

Tyrosinkinasereseptor-ras-ERK-signalveien som terapeutisk mål ved kreft

Eksperimentelle bevis indikerer at intracellulære signalkaskader er endret i tumorceller. Blant disse er tyrosinkinasereseptor-ras-ERK-signalveien funnet å være konstitutivt aktiv i en signifikant andel humane tumorer. Det er blitt lagt mye arbeid i å finne forbindelser som hemmer denne signalveien. Denne oversiktsartikkelen tar for seg utviklingen av nye forbindelser for å hemme den konstitutive aktiveringen av tyrosinkinasereseptor-ras-ERK-signalveien ved kreft. Blokkering av aktiveringen av tyrosinkinasereseptor-ras-ERK-signalveien ved hjelp av nye terapeutika (f.eks. tyrosinase-hemmere, antistoffer, FTase-hemmere, terapeutika rettet mot SH2/SH3, antisens, ribozymmer), hemmet tumorvekst. Noen av disse stoffene er blitt testet i kliniske forsøk, og lovende resultater er blitt oppnådd. Inaktivering av tyrosinkinasereseptor-ras-ERK-signalveien ved bruk av små molekylære hemmere, har bekreftet signalveiens deltakelse i tumorvekst. Molekylær og/eller farmakologisk modulering av komponentene som er kritisk involvert i aktiveringen av tyrosinkinasereseptor-ras-ERK-signalveien, forventes å forbedre behandlingen av kreft.

Kreft kan oppstå gjennom akkumulering av genetiske endringer, som resulterer i deregulering av mekanismene for kontroll av celledøds og celledød. En rekke genetiske endringer er blitt identifisert i humane krefttyper som potensielt er knyttet til malign transformasjon og progrediering. Det er eksperimentelle bevis for at intracellulære signalkaskader er endret i maligne celler (1). Intracellulære signalkaskader krysskommuniserer med hverandre i komplekse nettverk og har en viktig rolle i flere fysiologiske prosesser som differensiering, proliferasjon og apoptose (2, 3).

Endringer i signalveiene som kontrollerer apoptose kan føre til flere forskjellige sykdommer, deriblant kreft. Apoptose korresponderer til en rekke endringer som cellene går gjennom ved programmert eller indusert celledød. De apoptotiske signalene aktiveres

Marianne Leirdal

marianne.leirdal@labmed.uio.no

Mouldy Sioud

Avdeling for immunologi
Gruppe for molekylær medisin
Institutt for Kreftforskning
Det Norske Radiumhospitalet
Montebello
0310 Oslo

Leirdal M, Sioud M.

Receptor tyrosine kinase ras-ERK signal transduction pathway as therapeutic target in cancer.

Tidsskr Nor Lægeforen 2002; 122: 178–82.

Background. Experimental evidence indicates that various intracellular signalling cascades are altered in tumour cells. Among these, the receptor tyrosine kinase ras-ERK signalling pathway was found to be constitutively active in a significant percentage of human tumours; hence, considerable effort has been directed at finding compounds that inhibit its activation.

Material and methods. We review the recent progress in establishing novel approaches to interference with the constitutive activation of the receptor tyrosine kinase ras-ERK signalling pathway in cancer.

Results. Inhibition of the receptor tyrosine kinase ras-ERK signalling pathway activation by various novel agents (e.g. small molecule tyrosine kinase inhibitors, antibodies, FTase inhibitors, SH2/SH3 directed agents, antisense, ribozymes) impaired tumour growth. Some of the developed agents have been tested in clinical trials; promising results were obtained.

Interpretation. Inactivation of the receptor tyrosine kinase ras-ERK signalling pathway by small molecular inhibitors has confirmed its involvement in tumour growth. Thus, molecular and/or pharmacological modulation of the components that are critically involved in the constitutive activation of this pathway are expected to improve the treatment of human malignancies.

av forskjellige stimuli som konvergerer mot en felles dødsvei. Bcl-2-familien, som består av både antiapoptotiske medlemmer (f.eks. Bcl-2, Bcl-x_L) og proapoptotiske medlemmer (f.eks. Bik, Bax), fungerer som regulatorer i den apoptotiske prosessen (4, 5). Den apoptotiske prosessen kan deles inn i minst tre forskjellige faser: initierings-, effektor- og degraderingsfase (fig 1). Resistens til celledød ved apoptose spiller en fundamental rolle i tumorigenese.

Kreftterapi sikter på å oppnå en mest mulig selektiv effekt på maligne celler og minimal innvirkning på normale celler. Høy spesifisitet forutsetter en terapeutisk strategi som skiller mellom kreftceller og normale celler, og som kun angriper sitt molekylære mål. De forskjellige hemmerne som denne oversiktsartikkelen tar for seg, er mer spesifikke enn dagens kjemoterapi når det gjelder molekylært mål. Disse hennernes mål er derimot ikke spesifikke for kreftceller og man vil derfor kunne få uønskede effekter på normale celler. Denne oversiktsartikkelen tar for seg tyrosinkinasereseptor-ras-ERK-signalveien (tab 1) som et mulig terapeutisk mål ved kreftsykdommer.

Tyrosinkinasereseptor-ras-ERK-signalveien som terapeutisk mål

Tyrosinkinasereseptoren er det første leddet i en signalvei som starter i cellemembranen og går inn til kjernen. Denne signalveien har en viktig rolle i kontrollen av fundamentale cellulære prosesser, slik som cellyklus, migrasjon, metabolisme og overlevelse, proliferasjon og differensiering (6). Tyrosinkinasereseptor-ras-ERK-signalveien kobler signaleringen fra membranreseptorer til transkripsjonsfaktorer som kontrollerer genekspressjon (fig 2). Det finnes flere forskjellige tyrosinkinasereseptorer, blant disse er epidermal vekstfaktor-reseptor (EGFR) og platederivert vekstfaktor-reseptor (PDGFR). Peptidhormonet insulin gjenkjenner og binder seg til et medlem av tyrosinkinasereseptorfamilien.

Alle tyrosinkinasereseptorer består av et ekstracellulært ligandbindende domene som er forbundet til det cytoplasmatiske domenet via en enkelt transmembran heliks (6). Ligandbinding fører til aktivering av et stort antall forskjellige signalveier. En av de antatt viktigste signalveiene når det gjelder malign transformasjon er ras-ERK-signalveien. I forbindelse med kreft er denne signalveien ofte konstitutivt aktiv som følge av mutasjoner og overekspressjon (7). En oppsummering av hvordan de ulike elementene i tyrosinkinasereseptor-ras-ERK-signalveien kan hemmes, vil bli gitt nedenfor.

Tyrosinkinasereseptoren

Tyrosinkinasereseptorer er underlagt komplekse reguleringsmekanismer blant annet

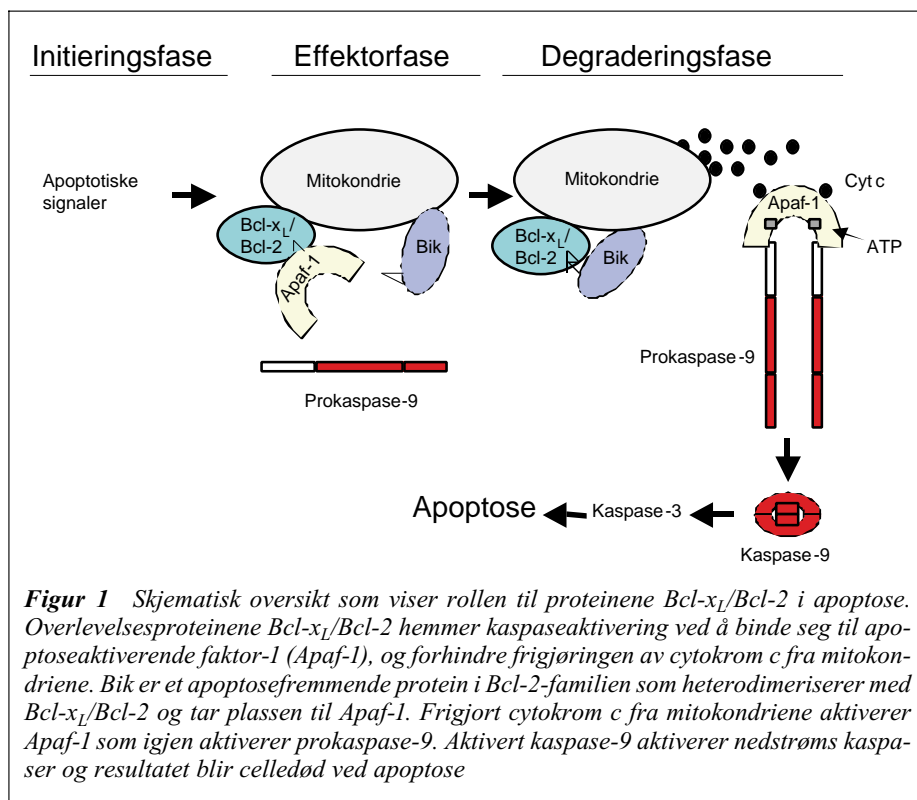
for attenuering og terminering av aktivitet induert av stimulerende ligander (6). Protein-tyrosinofosfataser spiller en viktig rolle i denne kontrollen ved å defosforilere fosfotyrosinresiduer og dermed hemme aktiviteten til tyrosinkinasereseptoren. I forbindelse med kreft er tyrosinkinasereseptorer ofte konstitutivt aktive som følge av mutasjoner (8). De normale mekanismene for terminering av signalet fungerer da ikke. I flere krefttyper er tyrosinkinasereseptorer overuttrykt (8). I en slik situasjon vil liganduavhengig signalering kunne oppstå.

En måte å hemme signaloverføringen fra tyrosinkinasereseptorer på er å utvikle syntetiske vekstfaktorantagonister. Syntetiske vekstfaktorantagonister kan gjenkjenne overflaten til vekstfaktoren og binde seg til denne. Vekstfaktoren blir dermed forhindret fra å binde seg til sin tyrosinkinasereseptor og signaloverføringen blokkeres (9). GFB-111 er et eksempel på en syntetisk vekstfaktorantagonist som binder seg til platerivert vekstfaktor (PDGF) og dermed forhindrer den fra å binde til sin reseptor. GFB-111 er vist å hemme glioblastoma (U87MG)-tumorvekst i mus opptil 80 % (9). Antagonister for bestemte vekstfaktorer kan til en viss grad interagere med beslektede vekstfaktorer.

Det er også blitt utviklet anti-EGFR-monoklonale antistoffer som konkurrerer med ligandbinding og dermed blokkerer aktiviteten til tyrosinkinasereseptoren (10). IMC-C225 er det eneste anti-EGFR-monoklonale antistoff som er kommet til fase II/III-studier (tab 2) (10). I en fase I/II-studie ble IMC-C225 gitt i kombinasjon med konvensjonell stråleterapi til pasienter med kreft i hode/nakke (10). Det ble observert 100 % respons, og 13 av 15 pasienter oppnådde komplett remisjon. Forventet responsrate i denne pasientpopulasjonen med stråleterapi alene er 60 % (10). Kliniske fase III-studier med konvensjonell stråleterapi pluss/minus IMC-C225 er nå i gang. I en annen klinisk fase I/II-studie, ble IMC-C225 gitt i kombinasjon med cisplatin til pasienter med langt fremskreden kreft i hode/nakke. Av ni evaluerbare pasienter hadde seks pasienter komplett eller delvis respons (10). To av de tre resterende pasientene hadde stabilisering av sykdommen.

Her-2 er et annet medlem av EGFR-familien, som består av fire homologe reseptorer. Monoklonale antistoffer er også blitt utviklet mot Her-2. Ett av disse er Herceptin, som allerede er registrert som legemiddel og ute på markedet. Monoklonale antistoffer mot EGFR og Her-2 viser god effekt i kombinasjon med diverse kjemoterapeutiske stoffer og strålebehandling (10).

Den katalytiske funksjonen til tyrosinkinasereseptoren involverer overføring av en fosfatgruppe fra ATP til en hydroksylgruppe på en tyrosinresidu (6). Både tyrosinhydroksylgruppen og ATP representerer utgangspunkter for konstruksjon av substrat-



Figur 1 Skjematisk oversikt som viser rollen til proteinene Bcl-x_L/Bcl-2 i apoptose. Overlevelsesproteinene Bcl-x_L/Bcl-2 hemmer kaspaseaktivering ved å binde seg til apoptoseaktiverende faktor-1 (Apaf-1), og forhindre frigjøringen av cytochrom c fra mitokondriene. Bik er et apoptosefremmende protein i Bcl-2-familien som heterodimeriserer med Bcl-x_L/Bcl-2 og tar plassen til Apaf-1. Frigjort cytochrom c fra mitokondriene aktiverer Apaf-1 som igjen aktiverer prokaspase-9. Aktivert kaspase-9 aktiverer nedstrøms kaspaser og resultatet blir celledød ved apoptose

analoger og kompetitive hemmere av tyrosinkinase. Quinazolinbaserte forbindelser representerer en klasse kompetitive hemmere av ATP-bindingssitet (11). Noen av disse

er svært selektive for EGFR, som er overuttrykt i et stort antall krefttyper (10). To quinazoliner, Iressa og OSI-774, er blitt/blir evaluert i kliniske fase II/III-studier (tab 1) (10, 11). I en klinisk fase II-studie ble Iressa testet ut på 16 pasienter med ikke-småcellet lungekreft. I denne studien ble det observert seks pasienter med respons (10, 11). Flere større kliniske fase II-studier er underveis. OSI-774 ble i en klinisk fase II-studie testet ut på 71 pasienter med kreft i hode/nakke hvor det ble observert 31 pasienter med respons (11). Basert på likheter i ATP-bindingssitet til Her-2 og EGFR er det blitt utviklet en tyrosinkinasehemmer, CI-1033, som er vist å hemme både Her-2 og EGFR i tumorceller (11). CI-1033 er også vist å være selektiv når det gjelder tyrosinkinaser som ikke hører til EGFR-familien. Kliniske fase I-studier er nylig blitt startet (tab 2) (11).

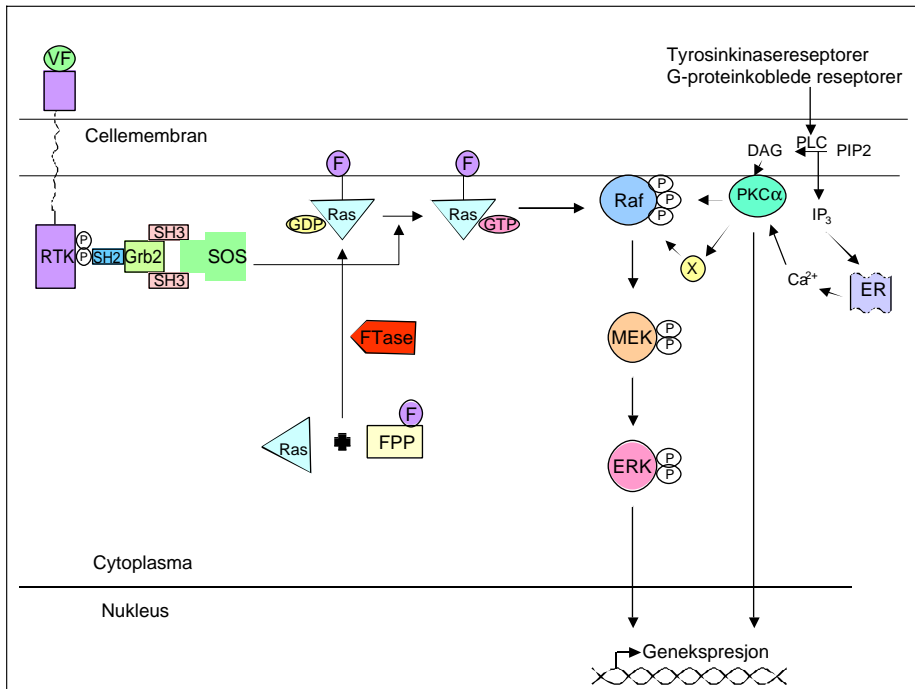
Spesifisiteten til tyrosinkinasehemmere er kun relativ og disse molekylene vil kunne ha en viss effekt også på andre kinaser i cellen. For å oppnå bedre spesifisitet vil det være viktig å identifisere alle kinaser. Ved å sammenlikne den primære sekvensen til ATP-bindingssitet i de forskjellige kinasene, vil man kunne utvikle mer spesifikke tyrosinkinasehemmere.

Vekstfaktorreseptorbindende protein-2 (Grb2)

Til den aktive tyrosinkinasereseptoren rekrutteres såkalte adaptermolekyler (fig 2). Slike adaptermolekyler kobler tyrosinkinasereseptorer til intracellulære signalveier blant annet ved å fungere som en adapter

Tabell 1 Forkortinger

Apaf-1	Apoptoseaktiverende faktor-1
ATP	Adenosintrifosfat
bFGF	Basisk fibroblastisk vekstfaktor
DAG	Diasylglyserol
EGF	Epidermal vekstfaktor
EGFR	Epidermal vekstfaktorreseptor
ER	Endoplasmatisk retikulum
ERK	Ekstracellulær signalregulert proteinkinase
FTase	Farnesyltransferase
GDP	Guanindifosfat
Grb2	Vekstfaktorreseptorbindende protein-2
GTP	Guanintrifosfat
IP ₃	Inositoltrifosfat
MAPK	Mitogenaktivert proteinkinase
MEK	ERK-kinase
PDGF	Platerivert vekstfaktor
PDGFR	Platerivert vekstfaktorreseptor
PIP2	Fosfoinositoldifosfat
PKCα	Proteinkinase Cα
PLC	Fosfolipase C
SH2	Src homologi-2
SH3	Src homologi-3
Sos	Son of sevenless



Figur 2 Skjematiske oversikt over tyrosinkinasereseptor-ras-ERK-signalveien. Signalveien starter ved at en vekstfaktor (VF) binder seg til tyrosinkinasereseptoren, noe som resulterer i autofosforylering og stimulering av tyrosinkinaseaktivitet. Src-homologi 2 (SH2)-domenet på adaptermolekylet vekstfaktorreseptorbindende protein-2 (Grb2) binder seg til fosforylerte tyrosinresiduer på reseptoren. Src-homologi 3 (SH3)-domenene til Grb2 binder seg til Sos (Son of sevenless). Sos translokerer til plasmamembranen og binder seg til Ras som aktiveres ved utbytting av GDP med GTP. Ras må gjennom flere posttranslasjonelle modifiseringer, deriblant farnesylering for å kunne lokaliseres til plasmamembranen. Farnesyleringen skjer ved at enzymet farnesyltransferase (FTase) overfører en farnesylgruppe (F) fra farnesyldifosfat (FPP) til Ras. Aktivert Ras rekrutterer Raf til plasmamembranen og Raf aktiveres. Aktivert Raf fosforylerer og aktiverer ERK-kinase (MEK) som igjen fosforylerer og aktiverer ekstracellulær signalregulert protein-kinase (ERK). ERK translokerer til nukleus hvor den kan regulere genekspressjon ved fosforylering av transkripsjonsfaktorer. Proteinkinase C (PKC) aktiveres blant annet av diacylglycerol (DAG) og Ca^{2+} . Fosfolipase C (PLC) hydrolyserer fosfoinositoldifosfat (PIP₂) til DAG og inositoltrifosfat (IP₃). IP₃ går ut i cytosol og påvirker endoplasmatiske retikulum (ER) til å slippe ut Ca^{2+} . PKC α kan aktivere Raf direkte ved fosforylering eller muligens indirekte gjennom en ukjent komponent (X). PKC α kan også translokere til nukleus

Tabell 2 Ulike hemmere av tyrosinkinasereseptor-Ras-ERK-signalveien i kliniske studier

Navn på medikament	Type medikament	Mål	Krefttyper	Nivå
Iressa	Tyrosinkinasehemmer	Epidermal vekstfaktorreseptor	Lunge, prostata, hode/nakke	Fase II/III
OSI-774	Tyrosinkinasehemmer	Epidermal vekstfaktorreseptor	Lunge, bryst, eggstokk hode/nakke	Fase I/II
CI-1033	Tyrosinkinasehemmer	Epidermal vekstfaktorreseptor + Her-2	Bryst, lunge, eggstokk	Fase I
IMC-C225	Monoklonalt antistoff	Epidermal vekstfaktorreseptor	Bryst, eggstokk, tykktarm, hode/nakke	Fase II/III
SCH66336	Farnesyltransferasehemmer	Farnesyltransferase	Bukspyttkjertel/blære	Fase II

mellom fosfotyrosinresiduer på tyrosinkinasereseptoren og et prolinrikt område på Sos (Son of sevenless). Grb2 er et slikt adaptermolekyl som gjennom sitt Src-homologi 2 (SH2)-domene gjenkjenner fosfotyrosinresiduer på tyrosinkinasereseptoren, og gjennom sine Src-homologi 3 (SH3)-domener gjenkjenner Sos (12). Sos translokerer dermed til cellemembranen og binder til Ras som aktiveres ved utbytting av GDP med GTP (12) (fig 2). Forbindelser som effektivt kan ødelegge Grb2-SH2-reseptor-interaksjoner eller Grb2-SH3-Sos-interaksjoner kan potensielt tenkes å blokkere veksten av maligne celler som er avhengige av aktiverte ras-proteiner.

Fosfotyrosinpeptidet CGP78850 er vist å blokkere EGFR-SH2-Grb2-interaksjonen og hemme proliferasjonen til brystkreftceller med overekspressjon av EGFR (13). Peptiddimerer bestående av to prolinrike sekvenser fra Sos linket sammen med en lysinkjede er vist å hemme Grb2-Sos-interaksjonen og ha en antiproliferativ effekt på fibroblaster transfektert med onkogen Her-2 (14, 15). Grb2-SH3-Sos-peptiddimeren ble funnet å være spesifikk i forhold til andre proteiner med SH3-domener (14).

Ved onkogen aktivering av tyrosinkinasereseptoren er overføringen av det transformerende signal avhengig av den normale aktiviteten til Ras (8). Derimot i celler hvor Ras er mutert og konstitutivt aktiv og ikke lenger avhengig av aktiviteten til Sos og Grb2, vil det ikke ha noen hensikt å angripe signalveien ovenfor Ras.

Ras

Ras-familien består av H-ras, N-ras og K-ras. Ras er hyppig mutert i forskjellige krefttyper og finnes da låst i en aktiv GTP-bundet konformasjon (12). Denne konstitutive aktiveringen antas å representere en viktig faktor i malign vekst. De vanligst observerte Ras-mutasjoner befinner seg på steder som er kritiske for Ras-regulering, nemlig kodon 12, 13 og 61 (12). I tillegg dereguleres Ras ved konstitutiv aktivering av andre protoonkogener og ved inaktivering av tumorsuppressorgener.

Ras må gjennom flere posttranslasjonelle modifikasjoner for å oppnå full biologisk aktivitet. Disse modifikasjonene inkluderer farnesylering som det første steg i prosessen (fig 2) (16). Farnesyleringen foregår ved at farnesyltransferase (FTase) overfører en farnesylgruppe fra farnesyldifosfat (FPP) til Ras (16). Selv om Ras går gjennom flere posttranslasjonelle steg er kun farnesyleringen nødvendig for lokalisering til plasmamembranen og transformerende aktivitet (16). Derfor har det blitt foreslått at aktiviteten til onkogen Ras skal kunne blokkere ved å hemme FTasen som katalyserer denne modifikasjonen. Både kjemiske og naturlige hemmere er tilgjengelige. FTase-hemmere er blitt vist å øke livslengden til mus som har fått human glioblastoma implantert intrakra-

nialt (17). Ras-transgene mus som utvikler aggressiv brystkreft er blitt behandlet med FTase-hemmere, hvor resultatet ble regresjon av tumor til udetekterbare nivåer (17). Forskjellige FTase-hemmere (R115777, L-778,123, SCH66336) blir testet ut i kliniske fase I/II-studier (tab 2) (17). R115777 ble evaluert i en klinisk fase I-studie som gikk over 21 dager hvor det ble observert klinisk aktivitet i seks av 20 pasienter med akutt leukemi (17).

Andre proteiner enn ras kan også være mål for FTase-hemmere og spørsmålet er hvilke av disse som kan være avgjørende for tumoroverlevelse og onkogenese. FTase-hemmere har vist seg å ikke ha noen særlig effekt på proliferasjonen av normale celler, noe som ikke er fullt ut forstått (16).

Raf

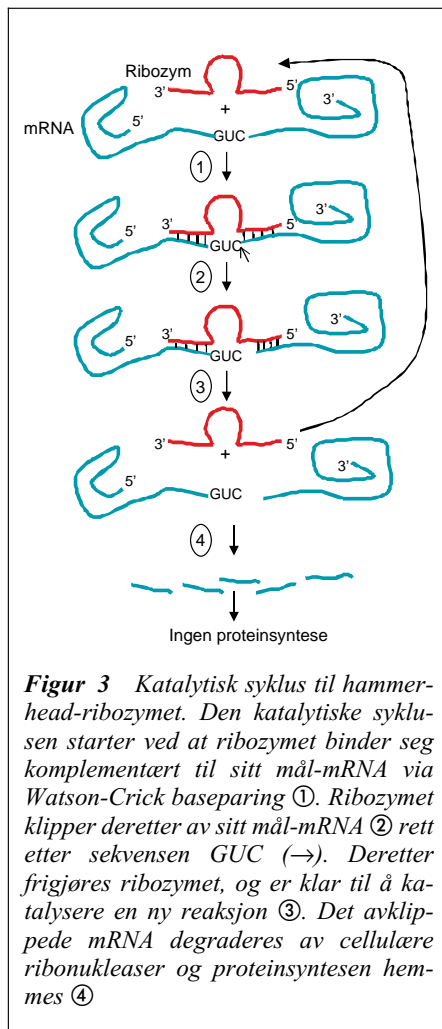
Aktivert ras rekrutterer raf til plasmamembranen og leder til aktivering av raf (fig 2). Mutert raf er konstitutivt aktiv og har transformerende potensial *in vitro* (18). I tillegg er raf-mutasjoner blitt identifisert i et stort antall tumorformer i dyremodeller (19). Raf aktiveres også uavhengig av mutasjoner i tumorceller med konstitutivt aktive tyrosinkinasereseporer eller ras (7). I lys av dette bør kinasen raf være et potensielt verdifullt terapeutisk mål i behandlingen av kreft.

En potent og spesifikk hemmer av raf *in vitro* er ZM336372, som er kompetitiv i forhold til ATP (20). *In vivo* ble ZM336372 paradoksalt nok funnet å gi en signifikant aktivering av raf uten å indusere aktivering av MEK og ERK. Dette forklares ved at cellen inneholder høy raf-kinaseaktivitet som på grunn av hemmeren forhindres fra å aktivere sitt nedstrøms substrat MEK. Det spekuleres i om raf ved hjelp av en negativ tilbakekoblingsløype muligens undertrykker sin egen aktivering. Hvis dette er tilfelle, så vil hemming av raf-aktiviteten føre til at denne negative tilbakekoblingsløyfen brytes og resultatet blir reaktivert. Hemming av kinaseaktiviteten til raf er muligens ikke noen god fremgangsmåte for utviklingen av terapeutika mot kreft (20). Klinisk testing av raf-hemmere vil muligens kunne føre til en oppklaring i dette.

Det er også vist at proteinkinase C α (PKC α), som er en av 12 isoformer i PKC-familien, aktiverer raf direkte ved fosforylering (fig 2) (21). Hemming av kinaseaktiviteten til PKC α vil da kunne bidra til inhibering av raf-MEK-ERK-signalveien.

ERK-kinase (MEK)/ekstracellulær signalregulert proteinkinase (ERK)

Aktivert raf fosforylerer og aktiverer MEK (fig 2). Konstitutiv aktivering av MEK er vist å resultere i cellulær transformasjon (7). MEK er ikke blitt identifisert som et onkogen produkt men er et samlingspunkt for mange mitogene signalveier aktivert av onkogener (7). Små molekyllære forbindelser



Figur 3 Katalytisk syklus til hammerhead-ribozymet. Den katalytiske syklusen starter ved at ribozymet binder seg komplementært til sitt mål-mRNA via Watson-Crick baseparing ①. Ribozymet klipper deretter av sitt mål-mRNA ② rett etter sekvensen GUC (→). Deretter frigjøres ribozymet, og er klar til å katalysere en ny reaksjon ③. Det avklippede mRNA degraderes av cellulære ribonukleaser og proteinsyntesen hemmes ④

som hemmer aktiviteten til MEK er blitt identifisert (7). PD098059 er en syntetisk hemmer som blokkerer aktiveringen av MEK1 og i mindre grad MEK2 (22). PD184352 er også en hemmer av MEK og er vist å hemme tumorvekst hos mus med tykktarmskreft i opptil 80% av tilfellene (23). Kliniske fase I-studier med denne hemmeren er startet (7). Begge disse MEK-hemmerene er ikke-kompetitive med respekt på begge MEK-substratene ERK og ATP. Dette er konsistent med en allosterisk hemmingsmekanisme. Celleforsøk med MEK-hemmer i kombinasjon med kjemoterapi har vist god effekt (7).

Aktivert MEK fosforylerer og aktiverer ERK (fig 2). Det er så langt ikke blitt beskrevet noen selektiv hemmer for ERK i litteraturen. Men ERK- og MEK-hemmer kan forventes å ha samme virkning siden ERK kun kan aktiveres av MEK (7).

Nukleinsyrer som en potensiell ny generasjon terapi

I tillegg til de ulike hemmerene som til nå er blitt beskrevet, vil også nukleinsyrer kunne utgjøre en potensiell ny generasjon terapi. Med nukleinsyrer menes antisensoligonu-

kleotider, ribozymmer og DNA-enzymmer, som binder seg komplementært til sitt mål-mRNA via Watson-Crick baseparing. På grunn av spesifisiteten til Watson-Crick baseparing er denne teknologien forventet å interferere kun med målgenene. Nukleinsyresekvensen for ett bestemt gen er unik og man vil derfor forvente høy spesifisitet og mindre sideeffekter. Det vil være mulig å spesifikt hemme ett enkelt medlem i en familie av beslektede gener, som for eksempel isoenzymer.

Et antisensoligonukleotid rettet mot raf, ISIS 5132, er funnet å hemme tumorvekst *in vitro* og *in vivo* (24, 25). Pasienter med langt fremskreden kreft ble behandlet med ISIS 5132 i et klinisk forsøk. Det ble observert signifikant reduksjon av genekspressjonen til raf i perifere mononukleære celler fra blod etter tre dager i 13 av 14 pasienter. Kliniske forbedringer ble observert i to pasienter (24).

Hammerhead-ribozymer er RNA-molekyler som konstrueres til å klippe av ett bestemt mRNA. Ribozymet disosierer fra sitt mål etter avklipping og det samme molekylet kan angripe et nytt mRNA (katalytisk syklus) (fig 3).

Ribozymmer kan leveres til cellene både endogent og eksogent. Eksogen levering skjer ved at presyntetiserte molekyler kompleksert med kationiske lipider leveres til cellene. Fordelen med eksogen levering er at man kan få lokal eller systemisk levering. Endogen levering skjer ved kloning av ribozymgenet inn i en ekspressjonsvektor som deretter leveres inn i cellene (genterapi). Fordelen med endogen levering er at man får kontinuerlig ekspressjon av ribozymet.

Et ribozym rettet mot aktivt H-ras kodon 12 er blitt vist å skille mellom konstitutivt aktivt onkogen og normalt H-ras både *in vitro* og i transformerte celler (26). En punktmutasjon i H-ras-kodon 12 forandrer sekvensen fra GGC til GUC, som er målsekvens for hammerhead ribozymmer. Denne punktmutasjonen gjør H-ras konstitutivt aktiv og onkogen (26).

I vår forskning har vi benyttet oss av ribozymmer og DNA-enzymmer for å undersøke de biologiske rollene til spesielt proteinet PKC α i forbindelse med tumorcellers vekst. Ved spesifikk hemming av PKC α ved bruk av enten nukleaseresistente ribozymmer eller DNA-enzymmer ble det induert apoptose i sensitive celler (27, 28). I tillegg til at proteinnivået til PKC α ble nedregulert ble også celleoverlevelsesproteinene Bcl-x $_L$ funnet å være nedregulert. Resultatene indikerer at ekspressjonen og/eller aktiviteten til Bcl-x $_L$ er under kontroll av PKC α -signalveien (27, 28). Aktiveringen av MAP-kinasene ERK1/2 ble også hemmet. I maligne gliomceller ser det ut til at ERK1/2 blir aktivert gjennom PKC α signalveien (29). En signifikant nedregulering av basisk fibroblastisk vekstfaktor (bFGF) ble også observert etter spesifikk hemming av PKC α ved DNA-en-

zymer. For å undersøke om ERK1/2 er nødvendig for ekspresjonen av bFGF i humane maligne gliomaceller benyttet vi oss av PD098059, som er en spesifikk hemmer av MEK. Det ble da som forventet observert en hemming av ERK1/2-aktivitet, og i tillegg ble ekspresjonen av Bcl-x_L og bFGF funnet å være nedregulert (29). Disse resultatene tyder på at det er MEK som binder PKCα til ERK1/2-signalveien i humane maligne gliomaceller. I disse cellene er ERK-signalveien mest sannsynlig en overlevelsessignalvei som kontrollerer ekspresjonen av Bcl-x_L og bFGF (29). Observasjonene demonstrerer at PKCα-ERK1/2-signalveien er viktig for malign glioma-celleproliferasjon. Spesifikk blokkering av denne signalveien ved bruk av nukleinsyre-enzym induerte celledød. Denne signalveien kan derfor utgjøre et viktig terapeutisk mål.

Ribozymmer mot PKCα ble funnet å hemme malign glioma-tumorvekst i en rottemodell. Det ble gjort en enkelt injeksjon av PKCα-ribozymmer inn i tumor. 20 dager etter ble vekten av de ubehandlede tumorene funnet å være 14 ± 3 g, mens vekten av tumorer behandlet med PKCα-ribozym ble funnet å være 0,25 ± 0,15 g, noe som er en signifikant hemming av tumorveksten (30).

Vi har også undersøkt om paklitaxel (Taxol)-resistente humane brystkreftceller, SKBR3, kan sensitiseres for behandling med paklitaxel, ved forbehandling med PKCα-ribozymmer. Konsentrasjonen av PKCα-ribozymmer som ble benyttet, induerte ikke apoptose. Ved behandling av brystkreftcellene med paklitaxel alene fant vi IC₅₀ = 2,08 ± 1,52 μmol/l, mens kombinasjonen PKCα-ribozymmer pluss paklitaxel gav IC₅₀ = 41,7 ± 29,5 nmol/l. Dette er en 50 ganger reduksjon av IC₅₀ og indikerer en synergistisk effekt (upubliserte data). Det er blitt vist at PKCα sin fosforylering av celleoverlevelsessproteinet Bcl-2 på Ser70, er viktig for den antiapoptotiske aktiviteten til Bcl-2. I denne forbindelse er overekspressjon av PKCα blitt vist å føre til økt fosforylering av Bcl-2, og økt resistens til apoptose induert av kjemoterapeutiske stoffer (31).

Konklusjon

Signalkomponenter i tyrosinkinasereseptor-ras-ERK-signalveien synes å spille en sentral rolle i tumorvekst og muligens metastasering. Dette kan legge grunnlag for utvikling av nye terapeutika mot kreft som er mer spesifikke enn dagens kjemoterapi. Både de ulike hemmere og nukleinsyrer (antisens og ribozymmer) utgjør en potensiell ny generasjon medikamenter i behandling av kreft. Siden endring av flere intracellulære signal-kaskader er vanlig i kreftceller, kan effektiv behandling kreve hemming av mer enn en signalvei. Ved å kombinere forskjellige hemmere som virker på flere steder i signalveien, kan det tenkes at de potenserer hverandre og slik kan gi bedre effekt.

Litteratur

1. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159–70.
2. Hug H, Sarre TF. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J* 1993; 291: 329–43.
3. Dhanasekaran N. (1998). Cell signaling: an overview. *Oncogene* 1998; 17: 1329–30.
4. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322–6.
5. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997; 3: 614–20.
6. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000; 103: 211–25.
7. Sebolt-Leopold JS. Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway. *Oncogene* 2000; 19: 6594–9.
8. Porter AC, Vaillancourt RR. Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene* 2000; 16: 1343–52.
9. Sebt SM, Hamilton AD. Design of growth factor antagonists with antiangiogenic and antitumor properties. *Oncogene* 2000; 19: 6566–73.
10. Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 2000; 19: 6550–65.
11. Morin MJ. From oncogene to drug: development of small molecule tyrosine kinase inhibitors as anti-tumor and anti-angiogenic agents. *Oncogene* 2000; 19: 6574–83.
12. Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 1998; 17: 1395–413.
13. Gay B, Suarez S, Caravatti G, Furet P, Meyer T, Scoepher J. Selective Grb2 SH2 inhibitors as anti-ras therapy. *Int J Cancer* 1999; 83: 235–41.
14. Cussac D, Vidal M, Leprince C, Liu W-Q, Cornille F, Tiraboschi G et al. A Sos-derived peptidomimetic blocks the Ras signaling pathway by binding both Grb2 SH3 domains and displays antiproliferative activity. *FASEB J* 1999; 13: 31–8.
15. Garbay C, Liu W-Q, Vidal M, Roques BP. Inhibitors of RAS signal transduction as antitumor agents. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1165–9.
16. Reuter CWM, Morgan MA, Bergmann L. Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism based treatment for hematologic malignancies? *Blood* 2000; 96: 1655–69.
17. Sebt SM, Hamilton AD. Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors and cancer therapy: lessons from mechanism and bench-to-bedside translational studies. *Oncogene* 2000; 19: 6584–93.
18. Stanton VP, Cooper GM. Activation of human raf transforming genes by deletion of normal amino-terminal coding sequences. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 1171–9.
19. Storm SM, Rapp UR. Oncogene activation: c-raf-1 gene mutations in experimental and naturally occurring tumors. *Toxicol Lett* 1993; 67: 201–10.
20. Hall-Jackson CA, Evers PA, Cohen P, Goedert M, Boyle FT, Hewitt N et al. Paradoxical activation of Raf by a novel Raf inhibitor. *Chem Biol* 1999; 6: 559–68.
21. Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H et al. Protein kinase Cα activates Raf-1 by direct phosphorylation. *Nature* 1993; 364: 249–52.
22. Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7686–9.
23. Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, van Becelaere K, Wiland A, Gowman RC et al. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med* 1999; 5: 810–6.
24. O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Gallagher M, Cassella A, Vasilevska I, Monia BP et al. c-raf-1 depletion and tumor responses in patients

- treated with the c-raf-1 antisense oligodeoxynucleotide ISIS 5132 (CGP 69846A). *Clin Cancer Res* 1999; 5: 3977–82.
25. Monia BP, Johnston JF, Geiger T, Muller M, Fabbro D. Antitumor activity of a phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotide targeted against c-raf kinase. *Nat Med* 1996; 2: 668–75.
 26. Kashani-Sabet M, Funato T, Florenes VA, Fodstad Ø, Scanlon KJ. Suppression of the neoplastic phenotype in vivo by an anti-ras ribozyme. *Cancer Res* 1994; 54: 900–2.
 27. Leirdal M, Sioud M. Ribozyme inhibition of the protein kinase Cα triggers apoptosis in glioma cells. *Br J Cancer* 1999; 80: 1558–64.
 28. Sioud M, Leirdal M. Design of nuclease resistant protein kinase Cα DNA enzymes with potential therapeutic application. *J Mol Biol* 2000; 296: 937–47.
 29. Leirdal M, Sioud M. Protein kinase Cα isoform regulates the activation of the MAP kinase ERK1/2 in human glioma cells: involvement in cell survival and gene expression. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000; 4: 106–10.
 30. Sioud M, Sørensen D. A nuclease-resistant protein kinase Cα ribozyme blocks glioma cell growth. *Nature Biotech* 1998; 16: 556–61.
 31. Ruvolo PP, Deng X, Carr BK, Stratford-May W. A functional role for mitochondrial protein kinase Cα in Bcl-2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J Biol Chem* 1998; 273: 24436–42.

○

