

När Darwin möter Newton: Evolutionära mutationer styr proteiners rörelsemönster

Proteiner har inte en enda form utan är mer som dynamiska robotar. Men – hur rör de sig egentligen? Och vad visar det om deras funktion? **Laura Orellana**, biofysiker och forskare vid Karolinska Institutet, beskriver proteiners rörelser med datorsimuleringar – och har upptäckt en ny angreppspunkt för läkemedel mot hjärntumören glioblastom.

Här beskriver hon senaste nytt inom detta fascinerande forskningsområde.

Charles Darwins evolutionsteori, beskriven i boken *On the Origin of Species* (1859), beskriver naturens förmåga att styra biologisk utveckling genom att optimera funktionalitet och form utifrån miljö. Från sin resa till Galapagosöarna blev det bland annat uppenbart för Darwin hur fåglars näbbform varierade kraftigt mellan olika öar och med typen av dominerande föda. Till exempel främjades fåglar med långa, smala näbbar på öar där frukt var den dominerade födan.

Idag känner vi till många andra exempel från djurriket där liknande miljö har främjat en liknande form och struktur bland vitt skilda arter. Detta kallas *konvergent evolution*, det vill säga oberoende mutationer resulterar i samma slutgiltiga funktion. Man har också insett att dessa evolutionära principer även appliceras på molekylär nivå och att de är av extraordinär betydelse för att förstå bland annat mekanismen bakom cancer. Tumörer drivs av ackumulering av nyckelmutationer som triggar en evolutionär process i miniatyr där cancerceller växer, överlever och anpassar sig på ett sätt som inte sker i friska celler.

Under de senaste decennierna har forskare världen över karakteriserat miljontals cancermutationer och gjort dem sökbara i publika databaser. Till exempel innehåller COSMIC-databasen i dags-

läget över 11 miljoner *missense*-mutationer och antalet växer i rasande takt. Men vad är det som gör att en mutation förvandlar en normalt fungerande cell till en drivande cancercell? För att på djupet förstå hur en specifik mutation förändrar en cells biologiska funktion måste vi förflytta oss ned till atomär nivå och vad fysikern Richard Feynman hänvisade till som atomernas ”*jiggling and wiggling*”.

FORMEN SKAPAR RÖRELSEN

Pådrivande cancermutationer riktar påfallande ofta in sig på kroppens byggstenar, proteinerna. Denna klass av molekyler uppvisar typiskt en väldigt komplex form samtidigt som de kan vara extremt flexibla. Det är ofta formen som skapar rörelsen och det är sedan rörelsen som skapar funktionen. Vi känner idag en myriad av intrikata proteinrörelser som in i minsta detalj reglerar cellsignaler och cellers funktion, allt från öppning/stängning av jonkanaler i cellmembranet till muskelkontraktioner.

Faktum är att många funktionella rörelsemönster är hårt bevarade (70–80 procent identiska) mellan bakterier och humana proteiner. Det följer att förståelsen för hur proteiner förändrar sin form är av yttersta vikt, inte minst i de situationer när proteinet uppvisar förändrad och oönskad funktion vilket är fallet i cancer. Samtidigt känner vi till att

mutationer ofta uppvisar tydliga tecken på Darwins naturliga urval. Mutationerna ackumulerar ofta i regioner i proteinstrukturen som är särskilt betydelsefulla för proteinets rörelsemönster.

Sedan 1970-talet har forskning kring proteinstrukturer samlats i **Protein Data Bank (PDB)**. Denna databas innehåller de 3D-strukturer av proteiner och deras komplex, bestämt med experimentella metoder som röntgenkristallografi, magnetresonans (NMR) eller kryoelektronmikroskopi (Cryo-EM). Dessa tekniker har verkligen revolutionerat biologin, men de kräver att man ”läser” proteinet i en ögonblicksbild för att ta ”tydliga” bilder. Därför är de experimentella strukturerna endast statiska bilder av proteinets dynamiska rörelse och ger därför en begränsad bild av hur varje protein faktiskt fungerar. Även om PDB innehåller cirka 200 000 strukturer har vanligtvis bara en eller högst ett par ögonblicksbilder lyckats fångas experimentellt, vilket förhindrar en fullständig förståelse av deras mekanism och, således mutationerna kopplade till dem.

På samma sätt som Darwins förklaring av näbbformar kan appliceras på cancermutationer, kan Newtons rörelselagar användas för att beskriva hur proteiner rör sig. Samma ekvationer som beskriver planeternas rörelser kan användas för att simulera proteiners rörelse-

••• kunskapsutveckling på atomnivå

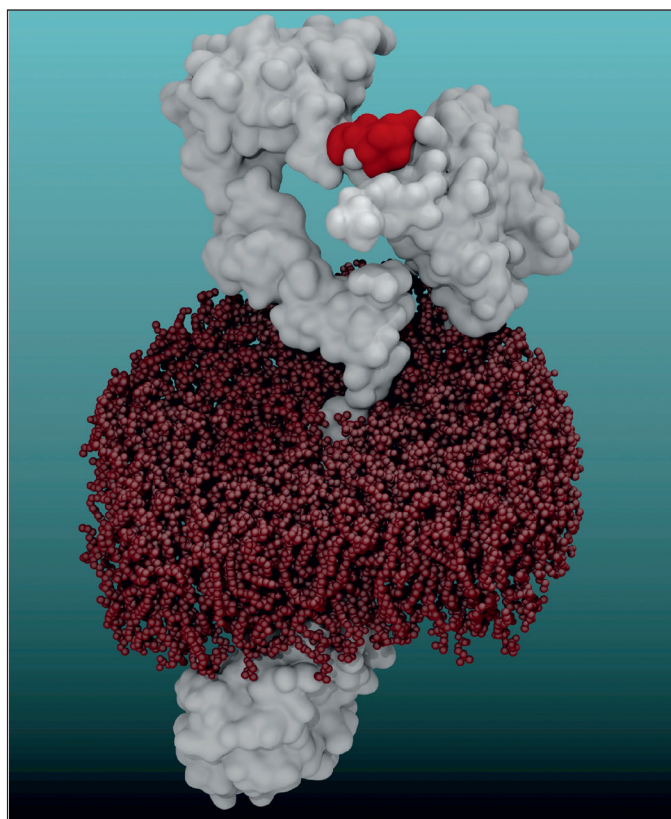


Figure 1 (Full-page). Model to simulate EGFR embedded in a lipid membrane with atomic detail.

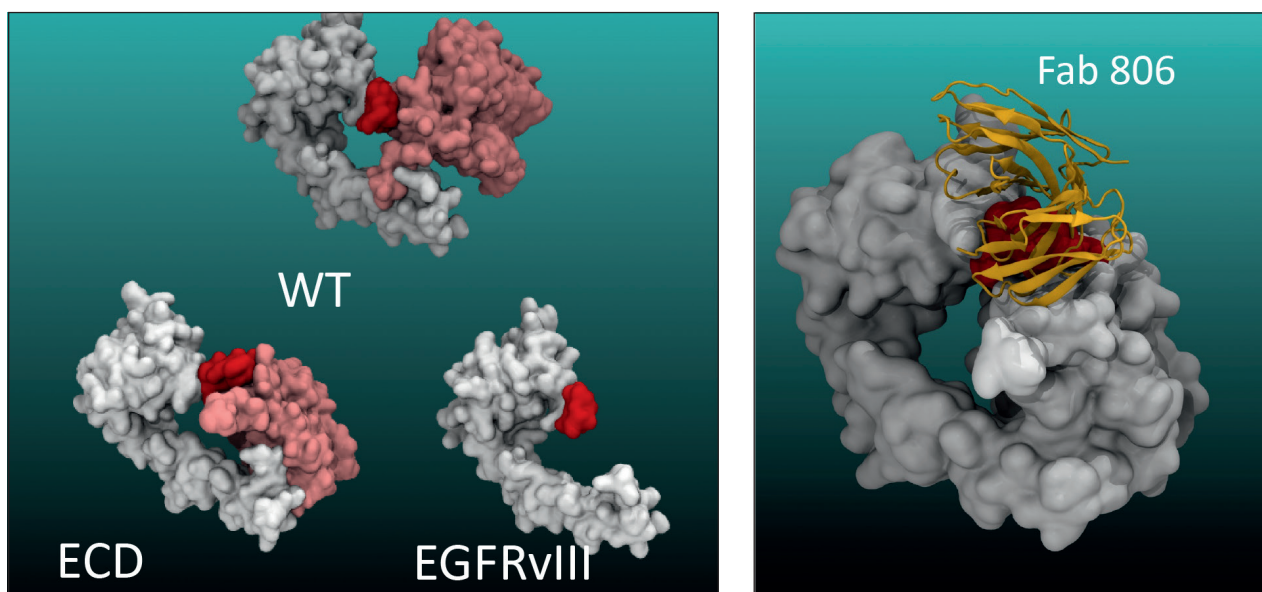


Figure 2. Right: Structural convergence of ECD missense mutations (bottom left) and EGFRvIII (bottom right) to respectively displace or remove domain I (pink), revealing the cryptic epitope for mAb806 (in red). Left: Intermediate state of the ECD bound to mAb806.

mönster. Med utgångspunkt från en experimentell proteinstruktur (från PDB) kan man modellera dess ingående atomer, hur de interagerar och hur de kommer att röra sig. Resultatet är närmast en film av ett protein i rörelse och kan beskriva hur det övergår mellan olika funk-

tionella tillstånd. De mekanistiska insikterna som simuleringar kan ge, omöjliga att uppnå experimentellt, kan vara förvånansvärt avgörande för att förklara mutationsmönster i tumörer, nyligen beskrivet av vår forskning med onkogenen EGFR.

EGFR – EXTREMT FLEXIBELT

EGFR (epidermal growth factor receptor) är en av de äldsta onkogenerna och trots att den är en måltavla för cancerterapi finns det fortfarande frågetecken kring dess aktiveringsmekanism och specifikt hur den triggar tumörbildning.

Två experimentella biologiska observationer tyder på att vår förståelse för detta viktiga protein är ofullständig.

EGFR är ett extremt flexibelt transmembranprotein. Dess ektodomän binder extracellulärt EGF och förmedlar allosteriskt signalen vidare till den intracellulära delen av proteinet (kinasen) som i sin tur reglerar celltillväxt. Dess komplexa struktur och rörelse gör det experimentellt svårt att ”fotografera” detta protein och det finns därför några få statiska, kristalliserade, isolerade fragment av EGFR dokumenterade i PDB. Dessa fragment kan på egen hand inte

förklara varför extra- och intracellulära mutationsmönster varierar kraftigt mellan olika vävnader. I motsats till lungcancertumörer (NSCLC) där mutationer tenderar att fokusera på den intracellulära kinase-domänen (KD) ackumuleras mutationer i stället extracellulärt i hjärntumörer (glioblastomas, GBM). Denna slående mutationsasymmetri resulterar i antagonistiska läkemedelskänsligheter. Medan lungcancermutationer kan behandlas med ”tyrosin-kinase”-inhibitorer (TKI) som binder till den aktiva KD, paradoxalt nog är GBM-mutationer mer känsliga för hämmare av den

så kallade inaktiva KD-konfigurationen – i båda fallen aktiveras EGFR i avsaknad av liganden EGF.

En annan experimentell observation som indikerar att vår förståelse för EGFR är inkomplett har sitt ursprung i en unik antikropp (mAb806) utvecklad av forskare vid *Ludwig Institute* i Australien för att specifikt binda till EGFR i just cancerceller. Denna antikropp var framtagen utifrån den vanligast förekommande EGFR-varianten i glioblastom (EGFRvIII) där halva ektodomänen är helt raderad vilket i sin tur exponerar epitopet för antikroppen. Det var därför mycket förvånande när det observerades att antikroppen även visade sig binda till WT EGFR i cancerceller. Utifrån ”fotografierna” av EGFR i PDB är epitopet för mAb806 dolt i båda dess kända konformationer (open/closed). Det antogs därför att antikroppen i själva verket detekterar en okänd intermediär konformation när WT EGFR rör sig från dess inaktiva (obunden) till aktiva (bunden) form.

KONVERGERANDE MUTATIONER I GBM

Mönstret av de vanligaste *missense*-mutationer i GBM visade sig för oss vara ytterligare en observation värd att gräva djupare i. Dessa mutationer är belägna i en till synes irrelevant region av ECD-strukturen. Inledningsvis försökte vi endast förstå hur dessa mutationer aktiverar EGFR, men vår forskning ledde oss till både mekanistiska och terapeutiska relevanta insikter.

ECD består av fyra subdomäner (I-IV) som hålls samman i en kompakt och inaktiv konformation genom självhinderande länk (”tether”) mellan domän II och IV. När liganden binder brister länken och ECD öppnas och möjliggör för aktivering genom dimerisering. Vid analys framgår att de flesta GBM-mutationer förekommer i kluster vid interdomängränssnitt (I-II, II-IV och II-III). Medan mutationer vid länken mellan II-IV klart gynnar öppnandet av ECD var mekanismen för I-II-mutationer, belägna långt från såväl länken som området för ligandbindning, desto mer oklar.

Genom datorsimuleringar av I-II-mutanter kunde vi observera en oväntad ”un-tethering” mot ett delvis öppet, mellantillstånd, vilket exponerade epitopen för mAb806 och därmed kopplade sam-

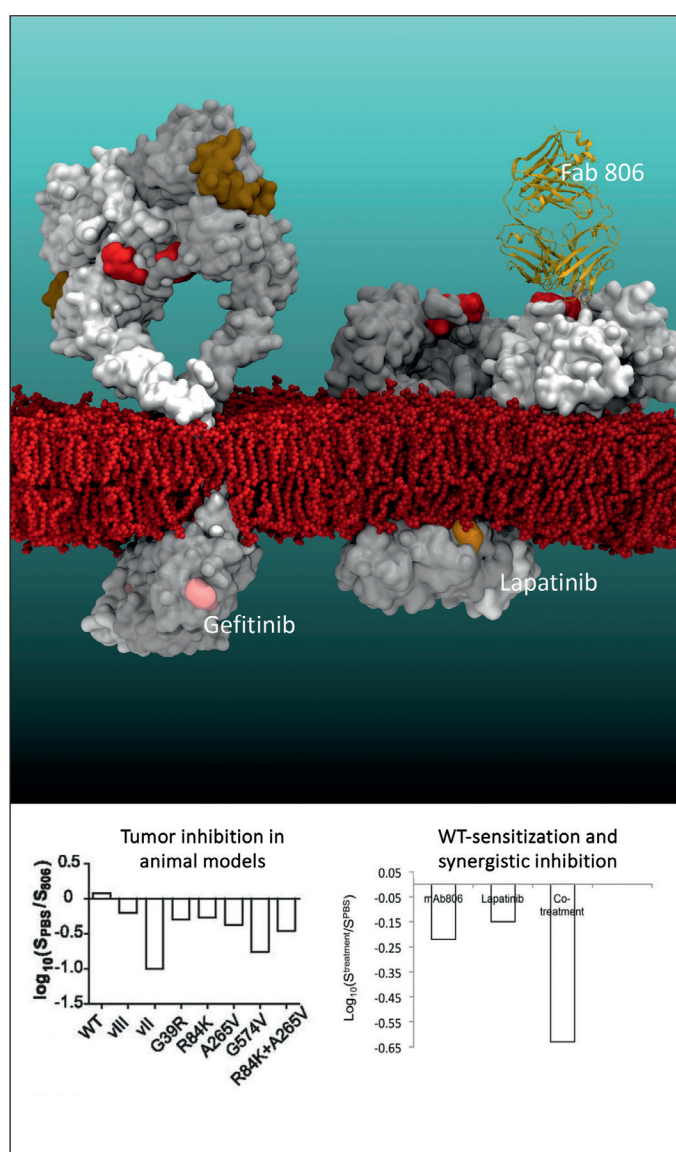


Figure 3. Top: Models of fully active EGFR (left) and the transient EGFR intermediate (left) found in GBM, shown bound to mAb806 and lapatinib. Bottom: Therapeutic response in animal models to low dose mAb806: tumors carrying missense mutations respond to mAb806 (right) while those driven by WT-EGFR overexpression do not. However, WT-EGFR can be allosterically sensitised by lapatinib, so that extra- and intra-cellular co-targeting triggers synergistic tumor inhibition in treated mice (left).

man två helt orelaterade forskningslinjer då mAb806 aldrig tidigare hade föreslagits binda GBM missense-mutationer. Simuleringarna visade vidare att regionen som rör sig är densamma som är raderad i EGFRvIII vilket föreslog potentiell ”strukturell ekvivalens” av två extremt olika varianter av EGFR, det vill säga att strukturellt helt olika glioblastommutationer ”konvergerar” genom att ta bort eller förskjuta samma del av proteinet och på så sätt aktivera EGFR på liknande sätt.

Genom att använda småvinkelröntgenspridning (SAXS), fluorescensaktiverad cellsortering (FACS) tillsammans med cell- och musmodeller för GBM utvecklade av LICR validerade vi denna ”konvergens”-hypotes. Resultaten visade att GBM-mutationer, representativa för de viktigaste strukturella klasserna hittade i hjärntumörpatienter (vissa aldrig testade in vitro), alla konvergerar till ett liknande tillstånd som detekteras av mAb806. Exponering av 806-epitopen skulle då vara kännetecknet för en ”ohämmad” ECD, där en hämmande region förskjuts eller raderas av mutationer för att aktivera vävnadsföredragna signalvägar.

Baserat på vår beräkningsforskning visades mAb806 först framgångsrikt behandla mutation A289V, den mest aggressiva och frekventa missense-mutationen i GBM. Denna studie följdes inom kort upp av en bredare studie där vi demonstrerar konvergens av de viktigaste GBM-mutationsklasserna som finns hos patienter, och hur lägdosbehandling av mAb806 utlöser tumörregression hos dem alla. Dessa fynd kan dramatiskt utöka den terapeutiska användningen av mAb806 långt bortom EGFRvIII- och EGFR-amplifiering, som fortfarande är de två primära biomarkörerna för kliniska prövningar.

SOM EN RATIONELL MÅLTAVLA

Den andra viktiga slutsatsen från vår studie var att den allosteriska kopplingen mellan ECD och KD kan utnyttjas som en rationell måltavla för kombinerad extra- och intracellulär behandling. mAb806-ECD-mutantkonvergens väckte naturligtvis frågan om sådana mutationer också skulle dela samma KD-konformation som tidigare föreslagits, det vill säga om både mAb806 och

typ-II TKI känner igen samma mellanliggande tillstånd i GBM. Med hjälp av FACS visade vi att tillgängligheten för 806-epitopen är tätt kopplad till KD-konformationen stabiliserad av TKI:er: typ-I TKI minskar bindningen till mAb806 medan typ-II och särskilt lapatinib (typ-II/2, med intermediär aktivationsinaktiva funktioner) ökar det, det vill säga TKI-stabilisering av en mellanliggande sKD-konformation förändrar allosteriskt ECD-konfigurationen och dess epitoptillgänglighet. Viktigt är att KD-mutationer är kända för att gynna aKD-dimeren, som vi visade är kopplad till en ECD med en begrävd 806-epitop, vilket möjligen förklarar deras kända sämre svar på mAb806. Baserat på denna koppling visade vi att lapatinib-behandling sensibiliserar icke-svarande WT-EGFR till mAb806, vilket resulterar i synergistisk tumörhämning genom samtidig extra-intracellulär blockad av samma konformer. Demonstrationen av hur allosterisk koppling kan omvandla WT-ECD till tillståndet bundet av mAb806 med konformationsspecifika och synergiska TKI:er ger en grund för att utöka användbarheten av denna antikropp till EGFR-förändrade tumörer oberoende av deras mutationsstatus, vilket banar väg för rationell ECD-KD sambehandling.

GÖR ONKOLOGI ”KONFORMATIONELL”

Även om Newtons rörelselagar och cancermekanismer förefaller vara två helt avlägsna områden har vi visat att de kan bringa nya ledtrådar för att knäcka mekanismen bakom EGFR-onkogenen. Med hjälp av simuleringar upptäckte vi att vitt skilda GBM-mutationer i själva verket ändrar EGFR-form eller konformation på ett liknande sätt. Detta är ett unikt exempel på strukturell mimik på molekylär nivå. Vad som föreföll vara en skog av olika mutationer visade sig följa en snällrik mekanism som i själva verket producerade samma Darwinistiska resultat vilket i sin tur används av cancerceller för att växa. Ur en evolutionär synvinkel, och även om det har förekommit rapporter om ”konvergens”, till exempel på enzymatiska platser är vårt arbete förmodligen det första

som avslöjar denna möjlighet i så stor skala för cancermutationer.

Å ena sidan visar EGFR konvergent utveckling av anmärkningsvärt olika mutationer i en given ”nisch”, det vill säga hjärnan för att uppnå samma funktion (asymmetrisk kinase), medan den å andra sidan divergerar i två olika miljöer – lunga/hjärna – för att uppnå olika anpassningar (asymmetriskt kontra symmetriskt kinase). Den föredragna ”formen” eller konformationen i varje vävnad bestämmer det motsatta sättet som dessa tumörer svarar på läkemedel, och slående nog, baserat på receptorallosteri, visade vi att även en tumör som bär överuttryckt EGFR vändes till att svara som ett glioblastom av läkemedel som låser den i den ”GBM-liknande” formen. En annan viktig upptäckt av vår forskning var att visa att extra- och intracellulära läkemedel kan synergisera om de binder till samma konformation, vilket kan vara av stor betydelse när man riktar sig mot allosteriska transmembranreceptorer. Våra experiment visade också att, som för EGFR-KD-mutationer, den enda närvaron av ECD-mutationer kunde förutsäga positiva svar på anti-EGFR-terapi mot den GBM-liknande konformationen; i ett vidare perspektiv rationaliserar de också mutationell heterogenitet i evolutionär-biokemiska termer, vilket tyder på att vävnadsspecificitet kan vara ett användbart kännetecken för konvergens i läkemedelssvar, vilket förtjänade ytterligare utforskning.

När vi letade efter dynamiska hotspots i cancerdatabaser har vi hittat ”konvergenta” egenskaper i oväntade proteiner som jonkanaler eller transportörer som kan spela specialiserade roller i vissa tumörer. Sådana studier kan också hjälpa till att identifiera lägre frekvensmutationer i onkogener, vårt EGFR-arbete visade också att en sällsynt mutation, nära högfrekventa sådana och förutspås aktiveras ”in silico”, verkligen var onkogen i djurmodeller och kunde svara på mAb806-terapi. Identifieringen av förrancancermutationer är ett mycket aktivt område, och inklusive strukturell dynamik är redan nästa gräns.

LAURA ORELLANA, FORSKARE OCH BITRÄDANDE LEKTOR,
INSTITUTIONEN FÖR ONKOLOGI-PATOLOGI, KAROLINSKA INSTITUTET,
LAURA.ORELLANA@KI.SE



PROTEIN DYNAMICS AND MUTATION LAB:
[HTTPS://KI.SE/EN/ONKPAT/LAURA-ORELLANAS-GROUP](https://ki.se/en/onkpat/laura-orellanas-group)