

Marek Z. Wojtukiewicz^{1,2}, Ewa Sierko^{1,2}, Paweł Szambora^{1,2}

¹Klinika Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

²Białostockie Centrum Onkologii

Patofizjologiczne podstawy terapii ukierunkowanej na zahamowanie funkcji receptora czynnika wzrostu naskórka (EGFR)

Pathophysiological basis for therapy targeted on epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibition

Adres do korespondencji:

Prof. dr hab. med. Marek Z. Wojtukiewicz
Klinika Onkologii, Uniwersytet Medyczny
w Białymstoku

Białostockie Centrum Onkologii
ul. Ogrodowa 12, 15-027 Białystok

Tel.: +48 (85) 664 67 34

Faks: +48 (85) 664 67 83

e-mail: mzwojtukiewicz@gmail.com

ewa.sierko@iq.pl

STRESZCZENIE

Rodzina receptorów ErbB, do których należy receptor czynnika wzrostu naskórka (EGFR), charakteryzuje się aktywnością kinazy tyrozynowej. W budowie tych receptorów zwraca uwagę występowanie trzech domen: zewnętrznej i wewnątrzkomórkowej oraz domeny przezbłonowej, kotwiczącej ten receptor w błonie komórkowej. Domena wewnątrzkomórkowa jest miejscem efektorowym receptora o aktywności kinazy tyrozynowej. Pełni również funkcje regulatorowe. Nadmierną ekspresję EGFR stwierdza się na powierzchni komórek nowotworowych wielu nowotworów. Wiąże się to z większym zaawansowaniem choroby w momencie rozpoznania oraz większą zdolnością komórek nowotworowych do inwazji. Stanowi także niekorzystny czynnik prognostyczny. Efektem przyłączenia liganda do EGFR jest jego dimeryzacja, pobudzenie i aktywacja szlaków przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego. Prowadzi to do proliferacji komórek, hamowania ich apoptozy oraz zwiększenia zdolności tych komórek do przeżycia, a także do pobudzenia inwazji, tworzenia przerzutów odległych, angiogenezy, a w konsekwencji — do progresji choroby nowotworowej. Poza znanymi sposobami hamowania funkcji EGFR coraz większe zainteresowanie budzą inhibitory kinaz uczestniczących w wewnątrzkomórkowym mechanizmie przekazywania sygnału.

Słowa kluczowe: receptor czynnika wzrostu naskórka, heterodimeryzacja, dimeryzacja, wymienna fosforylacja, *autocrine switch*

ABSTRACT

Epidermal growth factor receptor (EGFR) belongs to the group of tyrosine kinase receptors, i.e. ErbB family. The receptor consists of three regions: an extracellular ligand-binding region, an intracellular region and a transmembrane domain which anchors the molecule in the cell membrane. The intracellular domain is responsible for tyrosine kinase activity and EGFR regulatory functions. EGFR overexpression is observed on the surface of the neoplastic cells of many cancer types. It is associated with clinical stage of the tumor and facilitates cancer invasion. EGFR overexpression is a negative prognostic factor. After ligand binding and receptors dimerization and activation, EGFR elicits cell responses through multiple divergent pathways. EGFR stimulation results in increased cell proliferation, enhanced invasion, distant metastases formation, increased angiogenesis, decreased apoptosis, prolonged cancer cell survival and, in consequence, cancer progression.

Key words: epidermal growth factor receptor, cross-talk, cross-phosphorylation, autocrine switch, dimerization, heterodimerization

Onkol. Prak. Klin. 2010; 6, 5: 217–227

Wstęp

Liczne procesy fizjologiczne, takie jak: wzrost, implantacja zarodka, regeneracja tkanek, zależą od prawidłowo funkcjonującego receptora czynnika wzrostu naskórka (EGFR/HER-1/ErbB-1). Receptor ten znajduje się w błonach wszystkich komórek nabłonkowych oraz wielu komórek mezenchymalnych [1]. Nadmierną ekspresję tego receptora, prowadzącą do zwiększonej proliferacji komórek, obserwuje się w błonach komórkowych wielu nowotworów, między innymi niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP), jelita grubego, szyjki macicy, gruczołu krokowego, piersi, jajnika, żołądka i trzustki. Ekspresję EGFR stwierdza się w komórkach niemal wszystkich złośliwych nowotworów okolicy głowy i szyi. Obserwacja przebiegu choroby oraz wyników leczenia chorych na nowotwory wykazała, że nadmierna ekspresja EGFR w błonach komórek nowotworowych jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym i wiąże się z:

- zaawansowaniem choroby w momencie rozpoznania;
- większą zdolnością komórek nowotworowych do inwazji [2].

Ponadto zidentyfikowano obecność EGFR w jądrze komórkowym w tkankach prawidłowych (np. w komórkach wątroby podlegającej regeneracji, tarczycy, łożysku, keratynocytach) oraz komórkach nowotworów złośliwych (w glejakach złośliwych, w tym glejakach wielopostaciowych, a także w rakach piersi, pęcherza moczowego, jajnika i jamy ustnej) [3, 4]. Jądrowa lokalizacja EGFR może dotyczyć zarówno karioplazmy, jak i wewnętrznej części błony jądrowej [3, 4]. Receptor EGFR zlokalizowany w jądrze komórkowym oddziałuje na wiele procesów w komórce i przypisuje mu się istotny wpływ na powstawanie oporności na leczenie przeciwnowotworowe (chemio- i radioterapię) [3, 4].

Poznano cztery receptory rodziny ErbB, do której należy receptor czynnika wzrostu naskórka: ErbB-1/EGFR/HER-1, ErbB-2/HER-2, ErbB-3/HER-3, ErbB-4/HER-4. Zidentyfikowano wiele substancji będących agonistami tej grupy receptorów, między innymi ponad 3000 związków będących czynnikami i modulatorami wzrostu. Ich wspólną cechą jest obecność przynajmniej jednej domeny podobnej do czynnika wzrostu naskórka (EGF, *epidermal growth factor*), a cechą różnicującą jest powinowactwo do poszczególnych receptorów rodziny ErbB [5]. Substancjami o wyłącznym powinowactwie do receptora ErbB-1 (HER-1, EGFR) są:

- czynnik wzrostu naskórka (EGF);
- transformujący czynnik wzrostu α (TGF- α , *transforming growth factor alpha*);
- amfiregulina.

Natomiast neureguliny 3 i 4 łączy się wyłącznie z receptorem HER-4. Istnieją substancje o powinowactwie

do dwóch receptorów z tej rodziny. Ligandami receptora HER-1 i HER-4 są między innymi:

- czynnik wzrostu naskórka wiążący heparynę (HB-EGF, *heparin binding epidermal growth factor*);
- betacelulina;
- epiregulina.

Najistotniejszymi czynnikami stymulującymi EGFR są EGF i TGF- α [6]. W warunkach *in vitro* EGF stymuluje wzrost wielu hodowli komórkowych oraz proliferację i dojrzewanie komórek. Domena podobna do EGF, która jest charakterystyczna dla agonistów EGFR, składa się z około 50 aminokwasów. Zlokalizowanych jest w niej 6 reszt cysteinowych, między którymi tworzą się mostki cysteinowe odpowiedzialne za strukturę trójpierścieniową tego białka.

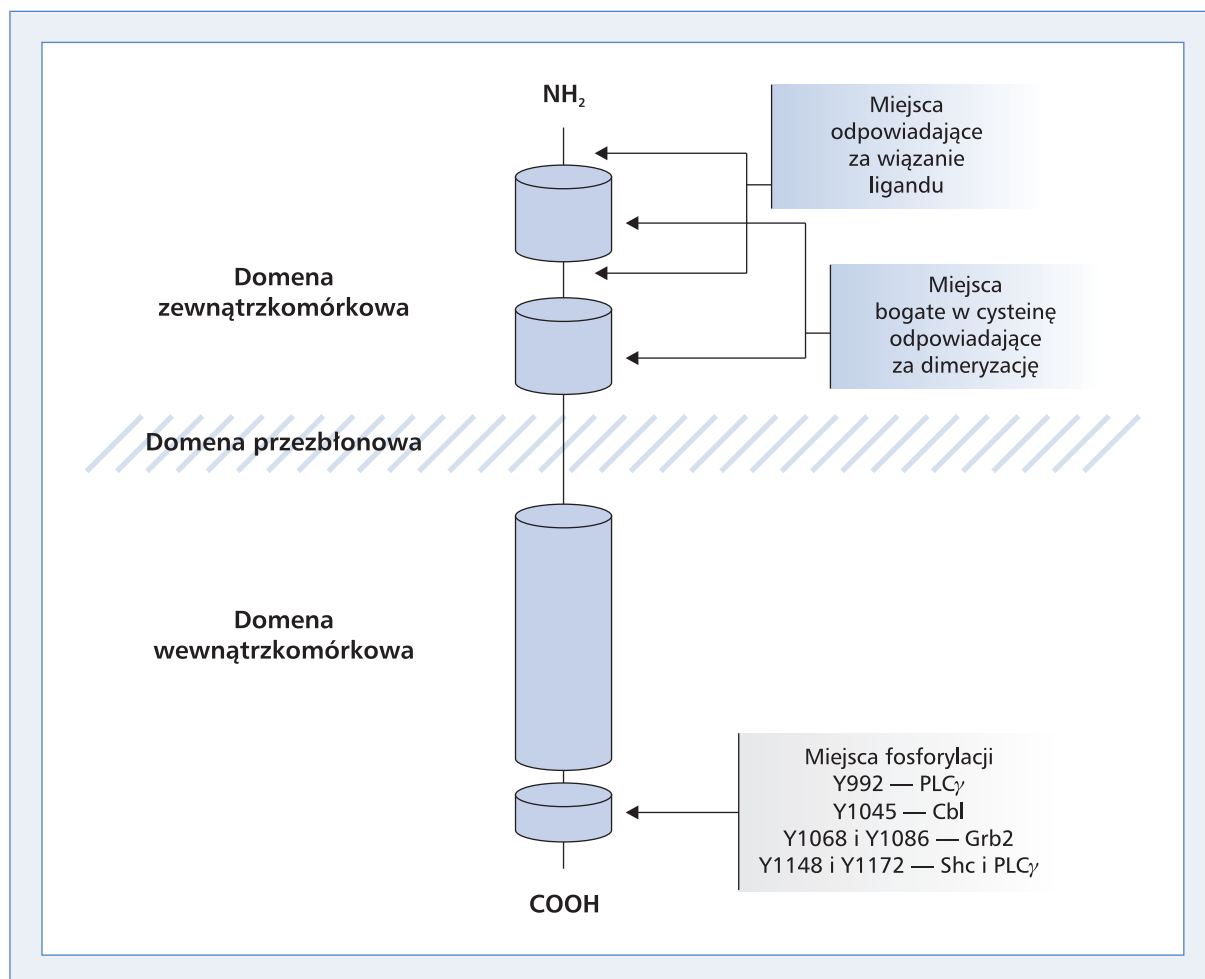
Czynnik TGF- α jest syntetyzowany przez makrofagi, komórki ośrodkowego układu nerwowego oraz keratynocyty. Struktura pierwszorzędowa TGF- α jest niemal identyczna z sekwencją EGF. Warunkuje to analogiczną, trójpierścieniową strukturę połączoną mostkami dwusiarczkowymi [7]. Czynnik TGF- α wiąże się z EGFR, prowadząc do stymulacji komórek śródbłonka [8]. Komórki poddane stymulacji TGF- α tracą właściwości antyproliferacyjne związane z przyleganiem do siebie, przez co ulegają niekontrolowanemu podziałom mitotycznym. Czynnik ten pobudza również proliferację fibroblastów. Do aktywacji EGFR dochodzi także wskutek działania promieniowania jonizującego, promieniowania ultrafioletowego czy szoku termicznego.

Budowa EGFR

Receptor EGFR jest polipeptydem składającym się z 1186 aminokwasów (masa cząsteczkowa — 170 kDa) (ryc. 1). Łańcuch ten tworzy przezbłonowe białko, w którym wyróżnia się trzy domeny:

- domenę zewnątrzkomórkową zbudowaną z 621 aminokwasów, która stanowi N-końcowy fragment tego polipeptydu; w jej obrębie znajdują się dwa miejsca odpowiadające za wiązanie liganda oraz dwa miejsca bogate w cysteinę, biorące udział w dimeryzacji receptorów;
- domenę przezbłonową składającą się z 23 aminokwasów, która zakotwicza receptor w błonie komórkowej;
- domenę wewnątrzkomórkową, która jest miejscem efektorowym receptora i charakteryzuje się aktywnością kinazy tyrozynowej (w jej obrębie znajduje się kilka miejsc fosforylacji); składa się z 542 aminokwasów [8].

Geny kodujące syntezę białka EGFR, należące do rodziny protoonkogenów *c-erbB*, zlokalizowane są na krótkim ramieniu chromosomu 7. (p12.3–p12.1). Wystąpienie mutacji w obrębie tego regionu prowadzi do



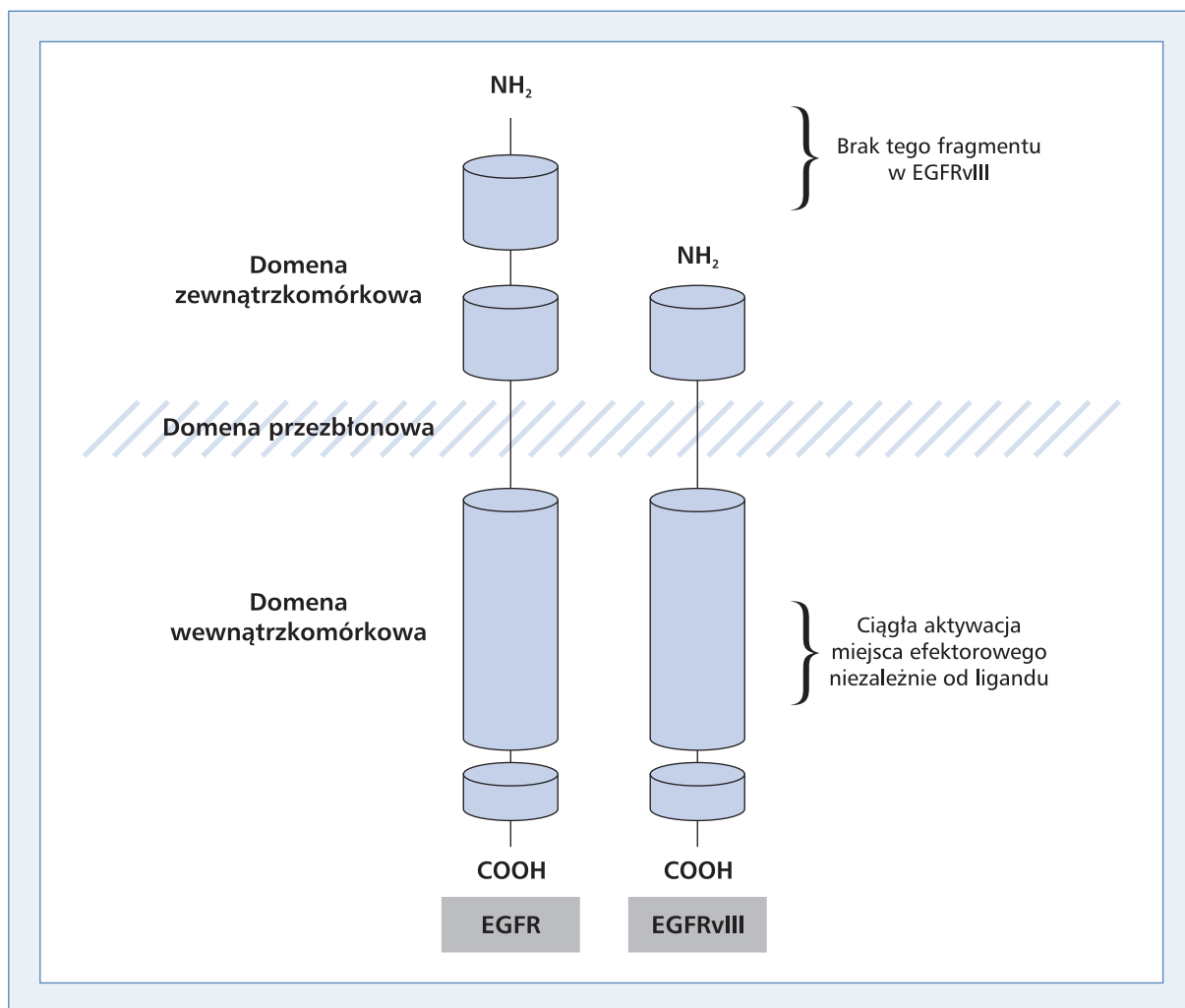
Rycina 1. Schematyczna budowa receptora czynnika wzrostu naskórka (EGFR). NH_2 — N-końcowy fragment łańcucha polipeptydowego; COOH — C-końcowy fragment łańcucha polipeptydowego; Y992, Y1045, Y1068, Y1086, Y1148 i Y1172 — lokalizacje miejsc fosforylacji (liczby odpowiadają numerom kolejnych aminokwasów związanych z procesami fosforylacji); $\text{PLC}\gamma$ — fosfolipaza C gamma; Cbl — rodzina ligaz związanych z ubikwityną będąca regulatorem hamującym receptory związane z kinazą tyrozynową; Grb2 — białko wiążące receptor czynnika wzrostu 2; Shc — rodzina białek łącznikowych, które odgrywają kluczową rolę w regulacji wzrostu i odpowiedzi na stres oksydacyjny

Figure 1. Schematic presentation of epidermal growth factor receptor (EGFR) structure. NH_2 — N-terminal fragment of polipeptide chain; COOH — C-terminal fragment of polipeptide chain; Y992, Y1045, Y1068, Y1086, Y1148 i Y1172 — phosphorylation loci (numbers — subsequent aminoacids associated with phosphorylation); $\text{PLC}\gamma$ — phospholipase C gamma; Cbl — ubiquitine bound ligase family of proteins; Grb2 — growth factor receptor binding protein 2; Shc — a family of adapter proteins that play key roles in growth regulation and oxidative stress responses

pojawienia się nieprawidłowych form EGFR. Poznano trzy główne mutacje *EGFR* — wariant I, II i III. Najczęściej występuje wariant III mutacji, czyli *EGFR* vIII (ΔEGFR). Polega on na delecji regionu zawierającego eksony 2–7 (802 par zasad) genu, który odpowiada za syntezę zewnątrzkomórkowej domeny EGFR. Mutacja ta wiąże się z utratą miejsca wiążącego ligand i prowadzi do stałej, samoistnej aktywacji domeny kinazy tyrozynowej (ryc. 2). Fakt, iż wariantu III EGFR nie wykrywa się w komórkach zdrowego gruczołu piersiowego ani w ko-

mórkach łagodnych guzów piersi, zaś wykazano go w komórkach nowotworowych raka piersi, potwierdza, że odgrywa on istotną rolę w procesie rozwoju nowotworu złośliwego. Nadmierną ekspresję EGFRvIII wykrywa się w błonach komórek wielu nowotworów złośliwych (tab. 1). Ponadto stwierdzono występowanie tej zmutowanej formy receptora w jądrze komórek nowotworowych glejaków złośliwych i glejaka wielopostaciowego [9].

W komórkach nowotworowych obecność EGFRvIII zazwyczaj współistnieje z występowaniem prawidłowej



Rycina 2. Schematycznie przedstawione różnice pomiędzy prawidłową formą receptora czynnika wzrostu naskórka (EGFR) i jego nieprawidłową, zmutowaną formą (EGFRvIII) (wariant III mutacji)

Figure 2. Schematic differences between wild type epidermal growth factor receptor (EGFR) and mutant form of the receptor (EGFRvIII)

Tabela 1. Częstość występowania wariantu III mutacji receptora czynnika wzrostu naskórka (EGFRvIII) w różnych nowotworach [10–13]

Table 1. The frequency of mutation variant III of EGFR (EGFRvIII) in different neoplasms [10–13]

Typ nowotworu	Częstość występowania EGFRvIII (% przypadków)
Rak gruczołu krokowego	100
Nowotwory okolicy głowy i szyi	80
Rak wewnątrzprzewodowy piersi	78
Rak jajnika	75
Glejaki u dzieci	66
Rak żołądka	61
Glejak wielopostaciowy	58
Gwiaździaki	56
Niedrobnokomórkowy rak płuca	16

formy tego receptora (np. w glejakach wielopostaciowych) [14].

Warto podkreślić, że pomimo braku domeny zewnętrznej w EGFRvIII cetuksymab (przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko domenie zewnętrznej EGFR) rozpoznaje i wiąże się z tą formą receptora, powodując początkowo jego aktywację, a następnie internalizację i w konsekwencji zmniejszenie aktywności EGFRvIII [15]. Nie wpływa to jednak na nasilenie proliferacji czy wrażliwości na radioterapię komórek charakteryzujących się ekspresją EGFRvIII (np. w glejaku wielopostaciowym) [15].

W komórkach NDRP zidentyfikowano również mutacje odpowiedzialne za wrażliwość na działanie inhibitorów kinazy tyrozynowej, między innymi: mutację punktową L858R w eksonie 21. *EGFR* oraz delecję w eksonie 19. [16]. Co ciekawe, obecność tych mutacji wiąże się również z wrażliwością na radioterapię [17]. Natomiast mutacja T790M w eksonie 20, w wyniku której dochodzi do zamiany treoniny na metioninę w centrum katalitycznym kinazy tyrozynowej EGFR, wiąże się z brakiem wrażliwości komórek nowotworowych na działanie inhibitorów kinazy tyrozynowej w NDRP [18].

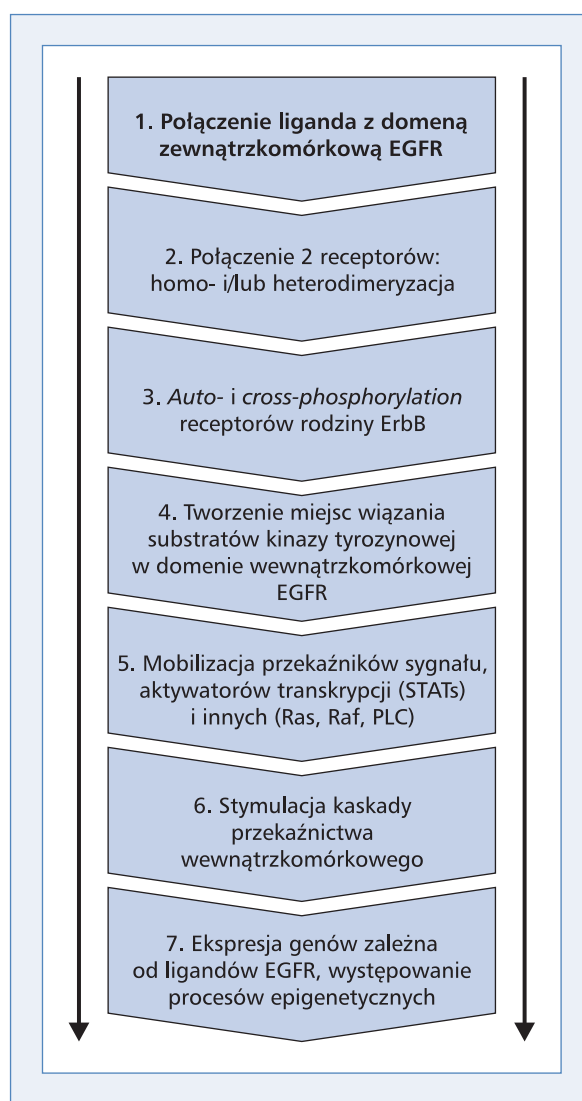
Po przyłączeniu liganda do EGFR dochodzi do zmiany konformacji cząsteczki receptora i do dimeryzacji. Jest to proces łączenia się dwóch receptorów. Połączenie jednakowych receptorów nazywa się homodimeryzacją, zaś o heterodimeryzacji mówi się, gdy dochodzi do interakcji dwóch różnych receptorów, na przykład EGFR i HER-2. Istnieje wiele możliwych kombinacji homo- i heterodimerów [19]. W wyniku tej interakcji dochodzi do optymalnego wykorzystania właściwości różnych receptorów ulegających połączeniu.

Związanie liganda z EGFR i dimeryzacja receptorów powoduje uruchomienie kaskady reakcji obejmujących różne szlaki przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego. Schematycznie przedstawiono to zjawisko na rycinie 3.

Siła sygnału komórkowego powstałego w wyniku swoistej reakcji liganda z EGFR zależy od:

- rodzaju i stężenia liganda;
- rodzaju receptora i nasilenia jego ekspresji;
- czasu trwania połączenia liganda z receptorem [20].

Nadmierna aktywność EGFR zależy od kilku ważnych zjawisk. Jeden ligand może wiązać się z wieloma typami receptorów z rodziny ErbB, a jednocześnie jeden receptor może wiązać wiele rodzajów ligandów. Mechanizm ten optymalizuje efektywność układu receptorowego, co w warunkach zdrowia jest zjawiskiem korzystnym. Brak aktywności szlaków stymulujących rozwój tkanek prowadzi do ich agenezji lub hipogenezy. Jednocześnie jest to zjawisko, które komplikuje terapeutyczne podejście do hamowania procesu nowotworzenia poprzez blokowanie receptorów błonowych. Gdyby za przekazanie sygnału odpowiadał tylko jeden receptor łączący się wyłącznie z jednym ligandem, zablokowanie

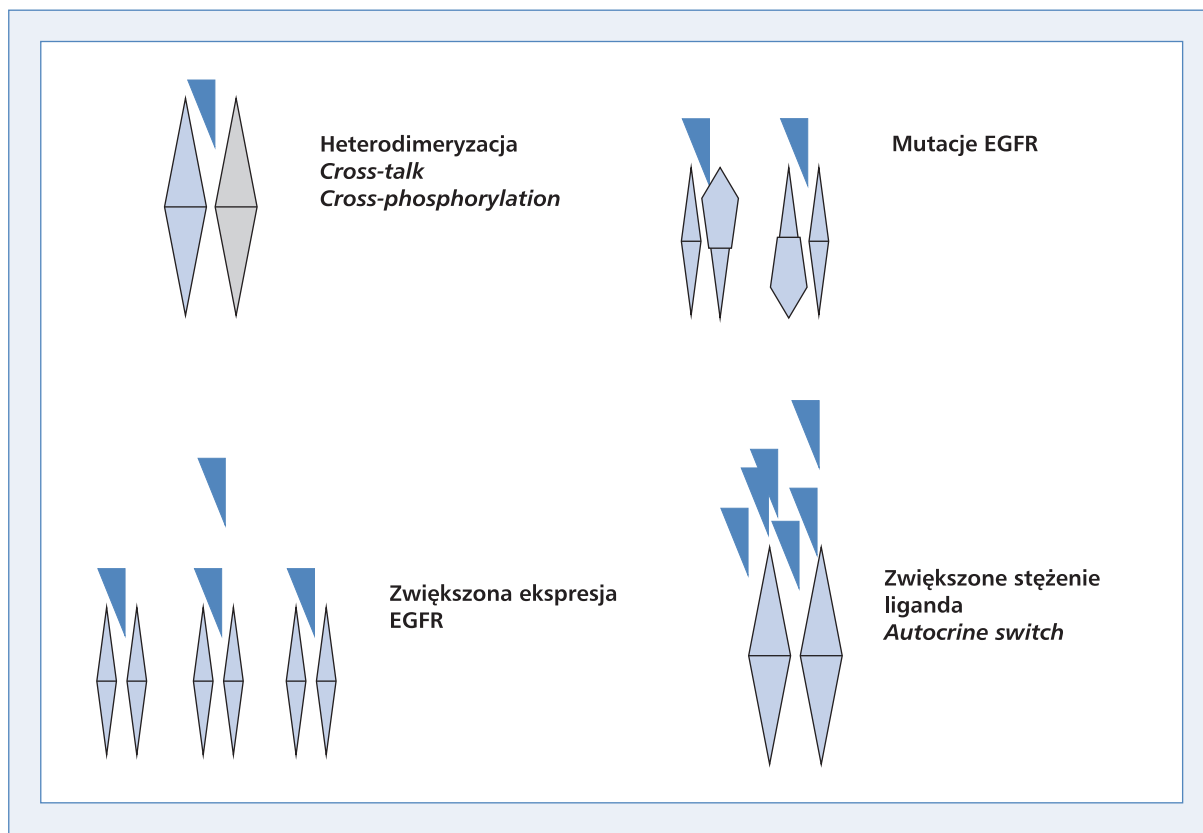


Rycina 3. Efekt pobudzenia receptora czynnika wzrostu naskórki (EGFR); STATs — przekazniki sygnału i aktywatory transkrypcji; Ras — szlak przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego; Raf — specyficzna kinaza serynowo-treoninowa; PLC — fosfolipaza C

Figure 3. Activation of epidermal growth factor receptor (EGFR). STATs — signal transducers and activators of transcription; Ras — rat sarcoma viral oncogene; Raf — murine sarcoma viral oncogene; PLC — phospholipase C

tego procesu byłoby stosunkowo proste. Wśród innych ważnych patomechanizmów nadmiernej aktywności EGFR wyróżnia się (ryc. 4):

- zwiększone stężenie liganda;
- zjawisko tzw. *autocrine switch*;
- heterodimeryzację;
- transaktywację (*cross-talk*);
- wymienną fosforylację (*cross-phosphorylation*);
- mutacje EGFR.



Rycina 4. Ważne mechanizmy nadmiernej aktywności receptora czynnika wzrostu naskórka (EGFR) [21]

Figure 4. Important mechanisms of EGFR (epidermal growth factor receptor) overexpression [21]

Zjawisko autocrine switch

W warunkach fizjologii substancja wydzielana przez jedną komórkę oddziałuje na komórkę sąsiednią (efekt parakryny). W przypadku zjawiska *autocrine switch* dochodzi do uniezależnienia się komórki od innych komórek. Wówczas komórka sama jest w stanie syntetyzować i wydzielać substancje, które następnie łączą się z receptorami znajdującymi się na jej własnej powierzchni i aktywują je (efekt autokryny) [22]. Jest to zjawisko przyczyniające się do progresji choroby nowotworowej.

Heterodimeryzacja

Heterodimeryzacją można wytłumaczyć wiele niewiadomych. Na uwagę zasługuje receptor HER-2 — dla którego nie zidentyfikowano liganda, oraz HER-3, który z kolei nie wykazuje aktywności kinazy tyrozynowej. Udowodniono, iż izolowana obecność receptora HER-2 lub HER-3 w błonie komórkowej nie prowadzi do przekazania impulsu do wnętrza komórki (brak możliwości utworzenia heterodimeru

HER-2/HER-3) [23]. Ponadto swoiste połączenie receptora HER-3 z neuregulina, bez utworzenia dimeru z HER-2, nie wiąże się z powstaniem efektu biologicznego. Heterodimeryzacja zaś umożliwia przeniesienie pobudzenia z domeny zewnętrznej HER-3 na domenę katalityczną HER-2. Dzięki temu zjawisku receptor HER-3 „korzysta” z domeny wewnątrzkomórkowej receptora HER-2.

Różnica pomiędzy heterodimerami a homodimerami EGFR polega między innymi na innej długości czasu przebywania danego kompleksu w obrębie błony komórkowej. Ze względu na większe powinowactwo do ligazy ubikwityny homodimery ulegają szybkiej internalizacji i proteolizie. Heterodimery, na przykład EGFR/HER-2 i EGFR/HER-3, pozostają na powierzchni błony komórkowej przez dłuższy czas [16]. Heterodimery zawierające HER-2 powodują dłuższą i silniejszą aktywację szlaków przekazywania, gdyż obecność tego receptora w dimerze:

- zwiększa powinowactwo liganda do partnera z kompleksu;
- zmniejsza dynamikę internalizacji kompleksu receptor–ligand;
- ułatwia ponowne wykorzystanie receptora [23, 24].

Wymienna fosforylacja (cross-phosphorylation)

Jest to wymienna fosforylacja kinaz tyrozynowych między receptorami pozostającymi w kompleksie. Warunkiem jej wystąpienia jest obecność podobnych fragmentów szlaków przekazywania wewnątrzkomórkowego, który jest specyficzny dla każdego dimera i zależy od rodzaju receptorów ulegających połączeniu.

Transaktywacja (cross-talk)

Jest to zjawisko wzajemnej aktywacji białek pozostających w różnych układach receptorowych. Opisano dwa mechanizmy transaktywacji:

- składowe kaskady kinazy tyrozynowej receptora z rodziny ErbB są fosforylowane przez domeny kinazy tyrozynowej receptora z innej grupy;
- pobudzenie receptora następuje w wyniku aktywności receptora z innej grupy [25].

Przykładem pierwszego mechanizmu jest interakcja, do jakiej dochodzi pomiędzy receptorem dla hormonu wzrostu a EGFR. W wyniku aktywacji kinazy tyrozynowej receptora dla hormonu wzrostu następuje aktywacja białka — kinazy tyrozynowej typu Janus (Jak, *Janus-type tyrosine kinase*), która z kolei fosforyluje tyrozynę jednej z domen kompleksu kinazy zależnej od EGFR, co prowadzi do aktywacji kinazy aktywowanej mitogenem (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*), będącej składową kaskady kinazy tyrozynowej EGFR [26]. Podobne zjawisko występuje w przypadku interakcji receptora HER-3 i kompleksu sygnałowego związanego z interferonem alfa ($INF-\alpha$, *interferon alpha*) [27]. Receptory cytokin i integryn mogą również transaktywować EGFR na tej drodze [28].

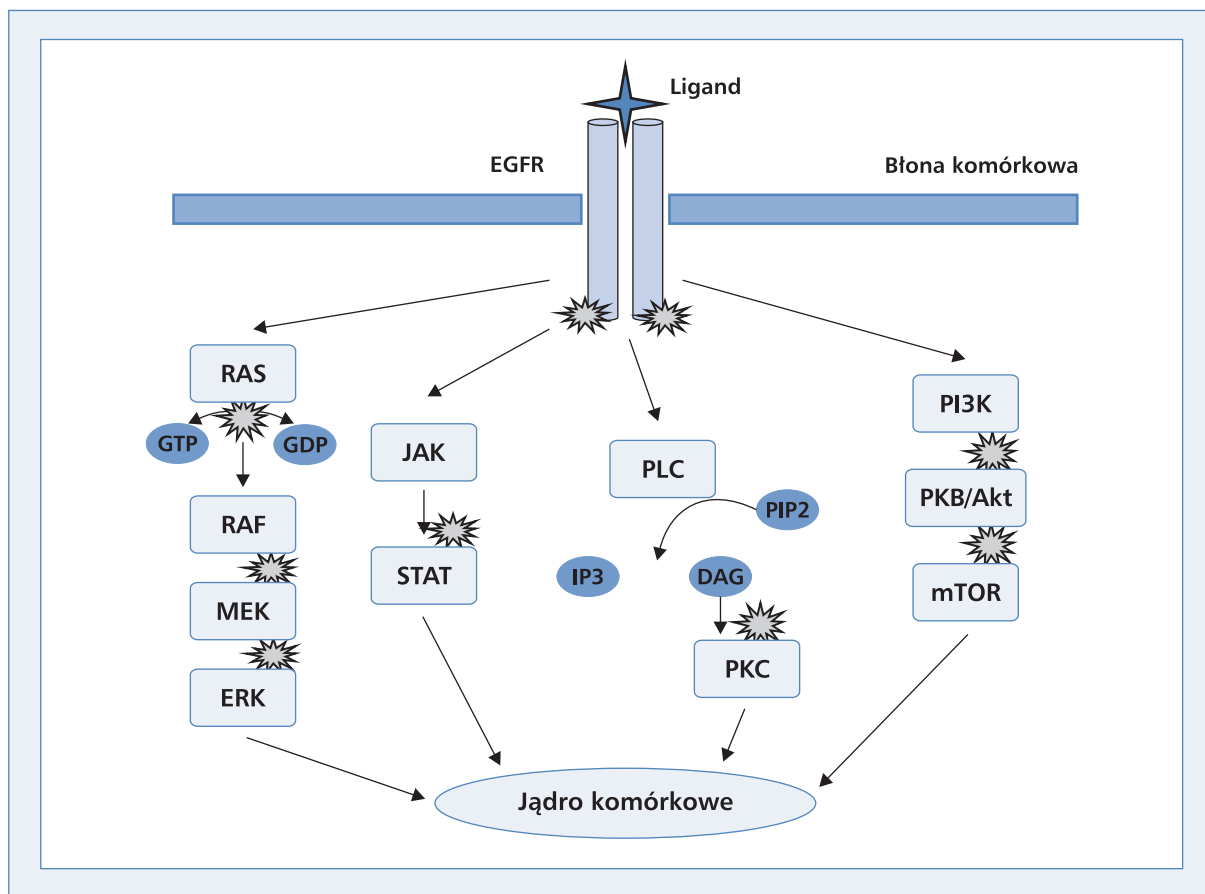
Drugi mechanizm występuje podczas transaktywacji EGFR poprzez receptory sprzężone z białkiem G (GPCRs, *G protein-coupled receptors*). Połączenie liganda (np. endoteliny, trombiny, bombazyny) z receptorem GPCR powoduje aktywację jednej z metaloproteinaz, która z kolei uwalnia prekursor czynnika wzrostu naskórka wiążącego heparynę (pro-HB-EGF, *pro-heparin-binding epidermal growth factor*) [29]. Powstały HB-EGF aktywuje EGFR na drodze auto- i parakrynej. Pod względem klinicznym istotna jest interakcja szlaków przekazywania między EGFR a receptorem dla insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1R, *insuline-like growth factor receptor 1*). Interakcja ta ma charakter dwojaki: pierwszy jest zależny od EGFR — pobudzenie IGF-1R prowadzi do aktywacji enzymu konwertującego czynnik martwicy guza alfa ($TNF-\alpha$, *tumor necrosis factor alpha*), który katalizuje reakcję odszczepienia peptydu od formy prekursorowej amfireguliny (pro-AR) i doprowadza do uwolnienia amfireguliny. Ta zaś jest

ligandem dla EGFR; drugi mechanizm, niezależny od EGFR, polega na aktywacji szlaku PI3K/AKT poprzez substraty IGF-R (IRS, *insulin receptor substrate*). Oba mechanizmy odgrywają rolę w proliferacji i przeżyciu komórek, a interakcję między tymi receptorami odnotowano w raku wątrobowokomórkowym i może ona po części tłumaczyć związek występowania tego nowotworu z zachorowaniem na cukrzycę [30].

Innym ciekawym mechanizmem, który może tłumaczyć mniejszą skuteczność kliniczną stosowanych dotychczas przeciwciał ukierunkowanych na EGFR i receptor czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (VEGFR, *vascular endothelial growth factor receptor*), jest zjawisko *cross-talk* pomiędzy tymi receptorami. Wewnątrzkomórkowe szlaki transdukcji sygnału EGFR i VEGFR nie są całkowicie niezależne. W związku z tym może dochodzić do interakcji pomiędzy składowymi obu tych szlaków (transaktywacja). Zahamowanie jednego z tych szlaków niwelowane jest przez sygnały pochodzące z pokrewnych fragmentów szlaku należącego do drugiego receptora. Zablockowanie obu tych receptorów może doprowadzić do całkowitego przerwania szlaku odpowiedzialnego za progresję choroby nowotworowej. Niektóre badania przedkliniczne potwierdziły, iż aktywność EGFR stymuluje syntezę VEGF w różnych guzach nowotworowych [31, 32]. Pobudzenie EGFR wiąże się ze zwiększoną syntezą VEGF. Proces ten może zostać całkowicie zablockowany przez inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR, co skutkuje zmniejszeniem unaczynienia guza, zmniejszeniem stężenia wykładników proliferacji komórek i pobudzeniem apoptozy [33, 34]. W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach wykazano lepszy efekt leczenia skojarzonego przeciwciałami anti-EGFR i anti-VEGFR niż monoterapii jednym przeciwciałem, chociaż w badaniach klinicznych skojarzenie tych dwóch leków wiązało się ze zwiększonym odsetkiem występowania działań niepożądanych [35–37].

Zjawisko transaktywacji elementów wchodzących w skład różnych układów receptorowych komplikuje efekt terapeutyczny inhibitorów EGFR i wymaga przeprowadzenia dalszych, wnikliwych badań.

Jak wspomniano wcześniej, efektem przyłączenia liganda do EGFR, a w następstwie jego dimeryzacji i pobudzenia, jest aktywacja szlaków przekazywania wewnątrzkomórkowego. Prowadzi to do proliferacji komórek, hamowania apoptozy, zwiększenia zdolności komórek do przeżycia, a także inwazji, tworzenia przerzutów oraz pobudzenia angiogenezy — a w konsekwencji do progresji choroby nowotworowej [38]. Aktywacja EGFR może powodować również oporność na radio- i chemioterapię [39, 40]. Próba podsumowania dostępnego piśmiennictwa na temat przekazywania wewnątrzkomórkowego związanego z EGFR i opisania wszystkich szlaków sygnałowych oraz powiązań między nimi byłaby ogromnym wyzwaniem przekraczającym



Rycina 5. Schemat transdukcji sygnału EGFR wewnątrz komórki. EGFR — receptor czynnika wzrostu naskórka; ERK — rodzina kinaz regulowanych sygnałem zewnątrzkomórkowym; MEK — kinaza białkowa, substrat ERK; RAF — specyficzna kinaza serynowo-treoninowa; RAS — białko, błonowa GTP-aza; JAK — rodzina kinaz tyrozynowych; STAT — cytoplazmatyczne czynniki transkrypcyjne; PLC — fosfolipaza C; DAG — diacyloglicerol, IP3 — 1,4,5-trifosforan inozytoli; PIP2 — 4,5-difosforan fosfatydyloinozytoli; PKC — rodzina kinaz białkowych C; PI3K — kinaza 3 fosfatydyloinozytoli; AKT — kinaza białkowa B; mTOR — kinaza serynowo-treoninowa

Figure 5. Schematic presentation of EGFR (epidermal growth factor receptor) signal transduction. ERK — extracellular signal-regulated kinase family; MEK — mitogen extracellular kinase, ERK substrate; RAF — murine sarcoma viral oncogene; RAS — rat sarcoma viral oncogene; JAK — tyrosine kinase family; STAT — signal transducers and activator of transcription; PLC — phospholipase C; DAG — diacyloglycerol, IP3 — inositol 1,4,5-triphosphate; PIP2 — phosphatidylinositol 4,5-diphosphate; PKC — protein kinase C family; PI3K — phosphatidylinositol-3 kinase; AKT — protein kinase B; mTOR — mammalian target of rapamycin

ramy niniejszego artykułu. Pod względem klinicznym istotne są dwa szlaki transdukcji sygnałów wewnątrzkomórkowych związanych z aktywacją EGFR: PI3K/AKT oraz RAS/RAF/MEK/ERK (ryc. 5).

Transdukcja sygnału wewnątrzkomórkowego szlakiem PI3K/AKT

Aktywny EGFR przyłącza kinazę 3-fosfatydyloinozytoli (PI3K), co doprowadza do jej aktywacji i do prze-

mieszczenia tego enzymu w pobliże błony komórkowej, gdzie znajdują się jego substraty. Kinaza PI3K katalizuje reakcję fosforylacji 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytoli (PIP2) do 3,4,5-trifosforanu fosfatydyloinozytoli (PIP3). Fosfolipid ten bierze następnie udział w aktywacji kinazy białkowej B (AKT), a ta z kolei aktywuje na drodze fosforylacji kolejne białka biorące udział w proliferacji, wzroście i przeżyciu komórek. Jednym z substratów dla AKT jest kinaza mTOR (*mammalian target of rapamycin*) [41]. Zaburzenia funkcjonowania AKT prowadzą, między innymi, do rozwoju wielu nowotworów i wystąpienia cukrzycy. Nadmierną ekspresję genów

kodujących AKT1 i AKT2 stwierdzono w nowotworach jajnika, gruczołu krokowego, trzustki, żołądka i piersi [42]. Kinaza AKT może również aktywować śródblonkową syntazę tlenu azotu, będącego jednym z ważnych czynników proangiogennych. Aktywacja szlaku kinazy białkowej B może również pobudzać metaloproteiny odpowiedzialne za inwazję i tworzenie przerzutów [43].

Transdukcja sygnału wewnątrzkomórkowego szlakiem RAS/RAF/MEK/ERK

Po pobudzeniu EGFR następuje aktywacja związanego z nim białka RAS. W proces ten zaangażowane są liczne białka adaptorowe, między innymi SHC (*Src homology/collagen homology*) i SOS (*son of sevenless*) należące do białek GEF (*guanine nucleotide exchange factor*). Białko RAS występuje w komórce w dwóch formach: nieaktywnej związanej z GDP oraz aktywnej związanej z GTP. Forma aktywna RAS-GTP pobudza kinazę serynowo-treoninową RAF na drodze licznych fosforylacji i defosforylacji. Aktywna postać RAF pobudza kolejno kinazy MEK (*miogen extracellular kinase*), a te z kolei — kinazy ERK (*extracellular regulated protein kinase*). W wyniku tego wieloetapowego procesu dochodzi do przeniesienia sygnału z błony komórkowej do jądra komórkowego, w którym następuje aktywacja czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za ekspresję białek zaangażowanych w proliferację i różnicowanie komórek [44, 45].

W praktyce klinicznej wykorzystuje się trzy mechanizmy hamowania funkcji receptora dla EGF:

- hamowanie funkcji domeny zewnątrzkomórkowej (cetuksymab, panitumumab, trastuzumab);
- hamowanie aktywności kinazy tyrozynowej (lapatinib, gefitynib, erlotynib, dasatynib);
- hamowanie aktywności enzymów biorących udział w transdukcji sygnału biologicznego do jądra komórkowego (sorafenib).

Każda z metod ma swoje ograniczenia biologiczne. Dotychczas poznano wiele istotnych mutacji *EGFR* dotyczących każdej z domen. Znane są również mutacje genów dla kinaz biorących udział w przenoszeniu sygnału. Efekt kliniczny powyższych zmian w strukturze białek może polegać na zwiększonej lub zmniejszonej wrażliwości na poszczególne leki. Część mutacji ogranicza użycie leków ukierunkowanych na cele molekularne, część z nich umożliwia wdrożenie leczenia. Niuanse dotyczące wykorzystania leków hamujących funkcję EGFR omówiono w artykułach dotyczących poszczególnych nowotworów.

Niepowodzenia związane z dotychczasowymi metodami blokowania funkcji EGFR skłoniły do poszukiwania innych możliwości hamowania sygnału wewnątrz

komórek nowotworowych. Podjęto próby zahamowania funkcji kinaz RAS, RAF, mTOR. Istnieje również grupa związków hamujących aktywność wielu kinaz. Jednak i te próby dotychczas nie przyniosły jednoznacznych rezultatów. Szlaki transdukcji sygnału wewnątrzkomórkowego z EGFR są o wiele bardziej złożone, niż zakładano. Być może przyczyną niepowodzeń są dotąd nieznanne mutacje aktywujące alternatywne drogi przekazywania sygnału, a być może powszechnie znane kaskady umożliwiające przenoszenie pobudzenia z EGFR do jądra komórkowego są jedynie niewielkim fragmentem metabolicznych szlaków komórkowych, których poznanie wymaga dalszych badań.

W tym kontekście niezwykle ciekawe jest, że w ostatnim czasie wykryto jądrową lokalizację EGFR [4, 9, 42–43]. Zaobserwowano, że jądrowy EGFR odpowiada za niekorzystny przebieg kliniczny choroby (niekorzystny czynnik prognostyczny). Duża zawartość jądrowego EGFR w komórkach nowotworowych wiązała się ze skróceniem czasu całkowitego przeżycia (OS, *overall survival*) u chorych na raka piersi, jamy ustnej i jajnika [41, 42] oraz czasu przeżycia wolnego od choroby (PFS, *progression free survival*) u chorych na raka środkowej części gardła [43].

Istnieje coraz więcej dowodów naukowych wskazujących na fakt, że niezależnie od tego, czy EGFR występuje w jądrze komórkowym stale, czy też jest do niego transportowany wskutek zastosowanego leczenia (terapii interferującej z aktywnością EGFR — np. zastosowania cetuksymabu; radioterapii; chemioterapii — np. podawania cisplatyny), odgrywa on rolę w oporności na zastosowane leczenie przeciwnowotworowe [44–49].

W jądrze komórkowym EGFR pełni wiele ważnych funkcji:

- mimo że cząsteczka EGFR nie posiada domeny wiążącej DNA, łączy się z czynnikami transkrypcyjnymi łączącymi się z DNA i w ten sposób, pełniąc funkcję kofaktora transkrypcji, aktywuje ekspresję wielu genów:
 - a) współdziałając z przekaźnikiem sygnału i aktywatorem transkrypcji 3 (STAT3, *signal transducer and activator of transcription 3*) zwiększa ekspresję indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS, *inducible nitric oxide synthase*) i cyklooksygenazy 2 (COX-2, *cyclooxygenase 2*) [9, 42],
 - b) współdziałając z E2F1, aktywuje ekspresję genu *B-Myb* [50],
 - c) współdziałając z STAT5, zwiększa ekspresję genu odpowiedzialnego za syntezę aurora A, biorącego udział w naprawie DNA [51],
 - d) prawdopodobnie poprzez oddziaływanie z mucyną 1 (MUC1) sprzyja akumulowaniu się EGFR związanego z chromatyną oraz istotnie wpływa na współwystępowanie EGFR i ufosforylowanej polimarezy II [52];

- jądrowy EGFR posiada aktywność kinazy tyrozynowej i prowadzi do fosforylacji wielu białek, między innymi jądrowego antygenu proliferacji komórkowej (PTEN, *proliferating cell nuclear antygen*), powodując zwiększenie stabilności tego białka, przez co pobudza proliferację komórek i naprawę DNA [53];
 - ułatwia naprawę DNA po zastosowanej radioterapii [17].
- Aktualnie trwają dalsze intensywne badania nad dokładniejszym poznaniem pełnej roli jądrowego EGFR.

Piśmiennictwo

1. Edwin F., Wiep G.J., Singh R. i wsp. A historical perspective of the EGF receptor and related systems. *Methods Mol. Biol.* 2006; 327: 1–24.
2. Laimer K., Spizzo G., Gastl G. i wsp. High EGFR expression predicts poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: A TMA-based immunohistochemical analysis. *Oral Oncol.* 2006; 43: 193–198.
3. Lo H.W., Hsu S.C., Ali-Seyed M. Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of iNOS/NO pathway. *Cancer Cell* 2005; 7: 575–589.
4. Lo HW. EGFR-targeted therapy in malignant glioma: novel aspects and mechanisms of drug resistance. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2010; 3: 37–52.
5. Salomon D.S., Brandt R., Ciardiello F. i wsp. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 1995; 19: 183–232.
6. Cohen S., Carpenter G. Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1975; 72: 1317–1321.
7. Richter A., Drummond D.R., Mac Garvie J., Puddicombe S.M., Chamberlin S.G., Davies D.E. Contribution of the transforming growth factor alpha B-loop beta-sheet to binding and activation of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 1612–1616.
8. Derynck R. The physiology of transforming growth factor-alpha. *Adv. Cancer Res.* 1992; 58: 27–52.
9. de la Iglesia N., Konopka G., Puram S.V. i wsp. Identification of a PTEN-regulated STAT3 brain tumor suppressor pathway. *Genes Dev.* 2008; 22: 449–462.
10. Wikstrand C.J., McLendon R.E., Friedman A.H., Bigner D.D. Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII. *Cancer Res.* 1997; 57: 4130–4140.
11. Garcia de Palazzo I.E., Adams G.P., Sundareshan P. i wsp. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res.* 1993; 53: 3217–3220.
12. Moscatello D.K., Holgado-Madruga M., Godwin A.K. i wsp. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res.* 1995; 55: 5536–5539.
13. Olapade-Olaopa E.O., Moscatello D.K., MacKay E.H. Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. *Br. J. Cancer* 2000; 82: 186–194.
14. Hatanpaa K.J., Burma S., Zhao D. i wsp. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia* 2010; 12: 675–684.
15. Jutten B., Dubois L., Younan L. i wsp. Binding of cetuximab to the EGFRvIII deletion mutant and its biological consequences in malignant glioma cells. *Radiother. Oncol.* 2009; 92: 393–398.
16. Wang Z., Shen D., Parsons D.W. i wsp. Mutational analysis of the tyrosine phosphatome in colorectal cancers. *Science* 2004; 304: 1497–1500.
17. Sierko E., Wojtkiewicz M.Z. Patofizjologiczne podstawy kojarzenia radioterapii z leczeniem ukierunkowanym na hamowanie funkcji EGFR. *Onkol. Prakt. Klin.* 2010; 5: 255–263.
18. Mitsudomi T., Kosaka T., Endoh H. i wsp. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 2513–2520.
19. Jones J.T., Akita R.W., Sliwkowski M.X. Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *F.E.B.S. Lett.* 1999; 447: 227–231.
20. Adamson E.D., Rees A.R. Epidermal growth factor receptors. *Mol. Cell Biochem.* 1981; 34: 129–152.
21. Arteaga C.L. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist* 2002; 7: 31–39.
22. Lu C., Kerbel R.S. Interleukin-6 undergoes transition from paracrine growth inhibitor to autocrine stimulator during human melanoma progression. *J. Cell Biol.* 1993; 120: 1281–1288.
24. Britten C.D. Targeting ErbB receptor signaling: a pan-ErbB approach to cancer. *Mol. Cancer Ther.* 2004; 3: 1335–1342.
25. Motoyama A.B., Hynes N.E., Lane H.A. The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res.* 2002; 2: 3151–3158.
26. Holbro T., Civenni G., Hynes N.E. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp. Cell Res.* 2003; 284: 99–110.
27. Zwick E., Hackel P.O., Prenzel N., Ullrich A. The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol. Sci.* 1999; 20: 408–412.
28. Walters D.K., Jelinek D.F. A role for Janus kinases in crosstalk between ErbB3 and the interferon-alpha signaling complex in myeloma cells. *Oncogene.* 2004; 23: 1197–1205.
29. Yamauchi T., Ueki K., Tobe K. i wsp. Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone. *Nature* 1997; 390: 91–96.
30. Yan Y., Shirakabe K., Werb Z. The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *J. Cell Biol.* 2002; 158: 221–226.
31. Desbois-Mouthon Ch., Cacheux W., Blivet-Van Eggelpoël M.J. i wsp. Impact of IGF-1R/EGFR cross-talk on hepatoma cell sensitivity to gefitinib. *Int. J. Cancer* 2006; 119: 2556–2566.
32. Akagi M., Kawaguchi M., Liu W. i wsp. Induction of neuropilin-1 ad vascular endothelial growth factor by epidermal growth factor in human gastric cancer cells. *Br. J. Cancer* 2003; 88: 796–802.
33. Kim S.J., Uehara H., Karashima T., Shepherd D.L., Killion J.J., Fidler I.J. Blockade of epidermal growth factor receptor signaling in tumor cells and tumor-associated endothelial cells for therapy of androgen-independent human prostate cancer growing in the bone of nude mice. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9: 1200–1210.
34. Kedar D., Baker C.H., Killion J.J., Dinney C.P., Fidler I.J. Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling inhibits angiogenesis leading to regression of human renal cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8: 3592–3600.
35. Hirata A., Ogawa S., Kometani T. i wsp. ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res.* 2002; 62: 2554–2560.
36. Jung Y.D., Mansfield P.F., Akagi M. i wsp. Effects of combination anti-vascular endothelial growth factor receptor and anti-epidermal growth factor receptor therapies on the growth of gastric cancer in a nude mouse model. *Eur. J. Cancer* 2002; 38: 1133–1140.
37. Shaheen R.M., Ahmad S.A., Liu W. i wsp. Inhibited growth of colon cancer carcinomas by antibodies to vascular endothelial and epidermal growth factor receptors. *Br. J. Cancer* 2001; 85: 584–589.
38. Saltz L.B., Lenz H., Hochster S. i wsp. Randomized phase II trial of cetuximab/bevacizumab/irinotecan (CB) versus cetuximab/bevacizumab (CB) in irinotecan refractory colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 248.
39. Wells A. EGF receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999; 31: 637–643.
40. Akimoto T., Hunter N.R., Buchmiller N., Mason K., Ang K.K., Milas L. Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5: 2884–2890.
41. Chakravarti A., Chakladar A., Delaney M.A., Latham D.E., Loeffler J.S. The epidermal growth factor receptor pathway mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary human glioblastoma cells in a RAS-dependent manner. *Cancer Res.* 2002; 62: 4307–4315.
42. Song G., Ouyang G., Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell Mol. Med.* 2005; 9: 59–71.
43. Yang J., Cron P., Good V.M., Thompson V., Hemmings B.A., Barford D. Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat. Struct. Biol.* 2002; 9: 940–944.

44. Troussard A.A., Costello P., Yoganathan T.N., Kumagai S., Roskelley C.D., Dedhar S. The integrin linked kinase (ILK) induces an invasive phenotype via AP-1 transcription factor-dependent upregulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). *Oncogene* 2000; 19: 5444–5452.
45. Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 2002; 110: 669–672.
46. Kolch W. Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/Mek/Erk signal transduction pathway. *Biochem. J.* 2000; 351: 289–305.
41. Kim J., Jahng W.J., Di Vizio D. The phosphoinositide kinase PIKfyve mediates epidermal growth factor receptor trafficking to the nucleus. *Cancer Res.* 2007; 67: 9229–9237.
42. Xia W., Wei Y., Du Y. Nuclear expression of epidermal growth factor receptor is a novel prognostic value in patients with ovarian cancer. *Mol. Carcinog.* 2009; 48: 610–617.
43. Lo H.W., Hsu S.C., Ali-Seyed M. Nuclear Interaction of EGFR and STAT3 in the Activation of iNOS/NO Pathway. *Cancer Cell* 2005; 7: 575–589.
44. Psyrrri A., Yu Z., Weinberger PM. i wsp. Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 5856–5862.
45. Carpenter G., Liao H.J. Trafficking of receptor tyrosine kinases to the nucleus. *Exp. Cell Res.* 2009; 315: 1556–1566.
46. Dittmann K., Mayer C., Fehrenbacher B. i wsp. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 31182–31189.
47. Dittmann K., Mayer C., Rodemann H.P. i wsp. Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity. *Radiother. Oncol.* 2005; 76: 157–161.
48. Wanner G., Mayer C., Kehlbach R., Rodemann H.P., Dittmann K. Activation of protein kinase Cepsilon stimulates DNA-repair via epidermal growth factor receptor nuclear accumulation. *Radiother. Oncol.* 2008; 86: 83–90.
49. Li C., Iida M., Dunn E.F., Ghia A.J., Wheller D.L. Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene* 2009; 28: 3801–3813.
50. Hsu S.C., Miller S.A., Wang Y., Huang M.C. Nuclear EGFR is required for cisplatin resistance and DNA repair. *Am. J. Transl. Res.* 2009; 1: 249–258.
51. Hanada N., Lo H.W., Day C.P., Pan Y., Nakajima Y., Hung M.C. Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. *Mol. Carcinog.* 2006; 45: 10–17.
52. Bitler B.G., Goverdhan A., Schroeder J.A. MUC1 regulates nuclear localization and function of the epidermal growth factor receptor. *J. Cell Sci.* 2010; 123: 1716–1723.
53. Wang S.C., Nakajima Y., Yu Y.L. i wsp. Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nat. Cell Biol.* 2006; 8: 1359–1368.