

## Aktivierende Mutationen im epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) beeinflussen das Therapieansprechen auf Hemmer der Signaltransduktion

Judith Loeffler-Ragg, Sergej Skvortsov, Heinz Zwierzina

Abteilung für Allgemeine Innere  
Medizin, Experimentelle Onkologie  
Medizinische Universität Innsbruck

### Zusammenfassung

Die Expression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) ist bei verschiedensten Tumoren mit einem aggressiveren klinischen Verlauf assoziiert, und stellt einen neuen Therapieangriffspunkt durch selektive Inhibierung der EGFR-Tyrosinkinase dar. Medikamente wie Gefitinib oder Erlotinib haben bereits Wirkung bei einigen Krebserkrankungen gezeigt. Weitere Studien zielen darauf ab, molekulare Marker zu finden, die das Ansprechen auf diese Therapie vorher-sagen können. Bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom wurden spezifische somatische EGFR-Mutationen gefunden, die mit einer klinischen Response auf Gefitinib oder Erlotinib korrelieren. Diese aktivierenden Mutationen verstärken das über den EGF-Rezeptor ausgelöste Wachstumssignal und gehen mit einer besseren Sensitivität für Signaltransduktionsinhibitoren einher.

Derartige pharmakogenetische Ergebnisse stellen ein molekulares Korrelat für ein Therapieansprechen dar und leiten damit eine neue Ära in der zielgerichteten Krebstherapie ein.

**Schlüsselwörter:** epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), EGFR-Tyrosinkinase, Pharmakogenomik

### Summary

Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) on malignant cells is associated with a more aggressive clinical course and represents a target for cancer therapy with selective inhibitors of the EGFR tyrosine kinase activity. Drugs such as gefitinib or erlotinib have shown to be effective in patients with malignant disorders. A major challenge, however, is represented by the prospective identification of subsets of patients that will benefit from therapy. In non-small cell lung cancer patients it has been shown that the expression of specific somatic mutations in the EGFR gene correlate with clinical responsiveness to gefitinib or erlotinib. The activating mutations lead to increased growth factor signaling and predict sensitivity to signal transduction inhibitors. These data represent a molecular correlate to treatment response and therefore have the potential to lead to a new era of targeted cancer therapy based on pharmacogenomic investigations.

**Keywords:** Epidermal growth factor receptor (EGFR), tyrosine kinase inhibitors, activating mutations, pharmacogenomics

### EGF-Rezeptor-Expression und malignes Wachstum

Während des letzten Jahrzehnts haben unsere Fortschritte im Verständnis der molekularen Wachstumsmechanismen von malignen Zellen zu einem tieferen Verständnis der Krebsentstehung geführt. Verschiedene Oberflächenstrukturen, die vermehrt oder ausschließlich auf Tumorzellen exprimiert sind, eignen sich zu gezielteren therapeutischen Interventionen als es die bisherigen Chemotherapeutika erlaubten. Eine besonders vielversprechende Zielstruktur, für die bereits Medikamente registriert bzw. in klinischer Entwicklung sind, ist der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) Rezeptor.

Der EGFR, auch HER1 genannt, ist ein 170 kDa großes Glykoprotein, das zu einer Gruppe von vier strukturell eng verwandten Wachstumsfaktor-Rezeptoren mit Tyrosinkinase (TK) Aktivität gehört, die als HER- (für „human EGF receptor“) oder ErbB-Familie bezeichnet wird. Er besteht aus einer extrazellulären Domäne für die Ligandenbindung, einer transmembranen Region und der intrazellulären Domäne mit der TK Aktivität (Mendelsohn, 2001). Die Bindung eines der physiologischen Wachstumsfaktoren TGF- $\alpha$  (Transforming Growth Factor- $\alpha$ ) oder EGF triggert die Dimerisierung von EGF Rezeptoren untereinander (homologe Dimere) bzw. von EGFR mit HER-2, -3 und -4, den anderen Rezeptoren der EGFR-Familie (heterologe Dimere). Damit unterscheidet sich EGFR grundsätzlich von dem „verwandten“ Wachstumsfaktor-Re-

**Tab 1: EGFR Expression in verschiedenen Tumorerkrankungen**  
(jeweils niedrigste und höchste publizierte Expressionsrate)

Bronchuskarzinom (nicht-kleinzellig)	50 – 90 %
Brustkrebs	15 – 80 %
Hals-Nasen-Ohren-Karzinom	70 – 90 %
Kolorektales Karzinom	45 – 80 %
Magenkarzinom	30 – 60 %
Nierenzellkarzinom	80 – 90 %
Ovarialkarzinom	35 – 60 %
Pankreaskarzinom	30 – 50 %
Prostatakarzinom	40 – 70 %

zeptor HER-2, der als einziger Wachstumsfaktor-Rezeptor ohne Bindung eines Liganden aktiviert wird.

Die Rezeptordimerisierung induziert ihrerseits eine Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinase und löst in der Folge intrazelluläre Signalkaskaden aus, die im Zellkern die Mitose stimulieren. Die zwei kritischen Wege der Signaltransduktion, die durch EGFR aktiviert werden, involvieren den Ras-Raf-MEK-ERK und den PI3K-PDK1-Akt Kinaseweg (Janmaat, 2003), die beide an Zellwachstum und -überleben beteiligt sind.

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR = HER1) wird von zahlreichen epithelialen Tumoren exprimiert (Tab 1). Seine gesteigerte Aktivität verstärkt die Generierung von Wachstumssignalen und fördert bei Tumorerkrankungen Zellproliferation, Gefäßneubildung (Angiogenese) sowie Invasion und Metastasierung, während die Apoptose reduziert wird. Dadurch verschiebt sich das physiologische Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose in Richtung eines vermehrten und unkontrollierten Zellwachstums.

**Blockade des EGF Rezeptors als zielgerichtete Krebstherapie**

Seit kurzem sind die niedermolekularen Quinazolinderivate Gefitinib (Iressa®) und Erlotinib (Tarceva®) für die Therapie nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome zugelassen und weitere Substanzen wie Canertinib (CI-1033) befinden sich in klinischer Entwick-

lung (Skvortsov, 2005). All diese Substanzen sind spezifische Hemmer der EGFR Tyrosinkinase und oral applizierbar. Sie blockieren die aktivierte Tyrosinkinase des EGF-Rezeptors und unterbrechen damit gezielt die bei Tumorerkrankungen involvierte Signalstrecke. Dies führt zur Hemmung von Zellproliferation, Angiogenese und Metastasierung sowie zur Verstärkung der Apoptose. In den durchgeführten klinischen Studien zeigte sich jedoch, dass nur eine relativ geringe Zahl der behandelten Patienten ansprach. Dies führte zu Spekulationen über unbekannte Resistenzmechanismen oder genetische Dispositionen von denen das Ansprechen abhängig ist. Überraschenderweise war zudem die Expression des EGF-Rezeptors bzw. ihr Ausmaß nicht entscheidend für das Therapieansprechen. So zeigt die Auswertung von Tumorbiopsien, die im Rahmen verschiedener Studien immunhistochemisch auf ihren Gehalt an EGFR untersucht wurden, keinen Zusammenhang zwischen der EGFR-Menge und dem objektiven Ansprechen auf Blockade der TK durch Gefitinib oder Erlotinib (Sirotnak, 2003). Somit ist es eine wissenschaftliche Herausforderung, Untergruppen von Patienten zu definieren, die von der Therapie mit EGFR blockierenden Substanzen profitieren können.

**Mutationen im EGFR-Gen als Prognosemarker**

Obwohl vieles darauf hindeutete, dass Patienten mit Adenokarzinom oder bronchoalveolärem Karzinom sowie Frauen und Nichtraucher einen

besonderen Nutzen von der Therapie mit TK-Inhibitoren haben, reichten die Daten nicht aus, um anhand dieser prätherapeutisch bekannten Parameter ein Therapieansprechen im individuellen Einzelfall vorherzusagen zu können (Pao 2004). Es wurde vermutet, dass sich als molekulare Marker für das Ansprechen auf Gefitinib der aktivierte d.h. phosphorylierte EGF-Rezeptor (pEGFR) oder bestimmte Gene eignen könnten, die für Proteine der nachgeschalteten Signalkaskade kodieren. Die zu Kaskadenmarkern wie dem STAT5-Cluster vorliegenden Daten (Natale, 2003) reichen jedoch nicht aus, um Rückschlüsse auf die Eignung als Prädiktoren für den Therapieerfolg zu ziehen.

Ausgehend von der Hypothese, dass die Gefitinib-induzierte Tumorschrumpfung auf somatische „gain-of-function“-Mutationen des EGF-Rezeptors zurückgehen könnte, untersuchten Lynch et al. Proben primärer Tumoren, die von Patienten mit einer deutlichen und lang andauernden klinischen Response auf Gefitinib stammten (Lynch, 2004). Dass es sich bei der Responder-Gruppe überwiegend um Frauen (6/9), Nichtraucher oder Exraucher (9/9) sowie fünf Patienten mit Adenokarzinom bzw. vier mit bronchoalveolärem Karzinom handelte, bestätigte frühere Erfahrungen, wonach diese Patientengruppen besonders von der Therapie profitieren. Als Kontrollgruppe fungierten sieben NSCLC-Patienten, bei denen die EGFR-Blockade keine Remissionen auslöste.

Bei acht der neun Patienten mit objektivem Therapieansprechen ließen sich in den für die Tyrosinkinase-Domäne kodierenden DNA-Abschnitten des EGF-Rezeptor-Gens (Exone 18-21) mehrere heterozygote Mutationen nachweisen. Zwei dieser Mutationen (Deletion L747-P753insS und Mutation L858R) kamen gleich bei mehreren Patienten vor. Bei den sieben Patienten ohne objektives Ansprechen wurden dagegen in keinem Fall aktivierende Mutationen nachgewiesen. Die Bindung des Liganden EGF an die mutierten EGF-Rezeptoren (Deletion L747-P753insS oder L858R) ging mit einer deutlich erhöhten Aktivität des EGF-Rezeptors einher. Zugleich blieben die mutierten Rezeptoren wesentlich länger aktiv als der Wildtyp-Rezeptor: Während dieser bereits nach circa 15 Minuten internalisiert und seine Aktivität entsprechend herunterreguliert wurde, blieben die beiden mutierten EGF-Rezeptoren bis zu drei Stunden aktiv. Damit war bei diesen Patienten das über den EGF-Rezeptor ausgelöste Wachstumssignal und der dadurch ausgelöste mitogene „Drive“ wesentlich stärker als bei den Patienten mit dem Wildtyp-EGF-Rezeptor. Zur gleichen Zeit und unabhängig davon fand die Arbeitsgruppe Paez et al. diese spezifischen EGFR-Mutationen ebenfalls bei Lungenkrebspatienten mit klinischem Ansprechen auf Tyrosinkinaseinhibitoren (Paez 2004). Aus weiteren Publikationen geht hervor, dass 85,9% dieser EGFR-Mutationen im Bereich der ATP-Bindungsdomäne liegen, kodiert durch Exon 19 und 21 (Pao und Miller 2005).

Allerdings tritt bei den meisten Patienten nach anfänglicher Response nach Monaten eine sekundäre Resistenz auf. Kürzlich wurde bei solchen Patienten eine Zweit-Mutation gefunden, die durch Konformationsänderung die Bindung der Tyrosinkinaseinhibitoren verhindert. Dies wiederum regt nun die Entwicklung von Medikamenten mit etwas anderer Bindungsstelle an (Kobayashi 2005, Pao 2005).

#### Ausblick

Die Entdeckung der genannten Mutationen in der Tyrosinkinase-Domäne des EGF-Rezeptors bei Patienten mit

nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom, die auf Hemmung der EGFR Tyrosinkinase mit einer deutlichen Tumorschrumpfung ansprechen, könnte eine neue Ära in der zielgerichteten Therapie („targeted therapy“) einleiten. Es gibt damit ein molekulares Korrelat für ein objektives Therapieansprechen. Trotz der großen Bedeutung der beschriebenen Untersuchungen ist jedoch zu bedenken, dass EGFR Blocker auch bei einigen Patienten ohne die genannten Mutationen Remissionen bzw. einen Stopp des weiteren Tumorwachstums auslösen, weshalb weitere pharmakogenomische Studien zur Charakterisierung anderer modifizierender Faktoren notwendig sind.

#### Literatur:

Janmaat, M, Kruyt, F, Rodriguez J, Giaccone G (2003) Response to epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer cells: limited antiproliferative effects and absence of apoptosis associated with persistent activity of extracellular signal-regulated kinase or Akt kinase pathways. *Clin Cancer Res* 9: 2316-2326

Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Janne PA, Kocher O, Meyerson M, Johnson BE, Eck MJ, Tenen DG, Halmos B (2005) EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to Gefitinib. *N Engl J Med*. 352(8):786-92.

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 20: 2129-2139

Mendelsohn J (2001) The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 8:3-9

Natale R, Shak S, Aronson N, Averbuch S, Fox W, Luthringer D, Clark K, Baker J, Cronin M, Agus D (2003) Quantitative gene expression in non-small cell lung cancer from paraffine-embedded tissue specimens: predicting response to gefitinib, an EGFR kinase inhibitor. *J Clin Oncol* 22, 190 (abstract 763)

Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M (2004) EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304(5676):1497-500.

Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H (2004) 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 U S A*. 101(36):13306-11.

Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, Kris MG, Varmus H (2005) Acquired Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib Is Associated with a Second Mutation in the EGFR Kinase Domain. *PLoS Med*. 2(3):e73

Pao W, Miller VA (2005) Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J Clin Oncol*. 23(11):2556-68.

Sirotnak FM (2003) Studies with ZD1839 in pre-clinical models. *Semin Oncol* 30, Suppl 1:12-20.

Skvortsov S, Skvortsova I, Sarg B, Loeffler-Ragg J, Lindner H, Lukas P, Tabernero J, Zwierzina H (2005) Irreversible pan-ErbB tyrosine kinase inhibitor CI-1033 induces caspase-independent apoptosis in colorectal DiFi cell line. *Apoptosis* (in press)

#### Korrespondenzadresse

Medizinische Universität Innsbruck  
Abteilung für Allgemeine Innere Medizin  
Experimentelle Onkologie  
Anichstr. 35  
A-6020 Innsbruck  
Tel. 0043-512-504-23255  
Fax 0043-512-504-24209  
Heinz.zwierzina@uibk.ac.at