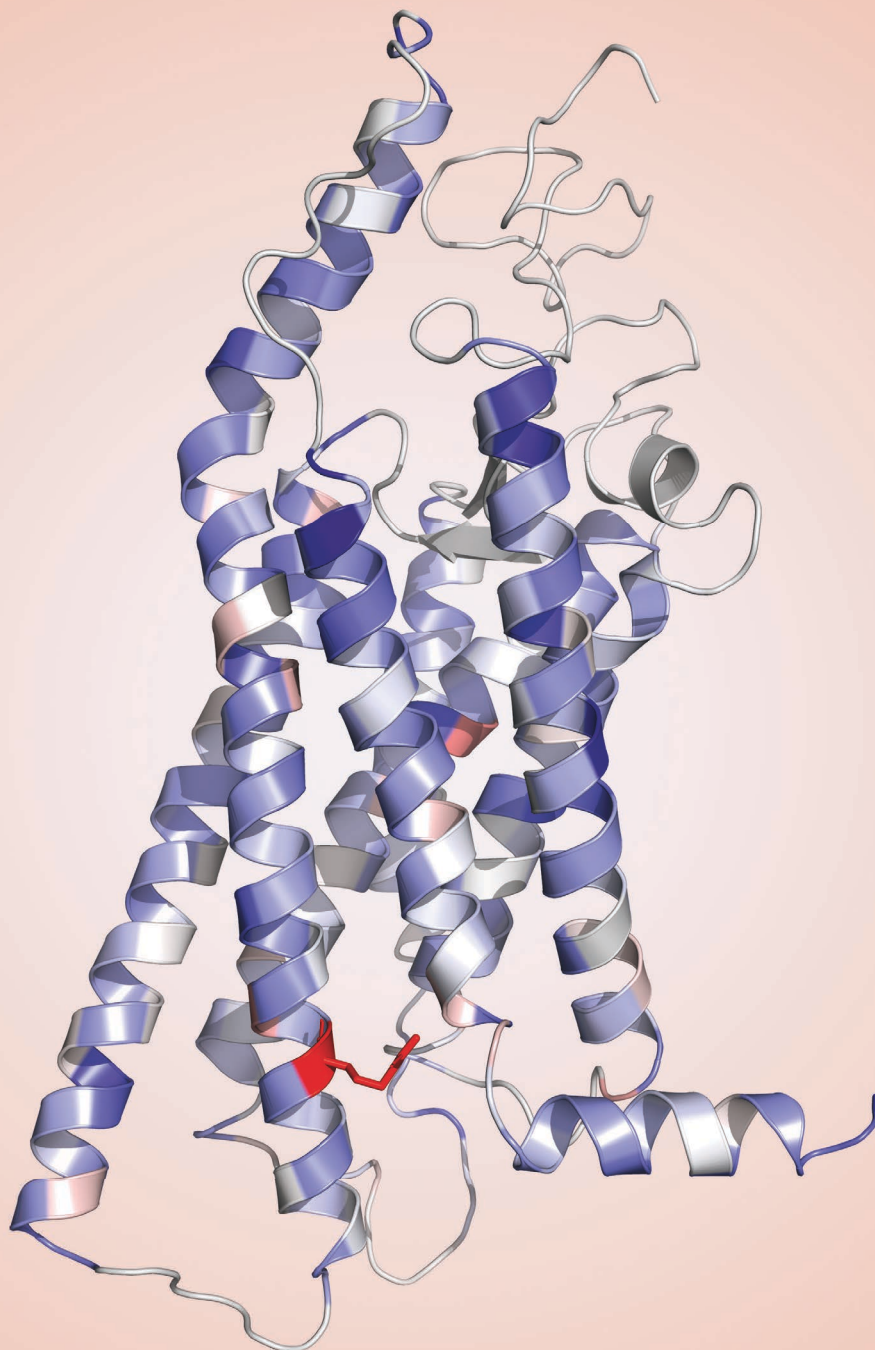


# Farmakologisk

– så kan nya möjligheter öppnas



# cancerbehandling

Ny forskning visar nu på molekylär nivå hur receptorer av gruppen Frizzled (FZD) aktiveras och fungerar som G-proteinkopplade receptorer. En mer grundläggande förståelse av aktiveringsmekanismerna ger bättre insikt hur WNT-proteiner binder och aktiverar FZDs.

Dessutom visar upptäckten på de första småmolekylära substanserna som direkt påverkar FZDs och därmed att det faktiskt är möjligt att angripa denna receptorfamilj farmakologiskt. Då många olika tumörformer karakteriseras av en ökad WNT-signaleringsmekanism skulle terapier som angriper FZDs tjäna som ett komplement till dagens cancerbehandling, skriver docent **Gunnar Schulte**, forskargrupsledare vid Institutionen för fysiologi och farmakologi, Karolinska Institutet.

Cellulär signalering via en uppsjö av olika signalvägar måste vara i balans för att bibehålla homeostas i en frisk vävnad. Överaktivering av signalvägar till exempel genom mutation av onkogener stör balansen och kan därmed leda till ökad celledelning och tumörinitiering. Onkogenen KRAS är ett klassiskt exempel där mutationer leder till ett konstitutivt aktivt signaleringsprotein som ökar cellernas förmåga att dela på sig dramatiskt. För lite drygt trettio år sedan upptäcktes ett protoonkogen som orsakar bröstcancer och som kallades int1 och som sedan på grund av sin homologi till genen wingless i *Drosophila melanogaster* döptes till WNT1. WNT1 är ett av 19 signalproteiner som utgör WNT-familjen i människan och som utsöndras av många av kroppens celler för att koordinera både fosterutvecklingen och vävnadshomeostas (Clevers and Nusse, 2012). WNT-proteinerna tjänar som extracellulär ligand till en rad transmembranreceptorer såsom Frizzled 1-10 (FZD1-10) och LDL receptor-related protein 5/6 (LRP5/6). WNT-bindning till receptorerna initierar det som kallas för WNT/ $\beta$ -catenin-signaleringsmekanism, där  $\beta$ -catenin modulerar genuttryck med bland annat ökande proliferation som följd. Många komponenter av denna signalväg har länkats till cancerogen signalering i olika tumörformer (Nusse and Clevers, 2017). Mutationer i proteinet adenomatous polyposis coli (APC), som har knutits till koloncancer i ung ålder och är muterad i ca 85 procent av alla koloncancer-patienter, ligger i topp. Funktionell APC är en central inhibitor av

WNT/ $\beta$ -catenin signalering och mutationerna påverkar denna inhiberande effekt, ett fynd som återigen understryker att överaktiv WNT-signaleringsmekanism leder till cancer. Ökad WNT-signaleringsmekanism har påvisats i många olika cancerformer, bland annat i olika epitelkarcinomer, den största gruppen av humana tumörer. Den stora betydelsen av WNT-signaleringsmekanism för tumörutvecklingen för med sig ett stort intresse att angripa denna signalväg farmakologiskt (Blagodatski et al., 2014; Koval and Katanaev, 2012; Shaw et al., 2019).

## FZDS SOM G-PROTEINKOPPLADE RECEPTORER

WNT-proteiner binder och aktiverar FZDs, en receptorfamilj som står i fokus i min forskargrupp. FZDs liknar strukturellt och funktionellt klassiska G-proteinkopplade receptorer (GPCR) såsom adrenalin-, histamin- eller dopaminreceptorer, även om funktionen av FZDs som GPCR har varit omstritt (Malbon, 2011). Trots att det varit känt att FZDs är WNT-receptorer i mer än 20 år är mekanismerna bakom WNT-inducerad FZD-aktivering tämligen oklara. Efter de senaste årens forskning och nyligen publicerade resultat framkommer det nu att FZD-aktiveringen i WNT/ $\beta$ -catenin-signalvägen skiljer sig fundamentalt från den heterotrimeriska G-proteinkopplade aktiviteten av dessa receptorer (Bowin et al., 2019) Karolinska Institutet, Biomedicum (6D). De senaste tio åren har jag forskat för att förstå om och hur FZDs aktiverar heterotrimeriska G-proteiner, med andra ord på vilket sätt FZDs förmår aktivera likande in-

## ••• nya behandlingsmöjligheter

tracellulära förändringar som adrenalin- histamin- eller angiotensinreceptorer. Tanken bakom är och var inte bara av ren akademisk natur, för att förstå hur FZDs fungerar, men drevs framförallt av idén att kunna påverka FZDs på samma sätt som man idag använder betablockerare, anti-histaminer eller angiotensinreceptorblockerare. GPCRer har under lång tid utnyttjats framgångsrikt som mål-molekyler för effektiva terapier – varför skulle man inte kunna åstadkomma samma framgång genom att angripa FZDs? I nuläget finns inga små molekyler som agerar på FZDs som agonister eller antagonister. Däremot har de senaste forskningsrönen, som baseras på direkt mätning av FZD-aktivering genom att synliggöra konformationsändringar i receptormolekylen eller interaktioner med heterotrimer G-proteiner eller genom mätning av G protein-beroende signalvägar, ökat de tekniska förutsättningarna för att leta efter molekyler som påverkar FZDs. Cancerbehandling med molekyler som antingen tävlar med WNTs om FZD-bindningen som neutrala antagonister eller som samtidigt minskar FZD-aktivitet, så kallade inversa agonister, skulle erbjuda ett bra komplement till dagens cancerbehandling i en viss subgrupp av tumörer. Tumörer som karaktäriseras av höga WNT-nivåer, jämfört med tumörer som drivs av mutationer i nedströmskomponenter som APC, skulle vara lämpliga mål för behandlingen.

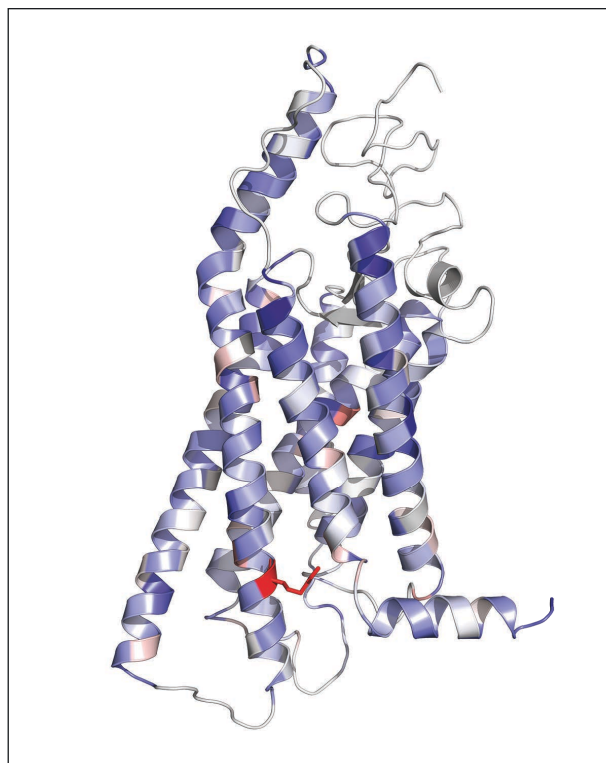
### AKTIVERANDE FZD-MUTATIONER I CANCER

En nära släkting till FZDs är Smoothed (SMO), en transmembranreceptor som förmedlar hedgehog-signaler och som har beskrivits som tumördrivande onkogen, till exempel för basalcellskarcinom. Varken SMO eller FZD<sub>1-10</sub> visar en särskilt hög frekvens av mutationer i olika tumörer jämfört med onkogenerna p53 eller KRAS. En analys av The Cancer Genome Atlas (TCGA), en databas som tillhandahåller sekvensinformation och mutationsanalys av tusentals olika cancerfall, visar dock att hela receptorfamiljen, det vill säga FZD<sub>1-10</sub> och SMO, har en mutations-”hot spot” på en basisk aminosyra i nedersta delen av transmembranhelix 6 (Figur 1). Noggrann analys av denna region i receptormolekylen identifierade en så kallad molekylär switch, det vill säga en region som är essentiell för receptoraktivering (Wright et al., 2019). En intakt switch håller receptorn – i frånvaron av WNT – i ett inaktivt tillstånd. Däremot underlättar en mutation i denna region basal och WNT-inducerad aktivering av receptorn, det vill säga mutationen ökar receptorernas konstitutiva aktivitet. Dessutom är den ovannämnda mutationen i SMO, som är en tumördrivande mutation, lokaliserad i just denna molekylära switch. Som en proof-of-principle för hypotesen tjänar fyndet att läkemedelsbehandling av muterad och överaktiv SMO med cyclopamin, en antagonist/invers agonist, minskar tumörtillväxt genom att minska receptorns konstitutiva aktivitet (Taipale et al., 2000). Även om vi i nuläget inte vet om mutationer i FZD's molekylära switch driver tumörinitering och -tillväxt, föreslår vi här att användning av FZD-selektiva inversa agonister och antagonister kommer kunna användas för framtida cancerterapi (Koziellewicz et al., 2019; Schulte and Wright, 2018).

### FARMAKOLOGISK BEHANDLING AV CANCER

#### GENOM MINSKNING AV FZD-AKTIVITET

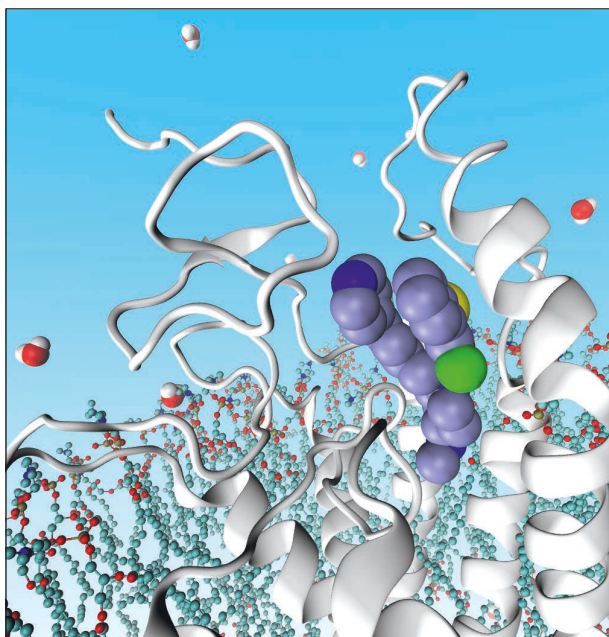
Rent praktiskt uppstår det däremot ett problem vad det gäller att farmakologisk angripa FZDs – det finns nämligen inga små molekylära substanser beskrivna som påverkar FZDs, varken som agonist, antagonist eller inversa agonister. Men även här banar vår forskargrupp vägen genom upptäckten av små molekyler som binder och aktiverar FZDs som partiella agonister (Koziellewicz et al., 2020). Även om agonister inte är särskilt önskvärda för cancerbehandling då en ökad aktivering av FZDs bör undvikas, öppnas nu dörren för ett mer systematiskt sökande efter substanser som binder FZDs och verkar som antagonister eller inversa agonister. Genom ett struktur- och mekanism-baserat tillvägagångssätt är det nu möjligt att driva läkemedelsutvecklingen av substanser som skulle kunna – inom en snar framtid – visa sin potential som komplement till existerande cancerbehandlingar. Det är fortfarande en lång väg kvar men de senaste forskningsrönen har antligen berett vägen för att angripa en helt ny cancerrelevant verkningsmekanism, nämligen aktiveringen av de tio FZD-subtyperna (FZD<sub>1-10</sub>). Dessutom är dessa tio FZD subtyper tillräckligt olika för att det verkar vara möjligt att utveckla subtyp-selektiva substanser. I kombination med en ”personalized medicine”-approach där tumörerna karaktäriseras med hänsyn till deras WNT och FZD-uttryck (och muta-



Figur 1. Receptormodellen visar den relativa variationen inom alla Klass F receptorer (FZD1-10, SMO) med hänsyn till mutationer i cancerpatienter (röd) och naturlig variation i normalpopulationen (blå). Ju mer intensiv färgen är desto större antal mutationer representeras. Den röda aminosyran i nedersta delen av helix 6 visar på en mutations-”hotspot” i denna receptorfamilj med relevans för receptoraktivering och cancerutveckling (se även Wright and Koziellewicz et al 2019).



## ••• nya behandlingsmöjligheter



Bilden visar en datorsimulering där en ligand (lila) binder till en Frizzled-receptor (FZD6; vitt band) som är inbäddad i plasmamembranet.

tionerna) skulle subtyp-selektiva FZD-antagonister eller inversa agonister kunna sättas in beroende på vilka FZDs som är relevanta mål i den enskilda patienten. Tidigare fynd understryker att vissa FZDs associeras med olika tumörer där till exempel FZD<sub>2</sub> är centralt för utvecklingen av bukspottskörtelcancer (Steinhart et al., 2017), FZD<sub>7</sub> och FZD<sub>6</sub> är relevanta för gastrointestinala tumörer (Corda and Sala, 2017; Flanagan et al., 2017), FZD<sub>10</sub> för synovialcarcinom (Nagayama et al., 2005) och FZD<sub>7</sub> styr cellproliferation i trippelnegativ bröstcancer (Yang et al., 2011). Då WNT/FZD signalering är ytterst viktigt för att upprätthålla kroppens stamcells nicher, till exempel i tarmepitelet, minskar en subtypsselektivitet och skräddarsydd användning av FZD-inaktiverande substanser risken för oönskade bieffekter.

Förhoppningen är nu att en translationell koordination kan driva på både utveckling och validering av FZD-antagonister och inversa agonister i patient- och tumörrelevanta cell- och djurmodeller. Vår forskargrupp kommer att verka för att dessa prekliniska fynd kan närma sig kliniken så att denna kunskap kommer patienterna till gagn snarast möjligt.

**Fotnot:** Forskningen i Gunnar Schultes forskningslaboratorium stöds av Karolinska Institutet, Vetenskapsrådet, Cancerfonden, Novo nordiskfonden, Stiftelsen Olle Engkvist Byggmästare, Emil och Wera Cornells Stiftelse, Marie Curie ITN WntsApp (<http://www.wntsapp.eu>) och Science for Life Laboratory samt SNIC (Swedish National Infrastructure for Computing).

### REFERENSER

- Blagodatski A, Poteryaev D and Katanaev VL (2014) Targeting the Wnt pathways for therapies. *Molecular and cellular therapies* 2: 28.
- Bowin CF, Inoue A and Schulte G (2019) WNT-3A-induced beta-catenin signaling does not require signaling through heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* 294(31): 11677-11684.
- Clevers H and Nusse R (2012) Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 149(6): 1192-1205.
- Corda G and Sala A (2017) Non-canonical WNT/PCP signalling in cancer: Fzd6 takes centre stage. *Oncogenesis* 6(7): e364.
- Flanagan DJ, Vincan E and Phesse TJ (2017) Winding back Wnt signalling: potential therapeutic targets for treating gastric cancers. *Br J Pharmacol*.
- Koval A and Katanaev VL (2012) Platforms for high-throughput screening of Wnt/Frizzled antagonists. *Drug Discov Today* 17(23-24): 1316-1322.
- Kozielewicz P, Turku A, Bowin CF, Petersen J, Valnohova J, Canizal MCA, Ono Y, Inoue A, Hoffmann C and Schulte G (2020) Structural insight into small molecule action on Frizzleds. *Nature communications* 11(1): 414.
- Kozielewicz P, Turku A and Schulte G (2019) Molecular Pharmacology of Class F Receptor Activation. *Mol Pharmacol*.
- Malbon CC (2011) Wnt signalling: the case of the 'missing' G-protein (vol 433, pg e3, 2011). *Biochemical Journal* 434(3): 575-575.
- Nagayama S, Fukukawa C, Katagiri T, Okamoto T, Aoyama T, Oyaizu N, Imamura M, Toguchida J and Nakamura Y (2005) Therapeutic potential of antibodies against FZD 10, a cell-surface protein, for synovial sarcomas. *Oncogene* 24(41): 6201-6212.
- Nusse R and Clevers H (2017) Wnt/beta-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 169(6): 985-999.
- Schulte G and Wright SC (2018) Frizzleds as GPCRs - More Conventional Than We Thought! *Trends Pharmacol Sci* 39(9): 828-842.
- Shaw HV, Koval A and Katanaev VL (2019) A high-throughput assay pipeline for specific targeting of frizzled GPCRs in cancer. *Methods Cell Biol* 149: 57-75.
- Steinhart Z, Pavlovic Z, Chandrashekar M, Hart T, Wang X, Zhang X, Robitaille M, Brown KR, Jaksani S, Overmeer R, Boj SF, Adams J, Pan J, Clevers H, Sidhu S, Moffat J and Angers S (2017) Genome-wide CRISPR screens reveal a Wnt-FZD5 signaling circuit as a druggable vulnerability of RNF43-mutant pancreatic tumors. *Nat Med* 23(1): 60-68.
- Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang BL, Mann RK, Milenkovic L, Scott MP and Beachy PA (2000) Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* 406(6799): 1005-1009.
- Wright SC, Kozielewicz P, Kowalski-Jahn M, Petersen J, Bowin CF, Slodkovic G, Marti-Solano M, Rodriguez D, Hot B, Okashah N, Strakova K, Valnohova J, Babu MM, Lambert NA, Carlsson J and Schulte G (2019) A conserved molecular switch in Class F receptors regulates receptor activation and pathway selection. *Nature communications* 10(1): 667.
- Yang L, Wu X, Wang Y, Zhang K, Wu J, Yuan YC, Deng X, Chen L, Kim CC, Lau S, Somlo G and Yen Y (2011) FZD7 has a critical role in cell proliferation in triple negative breast cancer. *Oncogene* 30(43): 4437-4446.

GUNNAR SCHULTE, KAROLINSKA INSTITUTET, INSTITUTIONEN FÖR FYSIOLOGI & FARMAKOLOGI, KAROLINSKA INSTITUTET, GUNNAR.SCHULTE@KI.SE

