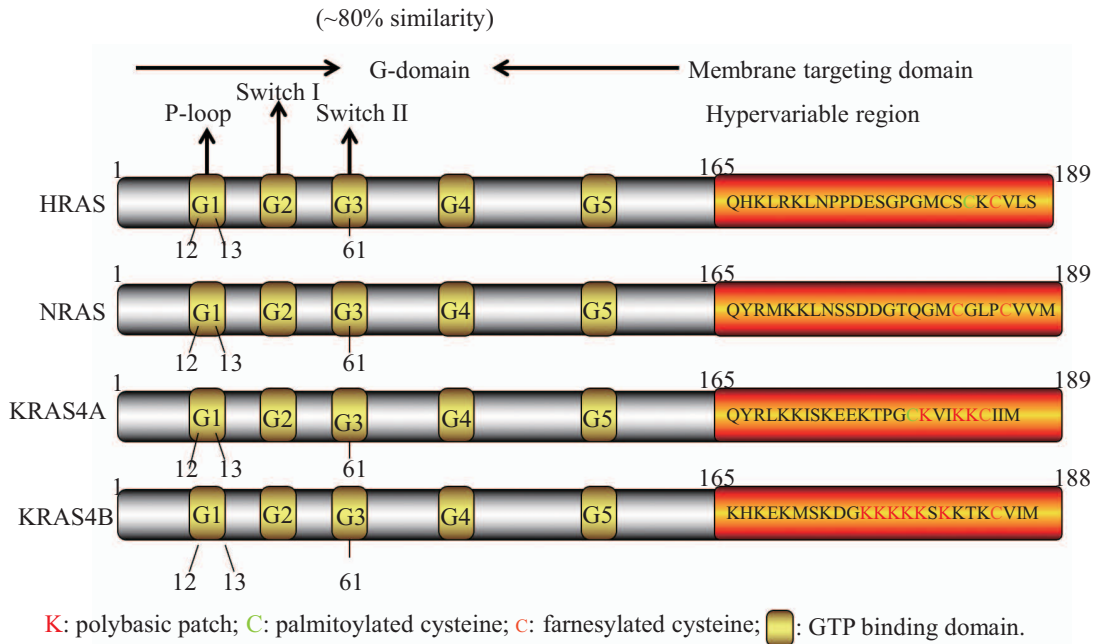


图1 RAS蛋白的两个功能区域: G结构域和膜靶向域

Fig.1 The two functional domains of RAS proteins: the G domain and the membrane targeting domain

骨髓瘤中突变频率相同, 而*Nras*在皮肤黑色素瘤和急性骨髓性白血病中是主要突变基因。*Hras*突变主要集中在膀胱癌以及头颈鳞状细胞癌^[21]。在对非小细胞肺癌的研究中发现, *Ras*突变多发生于密码子12上, 最常见的是G12C点突变, 其次是G12V和G12D^[22]。

3.3 *Kras*突变与肿瘤的发生发展

*Kras*基因的激活突变与人类恶性肿瘤的发生发展及肿瘤的复发密切相关。遗传和生物化学研究证明, KRAS依赖性信号传导在调节多种癌细胞生长、增殖、侵袭和转移中具有重要作用。研究发现, 在非小细胞肺癌中, 高加索患者*Kras*突变的患病率为20%~30%^[23]。同时有研究表明, *Kras*突变与性别、年龄等存在一定相关性; *Kras*突变在女性和年龄较小的患者中发生更频繁^[24]。在对结直肠癌患者一项研究中也发现, *Kras*突变同样更易发生在女性和年龄较小的患者中^[25]。然而, 另一个关于结肠癌的临床研究则表明, 年龄在50岁以上的患者中*Kras*突变率高于年龄在50岁以下的患者^[26]。同时, 病理学的研究显示, *Kras*突变在肺腺癌患者尤其是浸润性黏液性腺癌中更为常见^[27]。

吸烟状态也与*Kras*突变的存在及突变类型相关。Ahrendt等^[28]使用等位基因特异性连接法对原发性肿瘤中的*Kras*突变进行检测, 106例肺腺癌患者中

有92例(87%)为吸烟者, 因此相比于非吸烟者, *Kras*突变在吸烟患者中更常见。另有研究报道, 烟草诱导的优先突变型是密码子12上G>T突变, 相比之下, 密码子13则是不容易被烟草诱导的突变位点^[29]。在非吸烟者中, Riely等^[30]发现, 非吸烟者12个突变中有10个是G12D突变, 没有密码子13突变。此外, 他们的研究还发现, 非吸烟者的突变通常是G>A突变而不是G>T或G>C的转换^[30]。

在病人预后上, KRAS也被视为是一种标记物。在非小细胞肺癌患者中, *Kras*突变患者相比*Kras*野生型患者有更短的生存期, 特别是含有G12C点突变的患者^[31]。此外, 特殊的密码子突变与病人的存活期也有关, 譬如G12V突变会影响病人预后。然而这一说法存在一定争议。Keohavong等^[32]研究发现, 带有G12V突变的患者相比于其他突变患者而言, 总体生存期变短。而Cserepes等^[33]的研究正好相反, G12V突变的肺腺癌患者对基于铂类化合物的化疗有更好的治疗效果, 尽管效果不显著, 但相比于其他G12位点突变有更好的预后效果。另有研究表明, 在结直肠癌中, *Kras*密码子13的突变对病人存活期以及存活率有不利影响^[34]。但是这一说法也存在争议, Abubaker等^[35]在对含有*Kras*突变的结直肠癌患者样本进行研究时发现, 密码子12位点突变的患者5年总体存活率明显小于密码子13突变以及*Kras*野生

型病人。尽管在*Kras*突变与肿瘤病人关系的研究中已发现不同位点的突变与不同肿瘤类型等存在一定的相关性,但针对预后以及二者间确切的关系仍然有争议。对于*Kras*不同突变位点的预后及靶向治疗问题,仍然需要进一步研究。

4 *Kras*突变肿瘤治疗策略

4.1 直接靶向抑制突变的*Kras*

*Kras*突变导致其蛋白质构型发生改变并丧失GTP水解酶活性,与GTP分子结合后持续激活下游信号通路,促进细胞不断生长、增殖。最初,尝试采用竞争性抑制GTP与KRAS的结合来达到抑制KRAS活性的目的^[36]。然而,GTP与RAS家族蛋白的结合能力非常高,再加上药物自身覆盖率的局限性和RAS蛋白相对平滑的构型,很难找到一种有效的竞争性抑制剂。SCH-53239是被报道的经过核磁共振第一个设计出来抑制鸟嘌呤核苷酸互换的化合物^[37],此后在此基础上,又设计出了多种化合物。然而,这些化合物都带有羟胺,其毒性太强且代谢稳定性差,作用效果并不理想^[38]。

进一步研究发现,法尼基转移酶(farnesyltransferase)在RAS与质膜内表面关联的功能上起了关键作用,于是尝试通过限制这种酶来达到抑制RAS活性的目的。由于3种RAS在结构和序列方面的差异不显著,导致研究人员误以为它们的功能特性等也类似,因而最初的功能研究只是偏向性地针对于最容易操作的HRAS而忽略了KRAS和NRAS,致使在临床上出现*Kras*和*Nras*突变的肿瘤患者并没有得到治愈^[39-40]。法尼基转移酶抑制剂R1155777在治疗*Kras*突变的非小细胞肺癌的临床II期研究结果显示,虽然法尼基转移酶的活性被抑制,但并没有表现出很好的临床效果。进一步研究表明,在使用法尼基转移酶抑制剂后,KRAS和NRAS蛋白会被选择性地香叶酰化修饰,而RAS蛋白的这种修饰会促进肿瘤细胞的增殖^[41]。

在针对直接抑制KRAS活性的其他研究中,直接靶向结合KRAS封闭其功能域的策略也被提出。文献报道,对于*Kras*的G12C突变体,ARS853特异靶向*Kras*^{G12C}的结合口袋与交换口袋,从而显著降低KRAS结合GTP的水平,并降低KRAS的磷酸化水平以及抑制KRAS与下游信号分子的相互作用^[42]。目前对于其在KRAS突变肿瘤的应用仍在研究中。

与此同时,研究表明,通过RNA干扰(RNAi)的方法靶向野生型*Kras*,在肺癌和结直肠癌中能显著抑制肿瘤细胞生长^[43]。由于通过直接电穿孔或生物聚合物将RNAi递送至肿瘤组织具有局限性,尤其是难以将RNAi递送至胰腺。因此,靶向KRAS的治疗中,如何解决RNAi的递送成为一个难点。外泌体的发现与研究为RNAi的靶向递送提供了可能。外泌体是细胞产生并分泌的细胞外囊泡,并天然存在于血液中。研究显示,将正常成纤维细胞样的间充质细胞分泌的外泌体工程化,并包裹针对*Kras*^{G12D}突变体的siRNA或shRNA进行递送,与脂质体相比,工程化的外泌体(iExosomes)能够在体内有效靶向*Kras*^{G12D},为直接靶向治疗*Kras*突变肿瘤提供了可靠的方法^[44]。

4.2 作用于KRAS效应信号通路

直接靶向KRAS存在诸多难以克服的问题,另一个肿瘤治疗策略是靶向抑制KRAS相关信号通路,例如下游的信号分子RAF、MEK等,如图2所示,通过阻断其下游信号分子的激活,从而达到抑制KRAS的目的。然而,由于*Kras*突变的肿瘤细胞也往往伴有其他信号分子的突变,如*PIK3CA*(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha)、*PTEN*(gene of phosphate and tension homology deleted on chromosome ten)、*TP53*(tumor protein p53)等,这些信号分子在肿瘤的发生发展中也起了重要的作用;且由于细胞内信号通路调控的复杂性,单一抑制RAS及其下游信号通路往往引发其他信号通路的补偿性激活而导致肿瘤耐药,使得治疗到达一个瓶颈期^[45]。

4.2.1 RAF-MEK-ERK的抑制 RAF是KRAS的直接下游效应分子,靶向抑制RAF成为阻断KRAS的信号传递的首选。威罗菲尼(Vemurafenib)和达拉非尼(Dabrafenib)是ATP竞争性RAF抑制剂,已被批准用于*BRAF*突变的转移性黑色素瘤的治疗^[46]。然而,临床研究发现,RAF抑制剂不但不能抑制ERK的活性,反而使其显著激活,从而导致RAS突变肿瘤病人的耐药^[47-49]。究其原因,RAF的抑制导致了MEK被反馈激活,使肿瘤细胞的凋亡调控被抑制。所以,通过直接抑制RAF来治疗*Kras*突变肿瘤很难达到很好的临床效果^[50]。因此,靶向抑制更下游的激酶MEK来治疗*Kras*突变肿瘤成为一个新的选择。

司美替尼(Selumetinib, AZD6244)是第二代

MEK1/2抑制剂,能特异性地抑制MEK1/2的直接底物ERK1/2的磷酸化从而抑制细胞生长^[51]。在治疗*Kras*突变的非小细胞肺癌的临床研究中,对含有*Kras*的G12V或G12C位点突变的病人往往有很好的疗效^[52]。另外,临床III期研究中,司美替尼联用多烯紫杉醇对比临床上单用多烯紫杉醇,有效提高了*Kras*突变肿瘤病人的客观缓解率,但总生存期和无进展生存期并不存在显著差异^[53]。另一个在*Kras*突变的非小细胞肺癌中起良好作用的MEK抑制剂是曲美替尼(Trametinib)。曲美替尼是一种新型有效的MEK激酶抑制剂,以ATP非竞争性的方式抑制MEK1和MEK2。据报道,曲美替尼对多种肿瘤异种移植模型都具有很好的抗肿瘤活性,能有效地抑制ERK1/2的磷酸化,从而抑制肿瘤细胞生长^[54]。在对*Kras*突变的非小细胞肺癌的临床II期研究中,与多烯紫杉醇相比较,对于无进展生存期具有相似的影响。其他抑制剂(如GDC-0623)通过作用于MEK从而抑制RAF活化。GDC-0623能诱导BRAF和CRAF与MEK的二聚化,稳定RAF-MEK复合物,也通过抑制BRAF-CRAF异二聚体的形成和质膜RAF易位,从而抑制RAF活化,在治疗*Kras*突变的肿瘤治疗中已经进行到临床I期^[55]。

此外,由于*Ras*突变型癌细胞对RAF抑制的先天气或获得性耐药机制通常是由于ERK的反馈激活而引起的,因此,一个有效的策略就是联用ERK抑制剂,如MK-8353,可以有效解决在*Kras*突变肿瘤中使用BRAF抑制剂和MEK抑制剂导致的ERK激活,并且在临床治疗中效果显著^[56]。

4.2.2 PI3K-AKT-mTOR的抑制 *Kras*突变的肿瘤往往也伴随着其他关键信号分子的突变,比如*PIK3CA*或*PTEN*。PI3K信号通路往往能独立于RAS-MEK-ERK信号通路而促进肿瘤细胞生长。因此,针对*Kras*突变型肿瘤,有报道将其分为KRAS依赖型肿瘤和KRAS非依赖型肿瘤, KRAS依赖型肿瘤主要依赖于KRAS直接相关信号通路存活,在阻断RAF-MEK-ERK信号通路后,能达到较好的治疗效果。但是对于KRAS非依赖型肿瘤,肿瘤细胞则可以通过其他信号通路继续得以生存^[57-58]。研究表明,在*Kras*突变的结肠癌的治疗中沉默*Kras*可以有效抑制ERK的激活,但并不影响PI3K-AKT信号通路的活化^[59]。于是有实验小组在研究含有*Kras*^{G12D}和*PIK3CA*双突变的肿瘤治疗时提出同时抑制MEK和PI3K的策略,实验

表明,共抑制MEK和PI3K对KRAS非依赖型肿瘤产生了显著的协同效果^[60]。基于之前的研究,在治疗*Kras*突变肿瘤的策略中,共抑制RAF-MEK-ERK和PI3K-AKT-mTOR这两条信号通路往往达到更好的临床治疗效果。在一项临床I期实验中,采用PI3K抑制剂GDC-0941联合MEK抑制剂GDC-0973来治疗病人,其中含有*Kras*突变的非小细胞肺癌病人,对其作出很好的应答^[61]。另一项临床I期实验中,患者同时接受司美替尼和AKT抑制剂MK-2206的联合治疗,23%的非小细胞肺癌患者得到了有效的治疗,显示出了双药联合优良的协同效果^[62]。而mTOR抑制剂Panobinostat联合吉非替尼靶向作用于TAZ(tafazzin),同样有效防止*Kras*突变肿瘤对吉非替尼产生的耐药^[63]。

4.2.3 靶向抑制JAK-STAT3信号通路 近年来,对于信号传导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)的研究日益增多,有报道称,在原发性肿瘤中可以检测到磷酸化STAT3的高表达,而STAT3的激活被认为是多种肿瘤产生耐药和不良预后的关键因素之一^[64]。研究表明,在*Kras*突变的非小细胞肺癌和部分结肠癌中,MEK受到抑制时,将反馈激活STAT3,从而使肿瘤产生耐药,因此利用JAK抑制剂Ruxolitinib抑制JAK活性,进而降低STAT3的磷酸化水平能显著提高MEK抑制剂的抗肿瘤效果^[65]。在*Kras*突变的胰腺癌中,靶向抑制MEK虽然短期内能达到很好的肿瘤治疗效果,但同样由于STAT3的代偿性激活,使肿瘤产生耐药。因此,为了达到对于*Kras*突变的胰腺癌更好的治疗效果,常采用共抑制MEK-ERK和STAT3的策略^[66]。

目前对于STAT3在肿瘤中的作用存在争议,之前研究认为,STAT3是一个促肿瘤生存的因子,但近期有文章报道,在*Kras*突变的肺癌中,STAT3有意想不到的肿瘤抑制作用。研究显示,在*Kras*突变的非小细胞肺癌中,STAT3通过在胞质中结合NF- κ B(nuclear factor- κ B)来调控NF- κ B诱导的白介素-8的表达,抑制白介素-8介导的髓样肿瘤浸润和肿瘤血管化,从而抑制肿瘤的进展^[67]。进一步临床数据分析表明,STAT3的表达与病人生存期呈现正相关^[67]。因此,STAT3与KRAS下游信号通路间的关系以及STAT3在*Kras*突变肿瘤的发生发展及治疗中的作用机制还需要深入探讨。

4.2.4 抑制HSP90 热休克蛋白90(heat shock

protein 90, HSP90)是普遍存在于细胞内具有高度保守性和高度活性的蛋白质,通过多分子伴侣复合物可以稳定作用蛋白的构象,从而避免其泛素化降解,进而影响了许多癌基因信号通路。小鼠肿瘤模型数据显示,抑制HSP90的活性可以对*Kras*突变肿瘤起到很好的治疗效果^[68],然而使用HSP90抑制剂应用在临床的治疗效果却并不显著,HSP90的抑制剂Ganetespib在治疗*Kras*突变的非小细胞肺癌时,往往反馈激活ERK-p90RSK-mTOR信号通路,使肿瘤产生耐药。因此,同时靶向抑制HSP90和p90RSK成为一个治疗KRAS突变肿瘤的新策略^[69]。

4.3 作用合成致死位点

鉴于KRAS蛋白难以直接靶向,合成致死策略被提了出来。两个或多个非致死性的基因同时缺陷导致肿瘤细胞死亡的现象即为合成致死。在肿瘤细胞中如果存在特定基因的突变,只要抑制其合成致死搭档,就可以特异性杀伤肿瘤细胞。这种方法可以特异性靶向癌细胞,相比于传统方法毒性更小,且更加有效。利用合成致死的方法治疗*Kras*突变的肿瘤,目的在于同时抑制KRAS的下游活性通路和反馈调控通路,从而达到抑制肿瘤细胞生长的治疗效果。

利用*Kras*野生型和突变型的肠癌细胞中进行siRNA筛选, Costa-Cabral等^[70]发现,细胞周期蛋白依赖性激酶1(cyclin dependent kinase 1, CDK1)的抑制对含*Kras*突变的肿瘤细胞具有合成致死作用,并进一步在26个肠癌和胰腺肿瘤细胞模型中进行了确认,证明*Kras/CDK1*合成致死适用于具有氨基酸12位点(G12V、G12D、G12S)或13位点(G13D)突变的肿瘤细胞。结果显示,利用CDK抑制剂AZD5483处理*Kras*突变肿瘤细胞,将使细胞显著阻滞于G₀/G₁期^[70]。

STK33(serine/threonine kinase 33)是丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员,在调节诸如DNA复制、信号转导、细胞增殖、分化、凋亡及肿瘤发生发展等细胞活动中发挥重要作用。Scholl等^[71]利用高通量RNAi文库筛选发现,STK33是KRAS依赖型肿瘤细胞生长必需的一个合成致死位点,对KRAS依赖型肿瘤细胞生长具有关键作用。研究表明,STK33通过调控S6K1的活性,促使促凋亡因子BAD(B-cell lymphoma 2-associated agonist of cell death)磷酸化失活来抑制肿瘤细胞凋亡。KRAS/STK33合成致死可以有效治疗KRAS依赖型肿瘤细胞,但对于KRAS非依赖型肿瘤细胞却没有相应的效果。

随着研究的深入,一系列的合成致死位点被发现,例如,与细胞周期及染色体稳定相关的XKLP2(kinesin family member 15 L homeolog)、PLK1(polo like kinase 1)、APC/C(anaphase-promoting complex/cyclosome)、Proteasome等,与细胞存活相关的Survivin、Bcl-xL(B-cell lymphoma-extra large)和WT1(wilms tumor 1),与转录相关的GATA2(GATA binding protein 2)、SNAIL2(snail family transcriptional repressor 2)等以及与生存信号相关的TBK1(TANK binding kinase 1)和TAK1(TGF-beta activated kinase 1)。对以上这些合成致死位点的发现和研究都为*Kras*突变肿瘤的治疗提供了新的策略与选择^[72]。

4.4 靶向代谢通路

肿瘤生长需要大量的能量和大分子合成的前体物质,与之相适应,肿瘤细胞的能量代谢通路与正常细胞相比被重新编程以满足肿瘤细胞快速生长的需要^[73-75]。根据肿瘤的类型和遗传背景,癌基因通过不同信号通路来改变肿瘤细胞的代谢^[76]。因此,*Kras*突变肿瘤的代谢信号通路与正常细胞代谢信号通路之间的差异为*Kras*突变肿瘤的治疗提供了依据。

肿瘤发生过程中癌基因调控了细胞的代谢,并将糖酵解作为其主要产能方式^[77]。研究证明,*Kras*突变能通过提高肿瘤细胞葡萄糖的摄取、增加葡萄糖中间产物、重编谷氨酰胺代谢、增加自噬等方式来增加糖酵解^[78-79],RAF-MEK-ERK信号通路在*Kras*突变肿瘤中对其代谢起到了主要调控作用。在含有*Kras*^{G12D}突变的胰腺癌代谢通路研究中,用MEK抑制剂AZD8330处理胰腺癌细胞后发现,控制己糖胺通路(hexosamine biosynthetic pathway, HBP)中的限速酶谷氨酰胺果糖-6-磷酸转氨酶1(glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1, GFPT1)和磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)非氧化阶段调控酶核糖-5-磷酸异构酶A均显著下调。但用雷帕霉素(Rapamycin)处理癌细胞后,mTOR信号通路被抑制却未能对细胞的糖代谢产生显著影响。同时,抑制上游的PI3K-AKT信号通路也不能引起KRAS驱动的胰腺癌中糖代谢的变化。所以在*Kras*^{G12D}突变的胰腺癌中,KRAS主要通过MAPK信号通路调控葡萄糖合成代谢中的上述关键酶来控制糖代谢,促进转录进程^[80]。虽然目前没有这些酶的抑制剂,但以上

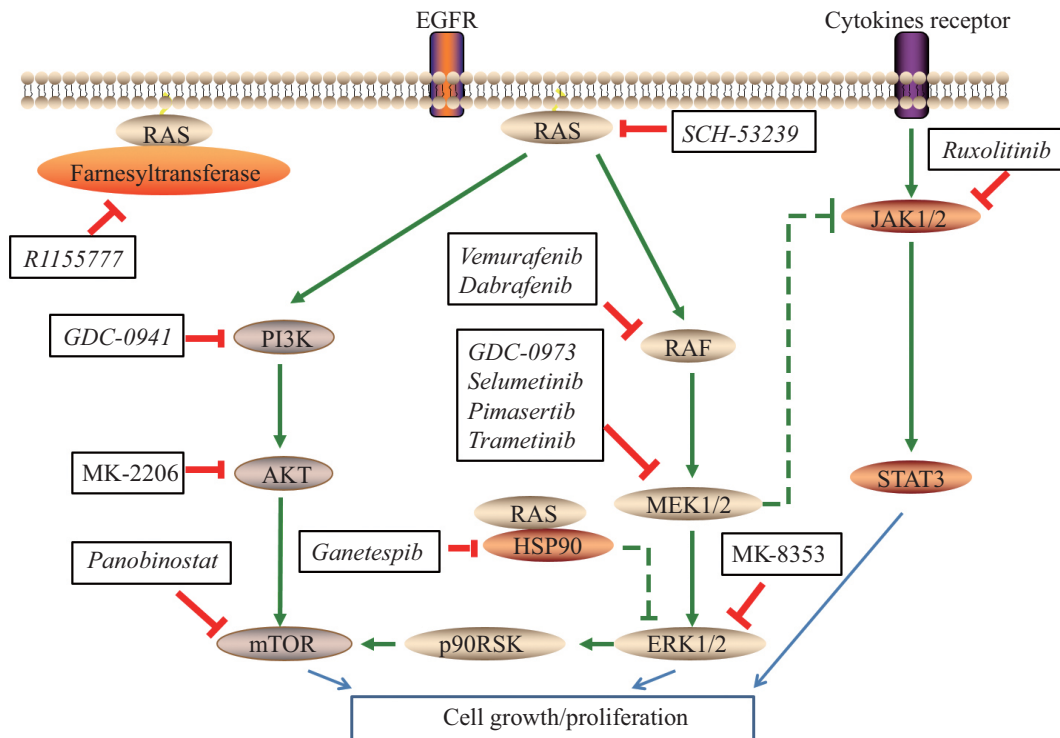


图2 KRAS信号通路中的抑制剂

Fig.2 Inhibitors of KRAS effector signaling

研究为KRAS相关信号通路介导葡萄糖合成代谢中的转录和代谢的变化提供了一个潜在的治疗方案。

Brunelli等^[81]对分别过表达三种Kras突变(G12C、G12D、G12V)的非小细胞肺癌细胞系与未过表达的野生型细胞系(WT)的代谢产物谱进行分析,结果显示, Kras突变肿瘤细胞中的代谢产物谱与野生型的相比发生了显著变化,包括氨基酸代谢、脂类合成代谢、抗氧化通路等。除了苯丙氨酸和色氨酸,蛋白合成代谢通路中的差异代谢物的表达水平在Kras突变组中都明显下降。谷氨酸代谢通路中的谷氨酰胺、谷胱甘肽、天冬氨酸、脯氨酸等相关代谢物的表达水平也在Kras突变细胞中明显下降。而在分析与糖酵解是否有关时,代谢组数据和细胞外乳酸含量检测都显示没有显著变化,表明相对于糖酵解,这些Kras突变型肿瘤组织细胞的主要能量来源是通过谷氨酰胺分解。不同Kras突变型的代谢产物谱变化有差别,这为Kras突变型肿瘤的治疗带来了新的方向^[81]。同时研究发现,在Kras突变的肺癌细胞中,KRAS调控脂肪酸代谢主要是通过上调ACSL3(acyl-CoA synthetase long chain family member 3)来完成的,这个分子促进了癌细胞的脂肪酸摄取、中性脂的积累以及脂肪酸 β 氧化。在Kras突变的细胞中抑

制ACSL3可导致ATP耗竭,进而引起肺癌细胞死亡。ACSL3在Kras突变型肺癌病人组织中呈现高表达,这也为靶向代谢信号通路治疗Kras突变肿瘤提供了新证据^[82]。

4.5 免疫治疗

Rosenberg博士等^[83]在一项结直肠癌免疫疗法的研究中发现了一个靶向致癌蛋白的新方法。该研究小组从肿瘤患者肺部肿瘤结节分离出了靶向Kras^{G12D}突变的肿瘤浸润淋巴细胞并将其体外扩增后回输到患者体内,患者的七个转移性肺结节消退持续了九个月其中一个产生病变,经鉴定病变是由于缺失了6号染色体中的一段,包括一个抗原呈递基因HLA-C*0802(human leukocyte antigen, HLA),使免疫细胞无法识别癌细胞。所以这一研究首次证明,过继T细胞转移免疫疗法可以对Kras^{G12D}突变的肿瘤起到很好的疗效。目前,在其他Kras突变的肿瘤细胞中这种免疫疗法也在被尝试应用。

另外,利用免疫检查点阻断的免疫治疗也是Kras突变肿瘤治疗的一种潜在有效策略。吴一龙教授课题组^[84]研究发现, Kras突变肺腺癌病人在同时含有TP53(tumor protein p53)突变时,其PD-L1(programmed death-1 ligand 1)的表达相较于TP53或

*Kras*单一突变的肿瘤细胞显著升高,提示*TP53/Kras*双突变患者可能更适合免疫治疗。临床数据也初步证实,PD-1阻断免疫治疗对*TP53/Kras*双突变的患者具有更好的治疗效果。因此,对*Kras*突变肿瘤进行研究,探索*Kras*突变与PD-L1表达上调间的关系有助于推动*Kras*肿瘤患者的免疫治疗进展。

5 总结与展望

*Kras*突变与肿瘤的发生发展密切相关。鉴于KRAS本身的结构特点,长期以来,KRAS被称为“不可靶向(undruggable)”或“难以靶向(difficult to target)”的肿瘤治疗靶点。近年来,随着对KRAS突变体的结构及其下游信号通路研究的深入,针对*Kras*突变肿瘤的治疗新策略被不断提出,从直接靶向特定*Kras*突变体药物的开发到间接抑制KRAS下游信号通路的临床检测、从合成致死位点的探索发现再到免疫治疗的相关尝试等都显示,我们对*Kras*突变肿瘤的研究与治疗在不断前进。虽然这些策略与方法在临床前研究中都有很好的作用效果,但其应用到临床治疗上还存有一系列安全性等方面的挑战。目前临床上还存在疗效相关检测标志物的缺乏、不同病人的肿瘤异质性问题,这些也都是从临床前转换到临床研究所亟需解决的问题。

同时,*Kras*突变肿瘤治疗中潜在的肿瘤获得性耐药也是需要考虑的问题。DePinho博士研究组^[85]发现,在*Kras*^{G12D}突变所诱发的肿瘤中敲除*Kras*,部分肿瘤细胞可通过上调YAP1(Yes-associated protein 1)的表达促使肿瘤细胞不依赖于KRAS而存活,从而导致肿瘤复发。因此,在对*Kras*突变肿瘤治疗的药物开发研究中,我们同样需要对KRAS非依赖型肿瘤细胞发生及发展的特性进行研究,未雨绸缪,实现对*Kras*突变肿瘤持久的抗肿瘤作用。另外,尽管目前肿瘤免疫治疗尚存在诸多问题,但其在肿瘤治疗的作用中也愈来愈突显。有证据表明,*Kras*能调节人免疫系统从而逃避宿主的免疫监测^[86-87]。对此问题进一步深入研究,也将为探索合理的*Kras*突变肿瘤治疗提供线索。

参考文献 (References)

- 1 Barbacid M. ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 779-827.
- 2 Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6): 459-65.
- 3 Tsai FD, Lopes MS, Zhou M, Court H, Ponce O, Fiordalisi JJ, *et al.* K-Ras4A splice variant is widely expressed in cancer and uses a hybrid membrane-targeting motif. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(3): 779-84.
- 4 Fernandez-Medarde A, Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer* 2011; 2(3): 344-58.
- 5 Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000; 351 Pt 2: 289-305.
- 6 Chang F, Steelman LS, Shelton JG, Lee JT, Navolanic PM, Blalock WL, *et al.* Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol* 2003; 22(3): 469-80.
- 7 De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets* 2012; 16 Suppl 2: S17-27.
- 8 Papadimitrakopoulou V. Development of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors and their application in personalized therapy for non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012; 7(8): 1315-26.
- 9 Kilic U, Caglayan AB, Beker MC, Gunal MY, Caglayan B, Yalcin E, *et al.* Particular phosphorylation of PI3K/Akt on Thr308 via PDK-1 and PTEN mediates melatonin's neuroprotective activity after focal cerebral ischemia in mice. *Redox Biol* 2017; 12: 657-65.
- 10 Koh PO. Ferulic acid prevents the cerebral ischemic injury-induced decrease of Akt and Bad phosphorylation. *Neurosci Lett* 2012; 507(2): 156-60.
- 11 Masters SC, Fu H. 14-3-3 proteins mediate an essential anti-apoptotic signal. *J Biol Chem* 2001; 276(48): 45193-200.
- 12 Abeyrathna P, Su Y. The critical role of Akt in cardiovascular function. *Vascul Pharmacol* 2015; 74: 38-48.
- 13 Versteeg HH, Hoedemaeker I, Diks SH, Stam JC, Spaargaren M, van Bergen En Henegouwen PM, *et al.* Factor VIIa/tissue factor-induced signaling via activation of Src-like kinases, phosphatidylinositol 3-kinase, and Rac. *J Biol Chem* 2000; 275(37): 28750-6.
- 14 Yoshizawa R, Umeki N, Yanagawa M, Murata M, Sako Y. Single-molecule fluorescence imaging of RalGDS on cell surfaces during signal transduction from Ras to Ral. *Biophys Physicobiol* 2017; 14: 75-84.
- 15 Ferro E, Trabalzini L. RalGDS family members couple Ras to Ral signalling and that's not all. *Cell Signal* 2010; 22(12): 1804-10.
- 16 Olson MF, Ashworth A, Hall A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G₁. *Science* 1995; 269(5228): 1270-2.
- 17 Khosravi-Far R, Campbell S, Rossman KL, Der CJ. Increasing complexity of Ras signal transduction: involvement of Rho family proteins. *Adv Cancer Res* 1998; 72: 57-107.
- 18 Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res* 2012; 72(10): 2457-67.
- 19 Hobbs GA, Wittinghofer A, Der CJ. Selective targeting of the KRAS G12C mutant: kicking KRAS when it's down. *Cancer Cell* 2016; 29(3): 251-3.
- 20 Albertini AF, Raoux D, Neumann F, Rossat S, Tabet F, Pedetour F, *et al.* Detection of RAS genes mutation using the Cobas(R) method

- in a private laboratory of pathology: Medical and economical study in comparison to a public platform of molecular biology of cancer. *Bull Cancer* 2017; 104(7/8): 662-74.
- 21 Quinlan MP, Settleman J. Isoform-specific ras functions in development and cancer. *Future Oncol* 2009; 5(1): 105-16.
 - 22 Yoon YK, Kim HP, Han SW, Oh DY, Im SA, Bang YJ, *et al.* KRAS mutant lung cancer cells are differentially responsive to MEK inhibitor due to AKT or STAT3 activation: implication for combinatorial approach. *Mol Carcinog* 2010; 49(4): 353-62.
 - 23 Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014; 511(7511): 543-50.
 - 24 Ma X, Le Teuff G, Lacas B, Tsao MS, Graziano S, Pignon JP, *et al.* Prognostic and predictive effect of TP53 mutations in patients with non-small cell lung cancer from adjuvant cisplatin-based therapy randomized trials: a LACE-Bio pooled analysis. *J Thorac Oncol* 2016; 11(6): 850-61.
 - 25 Breivik J, Meling GI, Spurkland A, Rognum TO, Gaudernack G. K-ras mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location. *Br J Cancer* 1994; 69(2): 367-71.
 - 26 Bisht S, Ahmad F, Sawaimoon S, Bhatia S, Das BR. Molecular spectrum of KRAS, BRAF, and PIK3CA gene mutation: determination of frequency, distribution pattern in Indian colorectal carcinoma. *Med Oncol* 2014; 31(9): 124.
 - 27 Kadota K, Yeh YC, D'Angelo SP, Moreira AL, Kuk D, Sima CS, *et al.* Associations between mutations and histologic patterns of mucin in lung adenocarcinoma: invasive mucinous pattern and extracellular mucin are associated with KRAS mutation. *Am J Surg Pathol* 2014; 38(8): 1118-27.
 - 28 Ahrendt SA, Decker PA, Alawi EA, Zhu Yr YR, Sanchez-Cespedes M, Yang SC, *et al.* Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 2001; 92(6): 1525-30.
 - 29 Shepherd FA, Domerg C, Hainaut P, Janne PA, Pignon JP, Graziano S, *et al.* Pooled analysis of the prognostic and predictive effects of KRAS mutation status and KRAS mutation subtype in early-stage resected non-small-cell lung cancer in four trials of adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2013; 31(17): 2173-81.
 - 30 Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Chitale DA, *et al.* Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14(18): 5731-4.
 - 31 Svaton M, Fiala O, Pesek M, Bortlicek Z, Minarik M, Benesova L, *et al.* The prognostic role of KRAS mutation in patients with advanced NSCLC treated with second- or third-line chemotherapy. *Anticancer Res* 2016; 36(3): 1077-82.
 - 32 Keohavong P, DeMichele MA, Melacrinis AC, Landreneau RJ, Weyant RJ, Siegfried JM. Detection of K-ras mutations in lung carcinomas: relationship to prognosis. *Clin Cancer Res* 1996; 2(2): 411-8.
 - 33 Cserepes M, Ostoros G, Lohinai Z, Raso E, Barbai T, Timar J, *et al.* Subtype-specific KRAS mutations in advanced lung adenocarcinoma: a retrospective study of patients treated with platinum-based chemotherapy. *Eur J Cancer* 2014; 50(10): 1819-28.
 - 34 Bazan V, Migliavacca M, Zanna I, Tubiolo C, Grassi N, Latteri MA, *et al.* Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype. *Ann Oncol* 2002; 13(9): 1438-46.
 - 35 Abubaker J, Bavi P, Al-Haqawi W, Sultana M, Al-Harbi S, Al-Sanea N, *et al.* Prognostic significance of alterations in KRAS isoforms KRAS-4A/4B and KRAS mutations in colorectal carcinoma. *J Pathol* 2009; 219(4): 435-45.
 - 36 Stephen AG, Esposito D, Bagni RK, McCormick F. Dragging ras back in the ring. *Cancer Cell* 2014; 25(3): 272-81.
 - 37 Taveras AG, Remiszewski SW, Doll RJ, Cesarz D, Huang EC, Kirschmeier P, *et al.* Ras oncoprotein inhibitors: the discovery of potent, ras nucleotide exchange inhibitors and the structural determination of a drug-protein complex. *Bioorg Med Chem* 1997; 5(1): 125-33.
 - 38 Peri F, Airolidi C, Colombo S, Martegani E, van Neuren AS, Stein M, *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of sugar-derived Ras inhibitors. *Chem Biochem* 2005; 6(10): 1839-48.
 - 39 Ahearn IM, Haigis K, Bar-Sagi D, Philips MR. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 13(1): 39-51.
 - 40 Rowell CA, Kowalczyk JJ, Lewis MD, Garcia AM. Direct demonstration of geranylgeranylation and farnesylation of Ki-Ras *in vivo*. *J Biol Chem* 1997; 272(22): 14093-7.
 - 41 Adjei AA, Mauer A, Bruzek L, Marks RS, Hillman S, Geyer S, *et al.* Phase II study of the farnesyl transferase inhibitor R115777 in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21(9): 1760-6.
 - 42 Lito P, Solomon M, Li LS, Hansen R, Rosen N. Allele-specific inhibitors inactivate mutant KRAS G12C by a trapping mechanism. *Science* 2016; 351 (6273): 604-8.
 - 43 Pecot CV, Wu SY, Bellister S, Filant J, Rupaimoole R, Hisamatsu T, *et al.* Therapeutic silencing of KRAS using systemically delivered siRNAs. *Mol Cancer Ther* 2014; 13(12): 2876-85.
 - 44 Kamekar S, LeBleu VS, Sugimoto H, Yang S, Ruivo CF, Melo SA, *et al.* Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature* 2017; 546(7659): 498-503.
 - 45 Tomasini P, Walia P, Labbe C, Jao K, Leighl NB. Targeting the KRAS pathway in non-small cell lung cancer. *Oncologist* 2016; 21(12): 1450-60.
 - 46 Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med* 2013; 19(11): 1401-9.
 - 47 Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, *et al.* RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 2010; 464 (7287): 431-5.
 - 48 Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, Nourry A, Niculescu-Duvas I, Dhomen N, *et al.* Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* 2010; 140(2): 209-21.
 - 49 Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 2010; 464(7287): 427-30.
 - 50 Martin S, Dudek-Peric AM, Maes H, Garg AD, Gabrysiak M, Demirsoy S, *et al.* Concurrent MEK and autophagy inhibition is required to restore cell death associated danger-signalling in Vemurafenib-resistant melanoma cells. *Biochem Pharmacol* 2015; 93(3): 290-304.

- 51 Yeh TC, Marsh V, Bernat BA, Ballard J, Colwell H, Evans RJ, *et al.* Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor. *Clin Cancer Res* 2007; 13(5): 1576-83.
- 52 Janne PA, Smith I, McWalter G, Mann H, Dougherty B, Walker J, *et al.* Impact of KRAS codon subtypes from a randomised phase II trial of selumetinib plus docetaxel in KRAS mutant advanced non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2015; 113(2): 199-203.
- 53 Janne PA, Mann H, Ghiorghiu D. Study design and rationale for a randomized, placebo-controlled, double-blind study to assess the efficacy and safety of selumetinib in combination with docetaxel as second-line treatment in patients with KRAS-mutant advanced non-small cell lung cancer (SELECT-1). *Clin Lung Cancer* 2016; 17(2): e1-4.
- 54 Akinleye A, Furqan M, Mukhi N, Ravella P, Liu D. MEK and the inhibitors: from bench to bedside. *J Hematol Oncol* 2013; 6: 27.
- 55 Hatzivassiliou G, Haling JR, Chen H, Song K, Price S, Heald R, *et al.* Mechanism of MEK inhibition determines efficacy in mutant KRAS- versus BRAF-driven cancers. *Nature* 2013; 501(7466): 232-6.
- 56 Morris EJ, Jha S, Restaino CR, Dayananth P, Zhu H, Cooper A, *et al.* Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer Discov* 2013; 3(7): 742-50.
- 57 Gupta S, Ramjaun AR, Haiko P, Wang Y, Warne PH, Nicke B, *et al.* Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice. *Cell* 2007; 129(5): 957-68.
- 58 Castellano E, Sheridan C, Thin MZ, Nye E, Spencer-Dene B, Diefenbacher ME, *et al.* Requirement for interaction of PI3-kinase p110alpha with RAS in lung tumor maintenance. *Cancer Cell* 2013; 24(5): 617-30.
- 59 Ebi H, Corcoran RB, Singh A, Chen Z, Song Y, Lifshits E, *et al.* Receptor tyrosine kinases exert dominant control over PI3K signaling in human KRAS mutant colorectal cancers. *J Clin Invest* 2011; 121(11): 4311-21.
- 60 Engelman JA, Chen L, Tan X, Crosby K, Guimaraes AR, Upadhyay R, *et al.* Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat Med* 2008; 14(12): 1351-6.
- 61 Hoeflich KP, Merchant M, Orr C, Chan J, Den Otter D, Berry L, *et al.* Intermittent administration of MEK inhibitor GDC-0973 plus PI3K inhibitor GDC-0941 triggers robust apoptosis and tumor growth inhibition. *Cancer Res* 2012; 72(1): 210-9.
- 62 Tolcher AW, Khan K, Ong M, Banerji U, Papadimitrakopoulou V, Gandara DR, *et al.* Antitumor activity in RAS-driven tumors by blocking AKT and MEK. *Clin Cancer Res* 2015; 21(4): 739-48.
- 63 Lee WY, Chen PC, Wu WS, Wu HC, Lan CH, Huang YH, *et al.* Panobinostat sensitizes KRAS-mutant non-small-cell lung cancer to gefitinib by targeting TAZ. *Int J Cancer* 2017; 141(9): 1921-31.
- 64 Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(11): 736-46.
- 65 Lee HJ, Zhuang G, Cao Y, Du P, Kim HJ, Settleman J. Drug resistance via feedback activation of Stat3 in oncogene-addicted cancer cells. *Cancer Cell* 2014; 26(2): 207-21.
- 66 Sahu N, Chan E, Chu F, Pham T, Koeppen H, Forrest W, *et al.* Cotargeting of MEK and PDGFR/STAT3 pathways to treat pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther* 2017; 16(9): 1729-38.
- 67 Grabner B, Schramek D, Mueller KM, Moll HP, Svinka J, Hoffmann T, *et al.* Disruption of STAT3 signalling promotes KRAS-induced lung tumorigenesis. *Nat Commun* 2015; 6: 6285.
- 68 Sos ML, Michel K, Zander T, Weiss J, Frommolt P, Peifer M, *et al.* Predicting drug susceptibility of non-small cell lung cancers based on genetic lesions. *J Clin Invest* 2009; 119(6): 1727-40.
- 69 Chatterjee S, Huang EH, Christie I, Kurland BF, Burns TF. Acquired resistance to the Hsp90 inhibitor, ganetespib, in KRAS-mutant NSCLC is mediated via reactivation of the ERK-p90RSK-mTOR signaling network. *Mol Cancer Ther* 2017; 16(5): 793-804.
- 70 Costa-Cabral S, Brough R, Konde A, Aarts M, Campbell J, Marinari E, *et al.* CDK1 is a synthetic lethal target for KRAS mutant tumours. *PLoS One* 2016; 11(4): e0149099.
- 71 Scholl C, Frohling S, Dunn IF, Schinzel AC, Barbie DA, Kim SY, *et al.* Synthetic lethal interaction between oncogenic KRAS dependency and STK33 suppression in human cancer cells. *Cell* 2009; 137(5): 821-34.
- 72 de Castro Carpeno J, Belda-Iniesta C. KRAS mutant NSCLC, a new opportunity for the synthetic lethality therapeutic approach. *Transl Lung Cancer Res* 2013; 2(2): 142-51.
- 73 DeBerardinis RJ, Thompson CB. Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers teach us? *Cell* 2012; 148(6): 1132-44.
- 74 Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; 27: 441-64.
- 75 Stine ZE, Dang CV. Stress eating and tuning out: cancer cells rewire metabolism to counter stress. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2013; 48(6): 609-19.
- 76 Son J, Lyssiotis CA, Ying H, Wang X, Hua S, Ligorio M, *et al.* Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature* 2013; 496(7443): 101-5.
- 77 Levine AJ, Puzio-Kuter AM. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* 2010; 330(6009): 1340-4.
- 78 Sasaki H, Shitara M, Yokota K, Hikosaka Y, Moriyama S, Yano M, *et al.* Overexpression of GLUT1 correlates with Kras mutations in lung carcinomas. *Mol Med Rep* 2012; 5(3): 599-602.
- 79 Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(11): 761-74.
- 80 Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis CA, Hua S, Chu GC, Fletcher-Sananikone E, *et al.* Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell* 2012; 149(3): 656-70.
- 81 Brunelli L, Caiola E, Marabese M, Brogginini M, Pastorelli R. Capturing the metabolomic diversity of KRAS mutants in non-small-cell lung cancer cells. *Oncotarget* 2014; 5(13): 4722-31.
- 82 Padanad MS, Konstantinidou G, Venkateswaran N, Melegari M, Rindhe S, Mitsche M, *et al.* Fatty acid oxidation mediated by acyl-CoA synthetase long chain 3 is required for mutant KRAS lung tumorigenesis. *Cell Rep* 2016; 16(6): 1614-28.
- 83 Tran E, Robbins PF, Lu YC, Prickett TD, Gartner JJ, Jia L, *et al.* T-cell transfer therapy targeting mutant KRAS in cancer. *N Engl J*

- Med 2016; 375(23): 2255-62.
- 84 Dong ZY, Zhong WZ, Zhang XC, Su J, Xie Z, Liu SY, *et al.* Potential predictive value of TP53 and KRAS mutation status for response to PD-1 blockade immunotherapy in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2017; 23(12): 3012-24.
- 85 Kapoor A, Yao W, Ying H, Hua S, Liewen A, Wang Q, *et al.* Yap1 activation enables bypass of oncogenic Kras addiction in pancreatic cancer. *Cell* 2014; 158(1): 185-97.
- 86 Chen N, Fang W, Lin Z, Peng P, Wang J, Zhan J, *et al.* KRAS mutation-induced upregulation of PD-L1 mediates immune escape in human lung adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2017; 66(9): 1175-87.
- 87 Coelho, M. A. de Carne Trecesson, S. Rana, S. Zecchin, D. Moore, C. Molina-Arcas, M. Oncogenic RAS signaling promotes tumor immunoresistance by stabilizing PD-L1 mRNA. *Immunity* 2017; 47(6): 1083-99.