

Καρκίνος του πνεύμονα: δομές των μεταβολών στον υποδοχέα EGFR και στα κατασταλτικά συμπλέγματα

*Μηχανισμοί ενεργοποίησης των συμπλεγμάτων
και ανάλυση των διαφορών στην κατασταλτική ευαισθησία*

Cai-Hong Yun, Titus J. Boggon, Yiqun Li, Michele S. Woo, Heidi Greulich, Matthew Meyerson, Michael J. Eck

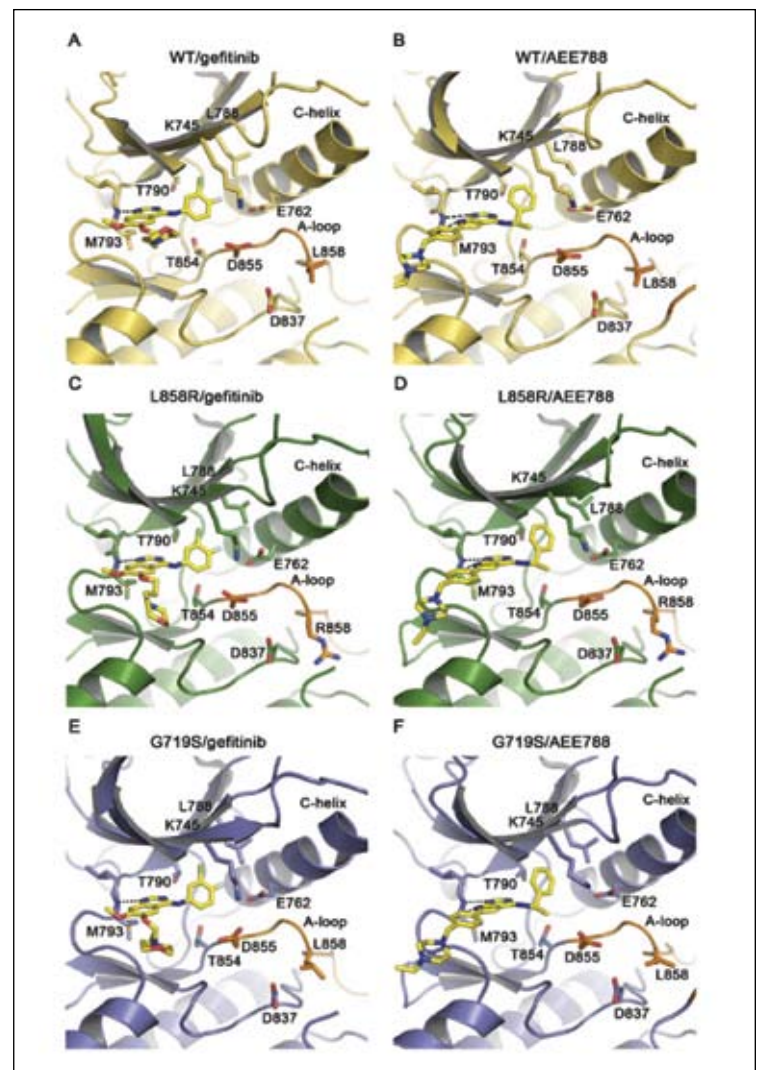
Cancer Cell March 2007; 11:217–227

Απόδοση στα ελληνικά: ΦΩΤΗΣ ΒΛΑΣΤΟΣ
Πνευμονολόγος, Επιμελητής Α', ΚΑΑ-ΝΝΘΑ

Οι μεταλλάξεις στην περιοχή της κινάσης του EGFR εμφανίζονται σε περίπου 16% των ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, αλλά σε πολύ υψηλότερο ποσοστό σε επιλεγμένους πληθυσμούς, όπως σε μη καπνιστές, σε γυναίκες και σε ασθενείς από την Άπω Ανατολή. Η παρουσία αυτών των μεταβολών συσχετίζεται με την απόκριση σε μικρομοριακούς αναστολείς της κινάσης της τυροσίνης που στοχεύουν τον EGFR. Λόγω του ότι οι διάφορες μεταλλάξεις αθροίζονται γύρω από το καταλυτικό σημείο και λόγω του ότι έχουν αναφερθεί διαφορές στην κατασταλτική ευαισθησία των φορέων αυτών των μεταλλάξεων, είναι σημαντικό να κατανοηθούν οι επιδράσεις αυτών των μεταλλάξεων σε δομικό επίπεδο. Η παρούσα εργασία παρέχει μια δομική εδραίωση για την κατανόηση των διαφορών στην ευαισθησία των μεταλλάξεων L858R και G719S ώστε να εφαρμοσθούν ορθά στην κλινική πράξη οι διαθέσιμοι σήμερα αναστολείς του EGFR και να αναπτυχθούν ενδεχομένως στο μέλλον ισχυρότεροι και ειδικοί των μεταλλάξεων αναστολείς.

Ο υποδοχέας του επιδερμοειδούς αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor EGFR) -ονομάζεται επίσης ErbB1, Her1- είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας συνδεδεμένος με το ένζυμο κινάση της τυροσίνης, ο οποίος διαβιβάζει σημαντικά μηνύματα για τη μίτωση, τη διαφοροποίηση και την κινητικότητα του κυττάρου. Μόλις συνδεθεί ο αυξητικός παράγοντας, ο EGFR και τα άλλα μέλη της οικογένειας ErbB ομο- ή ετεροδιμερίζουν και ενεργοποιούν τις ενδοπλασματικές περιοχές τους όπου βρίσκεται η κινάση της τυροσίνης, έτσι ώστε να αρχίσει η μεταγωγή ενός ενδοκυττάρου σήματος^{17,25}. Η υπερέκφραση ή η ενεργοποίηση λόγω μετάλλαξης του EGFR ενέχεται στην ανάπτυξη ή στην επέκταση πολλών κακοηθειών στον άνθρωπο. Αρκετές μικρομοριακές ουσίες που καταστέλλουν την κινάση της τυροσίνης (Tyrosine Kinase Inhibitors, TKIs) έχουν αναπτυχθεί με στόχο την πρόσδεσή τους στην περιοχή του υποδοχέα που συνδέεται με το ATP (Hynes and Lane, 2005).

Ορισμένες από αυτές τις ουσίες δοκιμάζονται εδώ και λίγα χρόνια σε κλινικές μελέτες ή έχουν λάβει άδεια χορήγησης στα πλαίσια της αντινεοπλασματικής θεραπείας: η gefitinib (Iressa)²⁴, η erlotinib (Tarceva)¹⁵, η lapatinib¹⁶, η πυρολοπουριμιδίνη AEE788²²



Εικόνα 1. Οι τρόποι σύνδεσης της gefitinib (A, C και E) και της AEE788 (B, D και F) με τις κινάσες wild-type (κίτρινο), L858R (πράσινο) και G719S (μπλε). Σημαίνονται οι σημαντικές πλευρικές άλυσσες σε μορφή ράβδου με άνθρακες χρωματισμένους κίτρινους και δεσμούς υδρογόνου. Συγκρίνετε τη σύνδεση των διαφόρων αναστολέων με κινάσες που εμφανίζουν την ίδια μορφή μετάλλαξης (οριζοντίως) και τη σύνδεση των ίδιων αναστολέων μεταξύ wild-type και μεταλλαγμένων κινασών (καθέτως). Οι τρόποι σύνδεσης και των δύο ουσιών είναι ουσιαστικά όμοιοι και στις τρεις δομές.

⇒ και ο μη αναστρέψιμος αναστολέας HKI-272²³. Οι μεταλλάξεις λόγω απώλειας βάσεων στην εξωκυττάρια περιοχή του EGFR είναι γνωστό από καιρό ότι προκαλούν ανεξάρτητη από τους αυξητικούς παράγοντες ενεργοποίηση του EGFR και είναι συχνές στο γλιόβλωμα⁴.

Πρόσφατα ανακαλύφθηκαν σωματικές μεταλλάξεις στην ενδοκυττάρια περιοχή της κινάσης της τυροσίνης του EGFR σε μια υποομάδα ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC)^{3,6,9,10,12,13,18}. Η παρουσία αυτών των μεταλλάξεων στον NSCLC συσχετίζεται με ανταπόκριση στους TKIs. Ένας αριθμός από διακριτές μεταλλάξεις έχουν ταυτοποιηθεί, όπως εστιακές μεταλλάξεις μέσα στην αγκύλη πρόσδεσης των νουκλεοτιδίων στο εξώνιο 18, μικρές απώλειες βάσεων στο εξώνιο 19, προσθήκες στο εξώνιο 20 και εστιακές μεταλλάξεις στην αγκύλη ενεργοποίησης στο εξώνιο 21.

Δομικά, αυτές οι μεταλλάξεις αθροίζονται γύρω από την ενεργή περιοχή της τυροσίνης κινάσης. Οι δύο συχνότερες μεταλλάξεις είναι η απώλεια βάσεων στο εξώνιο 19, απ' όπου λείπουν οι θέσεις 746-750 των εκφραζόμενων πρωτεϊνών και η εστιακή αντικατάσταση στο εξώνιο 19, όπου η λευκίνη 858 αντικαθίσταται από μια αργινίνη (L858R)^{3,18}. Η αντικατάσταση L858R είναι η συχνότερη μεμονωμένη μετάλλαξη (περίπου το 40% των μεταλλάξεων) και βρίσκεται στην αγκύλη ενεργοποίησης της κινάσης (A loop). Εστιακές μεταλλάξεις παρατηρούνται επίσης στη θέση 719 της γλυκίνης, αν και σπανιότερα. Η γλυκίνη 719 βρίσκεται σε γειτονική θέση ως προς την «αγκύλη P» της κινάσης και αντικαθίσταται από τη σερίνη, την κυστεΐνη ή την αλανίνη.

Οι εστιακές μεταλλάξεις L858R και G719S, καθώς επίσης και οι απώλειες του εξωνίου 19 και η προσθήκη του εξωνίου 20 είναι ικανές να επηρεάσουν τη μιτωτική συμπεριφορά των κυττάρων, σε κυτταρικές καλλιέργειες βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων^{1,5,7,10,19,Arao et al.2004}. Η κλινική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας εστιακών μεταλλάξεων και της ανταπόκρισης στη θεραπεία με TKIs ίσως αντανάκλαται πιστά στις κυτταρικές καλλιέργειες και σε κύτταρα με τροποποιημένους υποδοχείς EGFR. Τα κύτταρα με τροποποιημένους υποδοχείς EGFR είναι γενικά πλέον ευαίσθητα στους TKIs σε σύγκριση με τα κύτταρα που διαθέτουν τους φυσιολογικούς υποδοχείς EGFR. Ιδιαίτερα η μετάλλαξη L858R συνδέεται με 10πλάσια έως 100πλάσια ευαισθησία στην erlotinib και στη gefitinib σε σύγκριση με τα κύτταρα χωρίς μεταλλάξεις^{7,11,13} και με στατιστικά μεγαλύτερη ευαισθησία σε σύγκριση με τα κύτταρα που εμφανίζουν μεταλλάξεις G719S⁸. Ταυτόχρονα, οι εξαιρέσεις από τον κανόνα υπογραμμίζουν με τη σειρά τους τη σχέση μεταξύ των ειδικών μεταλλάξεων και της κατασταλτικής ανταπόκρισης. Η δομή της μη μεταλλαγμένης περιοχής της κινάσης του υποδοχέα EGFR έχει ήδη μελετηθεί εντατικά.

Η κρυσταλλική δομή έχει μελετηθεί μόνη ή σε σύμπλεγμα με την erlotinib²⁰. Και στις δύο περιπτώσεις εμφανίζεται μια ενεργητική διαμόρφωση της κινάσης, αν και η Tyr869 δεν είναι φωσφορυλιωμένη στην αγκύλη ενεργοποίησής της. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με το εύρημα ότι η φωσφορυλίωση της αγκύλης ενεργοποίησης του υποδοχέα EGFR δεν είναι απαραίτητη για την ενεργοποίησή του²¹. Πρόσφατα, μια μελέτη (structural dissection) του μηχανισμού ενεργοποίησης του EGFR επιβεβαίωσε τη διαμόρφωση τύπου Src/CDK της ανενεργού κινάσης και κατέδειξε ένα μηχανισμό ενεργοποίησης όμοιο με αυτόν των κυκλινών, που περιλαμβάνει μια ασύμμετρη διμεροποίηση της περιοχής της κινάσης του EGFR²⁶. Η ανακάλυψη ενεργοποιητικών μεταλλάξεων της περιοχής της κινάσης του EGFR και η διαφορετική ευαισθησία τους στους αναστολείς θέτει μια σειρά από δομικά ενδιαφέρουσες και κλινικά σημαντικές ερωτήσεις. Πώς

οι μεταλλάξεις ενεργοποιούν την κινάση; Πώς επηρεάζουν τη σύνδεση του αναστολέα στον υποδοχέα; Και, εντέλει, σε ποιο βαθμό θα χρειασθούν αναστολείς σχεδιασμένοι με βάση καθεμία μετάλλαξη ώστε να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα των μελλοντικών θεραπευτικών στρατηγικών; Ενδέχεται να εξαρτάται η ευαισθησία των διαφόρων όγκων με μεταλλάξεις του EGFR από τις δομικές διαφορές των μεταλλαγμένων κινασών, οι οποίες επηρεάζουν την απόκριση σε διάφορους αναστολείς των EGFR^{7,10}.

Με σκοπό τη διαλεύκανση των παραπάνω ερωτήσεων, μελετήθηκαν οι δομές της «φυσιολογικής» μορφής (wild-type) και των μεταλλάξεων L858R και G719S της κινάσης του EGFR, σε συμπλέγματα με αναστολείς τους, όπως η gefitinib, η AEE788, η συγγενής με τη σταυροσπορίνη AFN941 και το ανάλογο του ATP AMP-PNP. Επιπλέον, μελετήθηκε η κινητική των κινασών wild-type και αυτών με μεταλλάξεις in vitro.

Βρέθηκε ότι η μετάλλαξη L858R συνδέεται με κατά 50 φορές μεγαλύτερη δραστηριότητα σε σύγκριση με την κινάση wild-type και ότι η μετάλλαξη G719S συνδέεται με κατά 10 φορές μεγαλύτερη δραστηριότητα σε σύγκριση με την κινάση wild-type. Η εξέταση των δομών των μεταλλάξεων αποκάλυψε μια συνολική διαμόρφωση παρόμοια με αυτή της ενεργοποιημένης κινάσης wild-type. Οι συγκρίσεις με τη δομή του ανενεργού EGFR υποδηλώνουν ότι οι μεταλλάξεις L858R και G719S ενεργοποιούν την κινάση παρεμβαίνοντας σε αλληλεπιδράσεις οι οποίες σταθεροποιούν την ανενεργό μορφή. Η ανάλυση των συμπλεγμάτων με τους αναστολείς έδειξε ότι ο τρόπος σύνδεσης της AMP-PNP, της AEE788 και της gefitinib είναι παρόμοιος στις κινάσεις wild-type, L858R και G719S. Αντίθετα, παρατηρήθηκε μια σημαντική περιστροφή του ανάλογου της σταυροσπορίνης AFN941 στο σημείο σύνδεσης της μετάλλαξης G719S σε σύγκριση με τον προσανατολισμό του στη σύνδεσή του με την πρωτεΐνη wild-type. Άμεσες μετρήσεις της σύνδεσης της gefitinib και του AEE788 με την κινάση wild-type και τις μεταλλαγμένες κινάσεις αποκάλυψαν ότι και οι δύο ουσίες συνδέονται με μεγαλύτερη συγγένεια με τη μετάλλαξη L858R σε σύγκριση με την κινάση wild-type ή με τη μετάλλαξη G719S. Είναι αξιοσημείωτο ότι η gefitinib συνδέεται 20 φορές ισχυρότερα με τη μετάλλαξη L858R.

Η θετική κλινική εμπειρία από τη χρήση της imatinib (Gleevec) ως αναστολέας της κινάσης BCR-Abl στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία αποτελεί ένα παράδειγμα μοριακής στοχεύουσας αγωγής στην ογκολογία². Οι σωματικές μεταλλάξεις στις κινάσεις του EGFR που εμπλέκονται στον καρκίνο του πνεύμονα και άλλων οργάνων ίσως αποτελούν μια ανάλογη ευκαιρία θεραπευτικής παρέμβασης, αλλά με μια βασική διαφορά. Στον BCR-Abl, ο μηχανισμός ενεργοποίησης της κινάσης είναι αλληλοστερικός και η περιοχή της κινάσης παραμένει αναλλοίωτη (εκτός από τις περιπτώσεις μεταλλάξεων που επιφέρουν αντοχή). Συνεπώς, αποτελεί ένα προνομιούχο στόχο για την ανάπτυξη φαρμάκων. Αντίθετα, οι μεταλλάξεις του EGFR ενεργοποιούν την κινάση αναστέλλοντας αυτοανασταλτικές επιδράσεις κοντά στο σημείο σύνδεσης με τον ATP. Καθώς φαίνεται από αυτή τη μελέτη, αυτές οι μεταλλάξεις μεταβάλλουν την περιοχή της κινάσης με τρόπο ώστε να επηρεάζεται δραματικά η σύνδεση με τους αναστολείς. Συνεπώς, κάθε μετάλλαξη αποτελεί ιδιαίτερο στόχο για την ανάπτυξη ειδικών αναστολέων.

Βιβλιογραφία

1. Amann J, Kalyankrishna S, Massion PP, Ohm JE, Girard L, Shigematsu H, Peyton M, Jurosko D, Huang Y, Stuart SJ et al. Aberrant epidermal growth factor receptor signalling and enhanced sensitivity to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Res* 2005; 65:226-235. ⇒

- ⇒ 2. Capdeville R, Silberman S, Dimitrijevic S. Imatinib: The first 3 years. *Eur J Cancer* 2002; 38(Suppl 5):S77-S82.
3. Chan SK, Gullick WJ, Hill ME. Mutations of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer-Search and destroy. *Eur J Cancer* 2006; 42:17-23.
4. Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:4309-4313.
5. Engelman JA, Janne PA, Mermel C, Pearlberg J, Mukohara T, Fleet C, Cichowski K, Johnson BE, Cantley LC. ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:3788-3793.
6. Gazdar AF, Shigematsu H, Herz J, Minna JD. Mutations and addiction to EGFR: The Achilles 'heel' of lung cancers? *Trends Mol Med* 2004; 10:481-486.
7. Greulich H, Chen TH, Feng W, Janne PA, Alvarez JV, Zappaterra M, Bulmer SE, Frank DA, Hahn WC, Sellers WR, Meyerson M. Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutants. *PLoS Med* 2005; 2:e313.
8. Jiang J, Greulich H, Janne PA, Sellers WR, Meyerson M, Griffin JD. Epidermal growth factor-independent transformation of Ba/F3 cells with cancer-derived epidermal growth factor receptor mutants induces gefitinib-sensitive cell cycle progression. *Cancer Res* 2005; 65:8968-8974.
9. Johnson BE, Janne PA. Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2005; 65:7525-7529.
10. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350:2129-2139.
11. Mukohara T, Engelman JA, Hanna NH, Yeap BY, Kobayashi S, Lindeman N, Halmos B, Pearlberg J, Tsuchihashi Z, Cantley LC et al. Differential effects of gefitinib and cetuximab on nonsmall-cell lung cancers bearing epidermal growth factor receptor mutations. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:1185-1194.
12. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ et al. EGFR mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304:1497-1500.
13. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:13306-13311.
14. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, Kris MG, Varmus H. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005; 2:e73.
15. Pollack VA, Savage DM, Baker DA, Tsaparikos KE, Sloan DE, Moyer JD, Barbacci EG, Pustilnik LR, Smolarek TA, Davis JA et al. Inhibition of epidermal growth factor receptor-associated tyrosine phosphorylation in human carcinomas with CP-358, 774: dynamics of receptor inhibition in situ and antitumor effects in athymic mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291:739-748.
16. Rusnak DW, Lackey K, Affleck K, Wood ER, Alligood KJ, Rhodes N, Keith BR, Murray DM, Knight WB, Mullin RJ, Gilmer TM. The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2001; 1:85-94.
17. Schlessinger J. Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science* 2004; 306:1506-1507.
18. Shigematsu H, Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int J Cancer* 2006; 118:257-262.
19. Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 2004; 305:1163-1167.
20. Stamos J, Sliwkowski MX, Eigenbrot C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J Biol Chem* 2002; 277:46265-46272.
21. Tice DA, Biscardi JS, Nickles AL, Parsons SJ. Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:1415-1420.
22. Traxler P, Allegrini PR, Brandt R, Brueggen J, Cozens R, Fabbro D, Grosios K, Lane HA, McSheehy P, Mestan J et al. AEE788: a dual family epidermal growth factor receptor/ErbB2 and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res* 2004; 64:4931-4941.
23. Tsou HR, Overbeek-Klumpers EG, Hallett WA, Reich MF, Floyd MB, Johnson BD, Michalak RS, Nilakantan R, Discafani C, Golas J et al. Optimization of 6, 7-disubstituted-4-(arylamino)quinoline-3-carbonitriles as orally active, irreversible inhibitors of human epidermal growth factor receptor-2 kinase activity. *J Med Chem* 2005; 48:1107-1131.
24. Wakeling AE, Guy SP, Woodburn JR, Ashton SE, Curry BJ, Barker AJ, Gibson KH. ZD1839 (Iressa): An orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res* 2002; 62:5749-5754.
25. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:127-137.
26. Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 2006; 125:1137-1149. 