

EL RECEPTOR PARA EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR) Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER

15
años

Octavio Zerecero Carreón
Arturo Valle Mendiola
Benny Weiss Steider
Isabel Soto Cruz*

RESUMEN

El receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y los otros miembros de la familia ErbB son receptores con actividad de cinasa de tirosina que juegan papeles esenciales tanto en condiciones fisiológicas normales como en condiciones cancerosas. Al unirse a sus ligandos, se llevan a cabo cambios conformacionales tanto en los dominios extracelulares como intracelulares de las cinasas de tirosina, dando como resultado la transfosforilación de residuos de tirosina en el dominio C-terminal regulador. Estas tirosinas se convierten en sitios de unión para moléculas señalizadoras y pueden inducir una evasión de la apoptosis, proliferación, hasta invasión y metástasis, procesos que son muy importantes para el fenotipo del cáncer. Se han encontrado varias mutaciones en el gen EGFR, particularmente en el dominio de cinasa en diferentes tipos de cáncer. El significado biológico de esas mutaciones y su relación con otros genes activados en el cáncer se discuten en este trabajo.

Palabras Claves: EGFR, familia ErbB, cáncer, cinasas, mutaciones.

The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and its relationship with cancer

ABSTRACT

Epidermal growth factor receptor (EGFR) and its related proteins (the ErbB family) are receptor tyrosine kinases that play essential roles in both normal physiological conditions and cancerous conditions. Upon binding its ligands, dynamic conformational changes occur in both extracellular and intracellular domains of the receptor tyrosine kinases, resulting in the transphosphorylation of tyrosine residues in the C-terminal regulatory domain. These provide docking sites for downstream molecules and lead to the evasion of apoptosis, to proliferation, to invasion and to metastases, all of which are important for the cancer phenotype. Mutations in the tyrosine kinase domain of the EGFR gene have been found in some cancers. Here, we review the discovery, and structure of EGFR, the EGFR signal transduction pathway and mutations of the EGFR gene that produce cancer. The biological significance of such mutations and their relationship with other activated genes in cancers are also discussed.

Key Words: EGFR, ErbB family, cancer, kinases, mutations.

ARTÍCULO RECIBIDO EL 25 DE ABRIL DEL 2012 Y ACEPTADO EL 18 DE MAYO DEL 2012.

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) fue aislado originalmente por Stanley Cohen en 1962 a partir de extractos de glándula submaxilar de ratón que aceleraba la erupción del incisivo y la apertura del párpado en el animal recién nacido¹. Por tanto, se denominó originalmente “factor diente-parpado”, posteriormente fue renombrado como EGF porque estimulaba la proliferación de células epiteliales¹. En 1972, se determinó la

secuencia de aminoácidos del EGF. La presencia de una molécula que unía específicamente EGF, el receptor para EGF (EGFR) se confirmó en 1975 al demostrar que EGF marcado con yodo 125 se unía de manera específica a la superficie de fibroblastos¹.

En 1978, el EGFR fue identificado como una proteína que mostraba fosforilación incrementada cuando se unía al EGF en la línea celular A431 de carcinoma escamoso que tenía amplificado el gen *EGFR*. El descubrimiento (1980) de que la proteína transformante del virus de sarcoma de Rous, v-src, se fosforilaba en tirosina llevó al descubrimiento de que el EGFR tenía actividad de tirosina cinasa al unirse al EGF¹. En 1984, el cDNA del *EGFR* humano se aisló y caracterizó. El análisis posterior de la proteína

*Laboratorio de Oncología Molecular, Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, FES Zaragoza, UNAM.

E-mail: sotocruz@servidor.unam.mx

Trabajo apoyado por PAPIIT (IN221512), DGAPA.

VERTIENTES

llevo a demostrar un alto grado de similitud entre la secuencia de aminoácidos del EGFR y la proteína v-erbB, un oncogen del virus de eritroblastosis aviar¹.

El análisis de genotecas de cDNAs utilizando una sonda para EGFR llevo a la identificación de una familia de proteínas relacionadas cercanamente con el EGFR. Esta familia consiste de 4 proteínas: EGFR (también conocida como ErbB1/HER1), ErbB2/HER2/NEU, ErbB3/HER3 y ErbB4/HER4. ErbB2, ErbB3 y ErbB4 muestran homología extracelular, relacionadas con el EGFR en 44, 36 y 48%, respectivamente; mientras que la homología para el dominio de tirosina cinasa es de 82, 59 y 79%. El grado de homología en el dominio C-terminal regulador es relativamente bajo, siendo de 33, 24 y 28%, respectivamente¹.

EL EGFR ES PARTE DE UNA FAMILIA FORMADA POR CUATRO RECEPTORES, ERBB1, ERBB2, ERBB3 Y ERBB4

Los receptores de la familia ErbB/Her, pertenecen a la subclase I de la súper familia receptores tirosina cinasa (RTKs). La actividad de estos receptores se centra en la mediación y regulación de las señales del medio externo hacia el interior de las células, su relevancia es evidente ya que participa en procesos que van desde el desarrollo embrionario hasta el órgano adulto en función, ó en procesos de proliferación celular, diferenciación, migración y reorganización estructural. La intrincada y compleja capacidad de interacción entre los miembros de la familia ErbB/Her formando dímeros o heterodímeros, e interacción con sus ligandos, afectan el tipo de señalización, y duración de la misma. Existen evidencias sólidas que demuestran que la formación de heterodímeros entre dos diferentes miembros de la familia incrementa la

diversidad de reconocimiento de ligandos, ya que de manera individual no puede obtenerse²⁻⁴. La formación de heterodímeros conlleva a un incremento en la capacidad de reclutar dentro del dominio citoplasmático, diversas moléculas asociadas al reconocimiento de fosfotirosinas por medio de proteínas que presentan dominios SH2 ó dominios PTB, incrementando con esto el repertorio de las vías de señalización que pueden ser activadas por un receptor determinado³⁻⁶. Los miembros de la familia de receptores ErbB se expresan en diferentes tejidos, jugando un papel preponderante en la proliferación celular y diferenciación. Los receptores son activados al unirse a su ligando natural, lo que lleva a la homo ó heterodimerización seguida de una transfosforilación de algunas fosfotirosinas en particular en el dominio catalítico lo que activa una serie de señales en cascada río abajo mediante el reclutamiento de proteínas-sustrato específicas en su dominio citosólico^{3,5}.

La familia de receptores tirosina cinasa ErbB/HER (RTK), comprende a cuatro miembros: ErbB-1/Her1, ErbB-2/Her2 (neu), ErbB-3/Her3 y ErbB4/Her4 (Fig. 1). Todos los miembros de la familia comparten un dominio extracelular de unión a ligando (ectodominio), un dominio hidrófobo transmembranal y un dominio citoplasmático, conteniendo un subdominio con actividad intrínseca de tirosina cinasa. Aun cuando los cuatro miembros de la familia comparten en general la misma estructura, cada uno de ellos posee en su estructura algunas particularidades muy específicas que son de suma importancia en la complementariedad de los dímeros así como la selectividad en la activación específica de las vías de señalización⁶⁻⁸.

Dentro de las variantes entre los miembros de la familia de EGFR/ ErbB, Erb1 se compone de un dominio extracelular de unión a

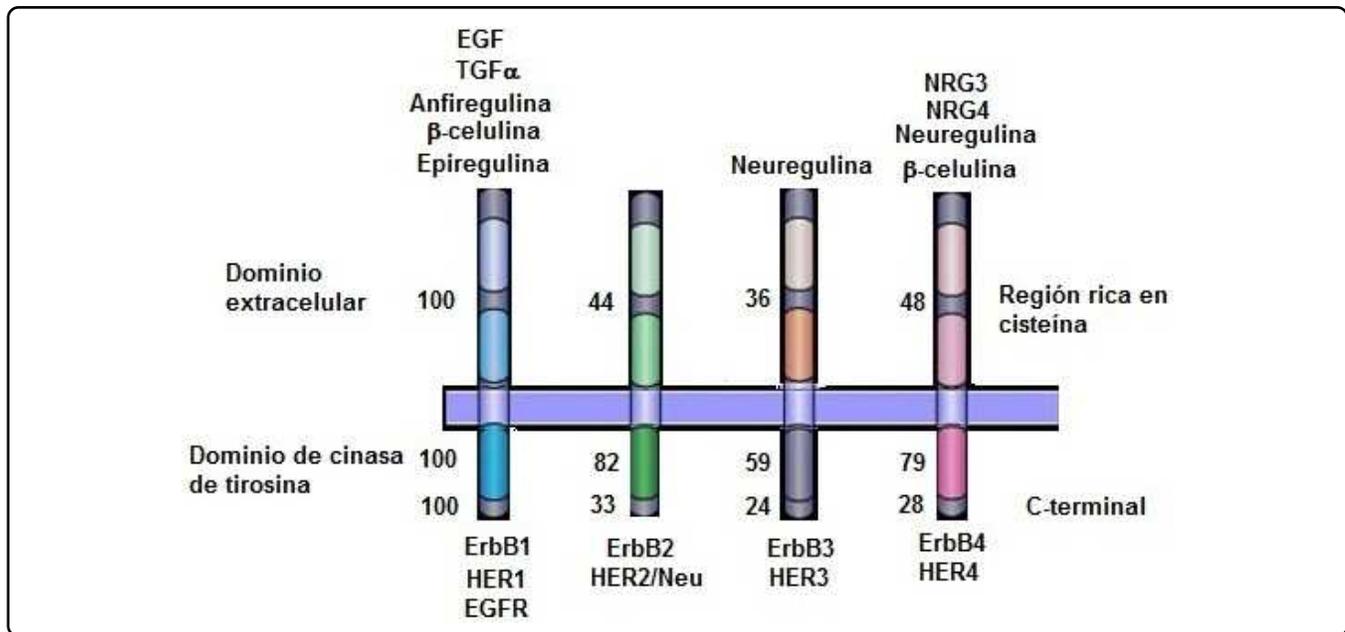


Figura 1. Familia de receptores ErbB/HER. Los miembros de la familia ErbB comparten un dominio extracelular de unión a ligando, un dominio transmembranal y un dominio intracelular que comprende la actividad catalítica de cinasa de tirosina. En la parte superior se indican los ligandos que pueden unirse a los diferentes receptores a excepción de HER2 que no une ligando.

EGF, compuesto de 622 residuos, un segmento transmembranal de 23 residuos, un dominio intracelular de 522 residuos con actividad de tirosina cinasa^{5,8,9}. En el caso de HER2/ErbB2, se desconoce hasta el momento su ligando, y preferiblemente forma heterodímeros en lugar de homodímeros; tales heterodímeros pueden unirse a factores de crecimiento cuya variedad propicia una amplia gama de tipos de cáncer como el cáncer de mama, cérvix, colón, endometrio, esofágico de pulmón y de páncreas^{5,10,11,12}. El tercer miembro de la familia ErbB3/HER3 a pesar de presentar una gran homología en el dominio tirosina cinasa con los otros miembros de la familia no posee actividad de proteína cinasa, aun cuando si presenta unión a ligando (NRG 1); por lo tanto, requiere la formación de heterodímeros (ErbB2/Erb3) de manera particular, y con los otros miembros de ErbB. ErbB3 se presenta en casos de cáncer de mama, colón, próstata y estomago^{6,13,14}. ErbB4, que es el cuarto miembro de la familia, comparte prácticamente el 75% de los residuos que componen el dominio transmembranal con los otros miembros, un 70% en el dominio intracelular que son alrededor de 276 residuos y un 20% en la región C-terminal dentro del dominio catalítico. El ligando NRG2, puede favorecer su heterodimerización con ErbB2, sin embargo, sus ligandos naturales son NRG3 y NRG4^{4,8,9,14}.

El dominio extracelular de cada uno de los miembros de la familia consiste en cuatro subdominios; donde los subdominios I y III se forman a través de una hélice β , de suma importancia como punto de unión con el ligando, una conformación llamada asa de dimerización (β -hairpin) dentro del subdominio II^{8,15,16}. Al efectuarse la interacción ligando-receptor, el asa de dimerización protruyendo del receptor; media la interacción con otro receptor, dando paso a la formación del dímero, formando una estructura conjunta con el ligando; esta es la forma activa. En contraste, la forma inactiva se caracteriza por interacciones intermoleculares entre el dominio II y IV (Fig. 2). EGF y TGF α se unen en relación 1:1 con el receptor, la subregión II es el principal componente en la unión de dos receptores, a manera de un brazo extendido compuesto por 242-259 residuos. EGF y TGF α interactúan con los residuos estructurales del dominio I y con los grupos R de los aminoácidos de la subregión III, los residuos de Arg 41 en EGF y Arg42 en TGF α , altamente conservados, interactúan con Asp355 del receptor y Leu47 en EGF y Leu48 en TGF α se proyectan formando un sitio hidrofóbico en la superficie de la subregión III^{6,9,17}.

La unión de los ligandos altera la disposición de los dominios II y III pero no la orientación relativa de las subregiones I y II. En el receptor que no se encuentran activadas las subregiones II y IV se encuentran unidas y el brazo de dimerización se encuentra plegado impidiendo la interacción con un receptor adyacente, inclusive, las subregiones de unión a ligando I y III se encuentran muy distantes para que un solo ligando pueda interactuar con ambas simultáneamente. Para que la activación pueda llevarse a cabo, es decir para que el ligando pueda unirse a su receptor es necesario la rotación a 130° de las subregiones I y III de la posición de las subregiones I y II, este re-arreglo

permite la conformación extendida rompiendo las uniones intermoleculares de las subregiones II/IV facilitando la participación del brazo extendido en la formación de dímeros a partir de interacciones intermoleculares en donde se estima que un 95% de los receptores permanece en su forma inactiva contra un 5% que presenta una forma inactiva y esto se ve afectado por la presencia de ligando, dando como resultando en una baja o una alta afinidad del receptor por su ligando^{4,13,15}. Probablemente la forma o estado de baja afinidad se ve reflejada por el arreglo en que se encuentran las subregiones I y III^{4,8,15}. El receptor ErbB-2/Her2 difiere en su dominio extracelular de manera significativa, puesto que presenta una conformación cerrada como si estuviese unido el receptor a un ligando mostrando una asa de dimerización protruyendo del receptor; lo que podría explicar el desconocimiento de un ligando natural para ErbB2. Los subdominios extracelulares I y III se encuentran plegados, impidiendo cualquier interacción con un ligando. Probablemente esta condición favorezca preferentemente la formación de heterodímeros de ErbB2 con los otros miembros de la familia ErbB/Her, en lugar de formar homodímeros^{15,17,18-22}.

HER2 se encuentra constituido por tres dominios: el dominio extracelular dividido en subregiones que se encuentran constituidas por 632 aminoácidos, sin embargo la conformación de estas regiones no es propicia para formar un sitio de unión al ligando. Esto se puede explicar a partir de las estructuras cristalinas obtenidas en diferentes medios en los cuales HER2 presenta una variación en el arreglo de las subregiones III y IV que muestran una relación de interdominio de tal forma, que asemeja un estado de activación similar al presentado por otros miembros cuando se unen a su ligando respectivo. Probablemente, se debe a que no están presentes dos regiones clave en la subregión IV, en donde los residuos de contacto Gly563, His565 presentes en HER3 son reemplazados por residuos de Pro y Phe respectivamente en HER2, lo cual puede explicar la ausencia de región de contacto de las subregiones II y IV siendo la interfase I y III favorecida por la existencia de grupos de residuos hidrofóbicos rodeados por contactos

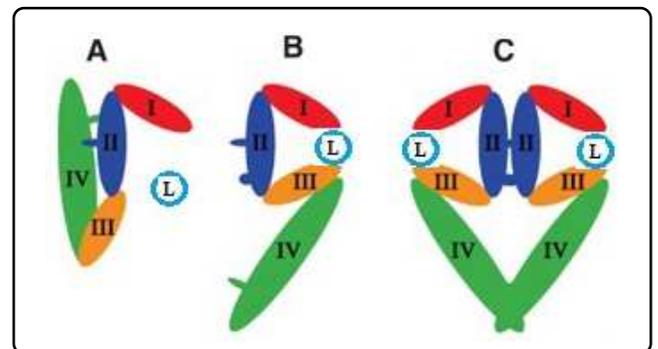


Figura 2. Dominio extracelular de los miembros de la familia EGFR. Diferentes subregiones (I-IV) que conforman el dominio extracelular de los miembros de la familia EGFR, y los distintos estados en los que pueden encontrarse los receptores EGFR. (A) Representa el estado basal en ausencia de ligando (L). (B) Muestra la unión del ligando a su receptor. (C) Formación de dímeros.

hidrofílicos haciendo esta conformación más estable. Todos estos cambios perfilan el funcionamiento de ErbB/HER2 como receptor cooperador con otros miembros de la familia de receptores que si poseen ligados propios por lo que hace a HER2/ErbB2 un receptor con actividad constitutiva por no requerir la unión directa a un ligando específico^{10,22-25}. HER2 tiene una región transmembranal compuesta por 22 aminoácidos, un dominio intracelular conformado por 580 aminoácidos con la estructura bilobulada con actividad tirosina cinasa y asas de activación^{10,22-31}. La desregulación de cualquier miembro de la familia ErbB se encuentra asociada a procesos transformantes que pueden llegar a promover el desarrollo de diversos tipos de cáncer^{15,27-33}.

Todos los miembros de la familia EGFR/ErbB tienen el potencial para estimular la cascada de señalización Raf-MEK-ERK^{9,30}, otras moléculas particulares como la fosfolipasa C que se une a fosfotirosinas en ErbB1 mediando la formación de diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato, que son segundos mensajeros. La unión específica de la subunidad reguladora de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) a fosfotirosinas en los receptores ErbB3 y ErbB4 conlleva a la activación de la enzima; la activación del fosfatidilinositol 3-fosfato activa a su vez a la proteína cinasa B o AKT¹²⁻¹⁴. La importancia de esta familia de receptores subyace en su capacidad de formación de dímeros capaces de activar de manera sustancial la vía de las MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógeno, asociadas a proliferación y diferenciación celular) y la vía de sobrevivencia PI3K/AKT (PDK-1 fosfatidilinositol)^{25,30-33}.

DOMINIO TIROSINA CINASA

El dominio tirosina cinasa posee una estructura de característica bilobulada en toda la familia de receptores ErbB/EGFR, donde los residuos 685-769 comprenden el lóbulo amino terminal de la cinasa y los residuos 773-953 componen el lóbulo carboxilo terminal. El lóbulo más pequeño tiene un arreglo de láminas β en antiparalelo, con regiones ricas en glicina y el asa de unión a ATP comprendida entre los residuos 695-700^{13,32-38}. La estructura del lóbulo mayor (carboxilo terminal) es predominantemente en forma de β -hélice, este lóbulo es el responsable de la unión del péptido o proteína sustrato. Al igual que en otras proteínas cinasas, el sitio catalítico se encuentra en la hendidura formada por los dos lóbulos; la secuencia compuesta por Leu-Val-Ile (955-957) del lóbulo carboxilo terminal juega un papel importante en la dimerización de receptor independiente de unión a ligando, esta secuencia interactúa con el lóbulo mayor del dominio cinasa^{24,38}. Se han detectado doce subdominios con residuos de aminoácidos conservados que constituyen el "centro" o sitio catalítico de las proteínas cinasas, de ellos, el motivo compuesto por los aminoácidos K/D/D participa de manera importante en las propiedades catalíticas del receptor de EGF^{3,33,34}. La Lys-721 del receptor para EGF representa un residuo invariable en la familia de receptores ErbB/EGFR, que tiende a formar iones pares con los fosfatos β y γ del ATP, conjuntamente la Asp-813 es la base catalítica que orienta el grupo tirosil del sustrato proteína en un estado catalítico que

posiblemente extraiga un protón de la tirosina facilitando así el ataque nucleofílico del átomo del fósforo- γ del complejo Mg-ATP. El residuo Asp-831 es el primer residuo del asa de activación correspondiendo al lóbulo grande, la Asp-831 se une al Mg^{2+} que coordina los grupos fosfatos β y γ del ATP. Para la familia de tirosina cinasas ErbB, el sitio de transferencia de grupo fosfato en el asa catalítica se compone de los residuos HRDLAARN para HER1 (His-811-Asn 818), para HER2 (822-829) y en HER4 (816-823), en contraste para HER3/ErbB3, que tiene una secuencia HRNLAARN (813-820) donde la base catalítica Aspartato se convierte en Asparagina (N815) dando como resultado la nulidad catalítica de la cinasa^{12,13,24,38}. Bajo condiciones fisiológicas el ligando se une a su receptor formando homodímeros o heterodímeros con el o los receptores que a su vez permiten la activación del dominio citoplasmático y su correspondiente subregión con actividad tirosina cinasa^{24,25,38}. La dimerización resulta en una autofosforilación o una transfosforilación de los residuos de tirosina en el segmento C-terminal, que sirve como sitios de unión a moléculas de señalización que contengan dominios SH2 y PTB^{24,39}.

La activación de los dominios de unión a ligando en la familia ErbB, activa cambios conformacionales en el dominio citoplasmático^{3,5,24}. La transferencia del γ -fosfato del ATP a los residuos de tirosina blanco incluyen la participación de varias asas que comprenden el dominio catalítico de tirosina cinasa y su correcta conformación, por ejemplo, para HER2 los residuos 844-850 comprometen el asa de activación C-loop, que es crucial para la transferencia de grupo fosforil. La β C-hélice formada por los residuos 761-775 y el asa de unión a nucleótido ó N-loop, residuos 727-732, son responsables de la coordinación ATP y el sustrato de tirosina blanco^{10,12,39}. El asa de activación ó A-loop comprende los residuos 863-884, que regula la activación de la cinasa, la cual cambia su conformación de manera extendida sobreponiéndose a la C-loop y permitiendo el acceso del sustrato blanco en el asa catalítica C-loop^{12,24,40}. En muchas proteínas cinasas el asa de activación se encuentra en forma compacta por la existencia de puentes de hidrógeno formados entre el grupo hidroxilo de una tirosina no fosforilada con un residuo de aspartato del sitio catalítico impidiendo la unión de sustratos al sitio catalítico de la proteína, solo hasta que la tirosina es fosforilada puede ser activada, caso contrario en los receptores de EGF^{12,40}.

TIPOS DE MUTACIONES EN EL GEN *EGFR*

Las mutaciones en el gen *EGFR* se presentan principalmente en los primeros cuatro exones del gen (Fig. 3) que codifica para el dominio de tirosina cinasa⁴¹. Aproximadamente 90% de las mutaciones de *EGFR* son deleciones pequeñas que involucran cinco aminoácidos de los codones 746-750 (ELREA) ó son mutaciones sin sentido que dan como resultado una sustitución de leucina por arginina en el codón 858 (L858R). No hay más de 20 variantes de un tipo de deleción, incluyendo deleciones mayores, deleciones mas mutaciones puntuales y deleciones mas inserciones. Aproximadamente 3% de las mutaciones ocurren en el codón 719, dando como resultado la sustitución

de glicina por cisteína, alanina o serina (G719X). Además, aproximadamente 3% son mutaciones por inserción en el exón 20. Estos cuatro tipos de mutación raramente ocurren al mismo tiempo. Existen otras mutaciones puntuales raras, algunas de las cuales se presentan con la mutación L858R⁴¹.

Una deleción en el exón 19 en combinación con la mutación L858R dan como resultado una fosforilación incrementada y sostenida del EGFR y otras proteínas de la familia ERBB sin la estimulación por ligando. Se ha demostrado que el EGFR mutante activa de manera selectiva a las vías de señalización Akt y STAT que promueven sobrevivencia celular, pero no tiene efecto en la vía de cinasas activadas por mitógenos (MAPK) que induce proliferación celular⁴². Los mutantes de EGFR en el dominio de cinasa son oncogénicos⁴³ y pueden transformar tanto fibroblastos como células epiteliales de pulmón en ausencia de EGFR exógeno, causando crecimiento independiente de anclaje, formación de focos y formación de tumores en ratones inmunocomprometidos⁴³. La transformación está asociada con la autofosforilación constitutiva de EGFR, fosforilación de Shc y activación de la vía STAT⁴³. Mientras que la transformación por la mayoría de las mutantes de EGFR confieren a las células sensibilidad a erlotinib y gefitinib, la transformación que induce la inserción (D770insNPG) en el exón 20 confiere a las células resistencia a esos inhibidores pero, por otro lado, son más sensibles al inhibidor irreversible CL-387,785⁴³. Mulloy et al. demostraron que la Del747-753 en el dominio de cinasa confiere una mayor tasa de autofosforilación y una sensibilidad mayor

al erlotinib que la cinasa con la mutación L858R. Estos datos reflejan las diferencias en la tasa de respuesta clínica entre la deleción en el exón 19 y la mutación L858R⁴⁴.

La actividad oncogénica de las mutantes de EGFR también se ha demostrado *in vivo*. Dos grupos de investigación han desarrollado ratones transgénicos que expresan la deleción del exón 19 o la mutación L858R en neumocitos tipo II bajo control de doxiciclina^{45,46}. La expresión de cualquiera de estas mutantes de EGFR llevo al desarrollo de adenocarcinomas, por el contrario, al retirar la doxiciclina para reducir la expresión del transgene, o el tratamiento con erlotinib dio como resultado una regresión tumoral. Estos experimentos muestran que la señalización sostenida del EGFR se requiere para mantener el tumor en adenocarcinomas de pulmón humanos que expresan los mutantes del EGFR.

MUTACIONES DEL DOMINIO EXTRACELULAR FRECUENTES EN TUMORES

Se han reportado tres tipos diferentes de deleciones en el dominio extracelular del gen EGFR (Figura 3); clasificadas de acuerdo al grado de deleción, y denominadas EGFRvI, EGFRvII y EGFRvIII⁴⁷. En la mutación EGFRvI, el dominio extracelular se elimina completamente y se parece a la oncoproteína viral v-erbB. En la mutación EGFRvII, se cortan 83 aminoácidos del dominio IV del dominio extracelular; sin embargo, esta mutación no parece contribuir al fenotipo maligno. La más común de las tres mutaciones es la EGFRvIII. Esta mutación a menudo involucra

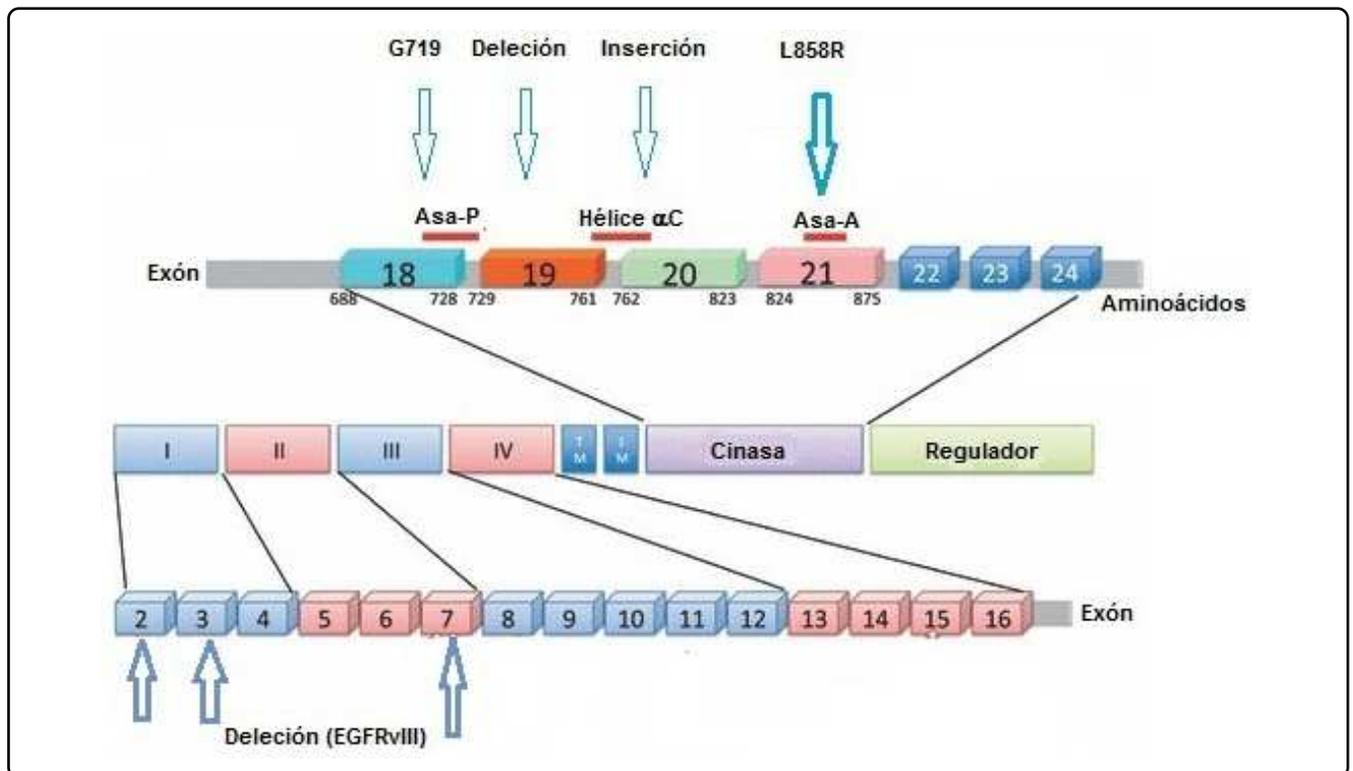


Figura 3. Mutaciones presentes en EGFR. Distribución de algunas de las mutaciones que se presentan en el gen EGFR y que afectan tanto al dominio de cinasa (18-24) como al domino extracelular (2-16).

la amplificación del gen, dando como resultado sobre-expresión de EGFR que carece de los aminoácidos 30-297, que corresponden a los dominios I y II del dominio extracelular. En este caso, la cinasa de tirosina del EGFR se encuentra constitutivamente activada sin requerir unión del ligando. Se ha reportado que este tipo de mutación se presenta en 30-50% de glioblastomas⁴⁷, en cáncer de pulmón se encuentra en 5% de carcinomas de células escamosas pero no en adenocarcinomas⁴⁸. También se ha observado que la expresión tejido-específica de EGFRvIII lleva al desarrollo de cáncer de pulmón⁴⁸. Además, hay evidencias que sugieren que los tumores de pulmón con EGFRvIII son sensibles al inhibidor de cinasa de tirosina irreversible de EGFR, HK1272, a pesar de que esos tumores son relativamente resistentes a los inhibidores reversibles, gefitinib y erlotinib⁴⁸.

Recientemente, se han identificado nuevas mutaciones sin sentido en el dominio extracelular del gen para EGFR en 13.6% de glioblastomas y en 12.5% de líneas celulares de glioblastoma⁴⁹. Parece haber varios puntos críticos: se encontraron cinco mutaciones R108K en el dominio I, tres mutaciones T263P y cinco mutaciones A289V/D/T en el dominio II, y dos mutaciones G598V en el dominio IV. Estas mutaciones de EGFR ocurren de manera independiente a EGFRvIII y representan un mecanismo alternativo para la activación de EGFR en tumores⁴⁹. Además, estas mutaciones están asociadas con sobre-expresión del gen EGFR y le confieren a las células NIH-3T3 crecimiento independiente de anclaje y tumorigenicidad. Las células transformadas por la expresión de esas versiones mutantes de EGFR son sensibles a inhibidores de la cinasa de EGFR⁴⁹.

IMPORTANCIA DE EGFR EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER

La complejidad de la vía de señalización de EGFR y su importancia en crecimiento celular y la supervivencia pone de relieve el rol que tienen las alteraciones de EGFR en el desarrollo y mantenimiento de algunas condiciones patológicas como el cáncer. El descubrimiento de las perturbaciones en las vías de señalización de EGFR que pueden contribuir a la transformación maligna fue reconocida a inicios de la década de los 80's en estudios que demostraron que EGFR es el homólogo celular del oncogen del virus de eritoblastosis aviar-B v-erbB, que codifica una proteína truncada, estrechamente relacionada con el receptor para EGF, reteniendo el dominio transmembranal y el dominio involucrado en la estimulación de la proliferación celular⁵⁰.

Las anormalidades en las funciones de EGFR están asociadas con todas las características clave del desarrollo y crecimiento del cáncer incluyendo la proliferación celular autónoma, la invasión, la angiogénesis y el potencial metastásico⁵¹⁻⁵³. Aberraciones en la señalización de EGFR pueden iniciarse por varios eventos como una producción alterada de ligandos, mutaciones y deleciones en los receptores, o por activación persistente. Niveles altos en la expresión de EGFR son características comunes de un fenotipo maligno en algunos tumores sólidos en humanos^{54,55}. De hecho EGFR es ampliamente expresado por muchos tipos celulares incluyendo linajes

epiteliales y mesenquimales, con niveles usualmente entre 40,000 a 100,000 receptores por célula⁵⁶. En muchos casos los niveles de receptores en células malignas se encuentra muy elevado, por ejemplo, se han reportado alrededor de 2 millones de receptores por célula en carcinoma de mama⁵⁷⁻⁵⁹.

La expresión de EGFR puede dar como resultado el incremento de algunos mecanismos como la producción de los ligandos de EGFR, el incremento en la transcripción del gen EGFR, la amplificación del gen EGFR y mutaciones que resultan en la activación constitutiva de la actividad de tirosina cinasa⁵⁷. EGFR está frecuentemente expresado en tumores escamosos de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, seno, próstata, vejiga y ovario^{57,60}. En el caso de cáncer de cabeza y cuello, la expresión de EGFR se observa en al menos el 80% de los tumores, y se correlaciona con una reducción en las tasas de supervivencia de los pacientes⁶¹.

Varios estudios han demostrado que la expresión de EGFR se correlaciona con poca supervivencia libre de enfermedad y, en general, mal pronóstico, hay mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad, en un estadio tumoral avanzado existe un mayor riesgo de metástasis⁶².

La gran expresión de los ligandos del EGFR en combinación con una mayor expresión del receptor mismo puede facilitar el desarrollo de una vía de crecimiento autocrino o paracrino que contribuyen en el desarrollo de la carcinogénesis. De hecho, la co-expresión de EGFR y TGF se correlaciona tanto con un mal pronóstico como con el desarrollo de varios tipos de cánceres humanos⁶².

Sin embargo, EGFR también puede inducir de manera independiente a la presencia de los ligandos y este evento, conocido como la transactivación del receptor, tiene importantes implicaciones para el desarrollo del cáncer. EGFR, de hecho, se produce como precursor a través de las membranas y es a menudo cortado por proteasas de la superficie celular, que generan ligandos solubles⁶⁴. Esta división, conocida como desprendimiento del ectodominio, se produce por la intervención de algunas proteasas como las metaloproteinasas de matriz (MMP) y disintegrinas/ metaloproteinasas (ADAM) y parece ser particularmente relevante en la formación y progresión del cáncer, ya que probablemente podría sufrir una estimulación constitutiva del receptor y sus vías intermedias, al igual que la señalización MAPK⁶⁵.

Algunas de estas proteasas son activadas por otros receptores de superficie celular llamadas receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), cuya activación por los agonistas específicos permite la transactivación de EGFR en células transformadas⁶⁶.

En los tumores primarios de mama, la actividad de EGFR se correlaciona con niveles elevados de proteasas ADAM⁶⁷ y en el cáncer de próstata con expresión alterada de GPCRs y sus ligandos que inducen el desarrollo del cáncer⁶⁸. Algunos

agonistas de GPCR son capaces de transactivar no sólo EGFR, sino también otros receptores ErbB tanto en células normales y cancerosas. En el cáncer de próstata, a menudo se ha mostrado una activación de EGFR crónica y la expresión desregulada de GPCRs y sus ligandos se ha relacionado con el desarrollo de tumores⁶⁹.

La transactivación ErbB implica también otras moléculas fisiológicas, como el estradiol (E2). De hecho la liberación de E2 es estimulada por la activación de MMP2 y MMP9 y parece correlacionarse con la liberación de HB-EGF⁷⁰; algunos antiestrógenos como el tamoxifeno, son capaces de transactivar tanto EGFR y ErbB2, y un efecto acompañado de una reducción de la actividad antiproliferativa del fármaco en células que sobre-expresan ErbB2-en cáncer de mama⁷¹.

La amplificación del gen que conduce a la sobre-expresión de EGFR es una característica frecuente en muchos cánceres humanos⁷², a menudo acompañados de otras reorganizaciones estructurales que causan deleciones en el dominio extracelular del receptor, la más frecuente es la variante de tipo III del EGFR humano (EGFRvIII)⁷³. A este receptor mutado le faltan los exones 1-7, que codifican para una parte del brazo de dimerización y se caracteriza porque conduce a la activación constitutiva de su dominio TK y es una frecuente alteración genética de EGFR en algunos tipos de cáncer, como glioblastomas malignos⁷⁴. Estos tumores a menudo presentan múltiples reordenamientos en el gen EGFR, que no son borrados, tales como mutaciones puntuales y las mutaciones de inserción⁷³.

La expresión de EGFR se correlaciona con un mal pronóstico y una peor evolución clínica de un gran número de enfermedades malignas, incluyendo CPNM (cáncer de pulmón no microcítico), cáncer de vejiga, cáncer de mama y de cabeza y cuello⁷⁵. La expresión de EGFR ha sido a menudo evaluada como un factor pronóstico independiente. La revisión de 200 estudios que incluyeron más de 20,000 pacientes, con el objetivo de determinar el valor pronóstico de la expresión de EGFR reveló el aumento de la reducción de las tasas de supervivencia de recurrencia libre o global, y un fuerte valor pronóstico de cáncer de colon, en ovario, vejiga, cáncer cervical y del esófago, así como moderada en cáncer de colon, en mama, cáncer gástrico y los tumores de endometrio, y débiles solo son para el NSCLC (células de carcinoma de pulmón)⁷⁶. Además, el aumento del contenido de los receptores a menudo se asocia con un aumento de la producción de ligandos específicos de activación, como el TGF, por las mismas células tumorales, lo que lleva a la activación de los receptores a través de una vía de estimulación autocrina^{63,75}. Recientemente se ha destacado la importancia de mutaciones y deleciones del dominio cinasa EGFR, en los tumores derivados de pacientes con CPNM. La secuenciación del gen de EGFR reveló una fuerte correlación entre la presencia de mutaciones somáticas en el dominio cinasa del gen y la respuesta a la pequeña molécula EGFR-TKIs (inhibidores de tirosina cinasa de EGFR), mientras que las mutaciones del dominio extracelular, se encuentran comúnmente en los tumores cerebrales malignos.

La activación de las mutaciones más frecuentes identificadas son las deleciones de los aminoácidos 746-750 en el exón 19, la sustitución de leucina por arginina en el codón 858 (L858R) y leucina por glutamato en el codón 861 (L861Q) en el exón 21, y la sustitución de glicina por cisteína en el codón 719 (G719C) en el exón 19^{77,78}. Por el contrario, algunas mutaciones son capaces de inducir resistencia a TKIs (inhibidores de tirosina cinasa) como la treonina a metionina, que son mutaciones puntuales (T790M o T766M) en el exón 20⁷⁹. El papel exacto de las mutaciones de EGFR en la carcinogénesis es un tema interesante de investigación. La mayor parte de estas mutaciones tienen un origen somático ya que el muestreo de tejido pulmonar normal utilizando microdissección revela su presencia sólo en las células cancerosas y no en el tejido normal, incluso el epitelio normal en los tejidos normales adyacentes o el tumor puede llevar a una gran cantidad de mutaciones de EGFR, la identificación de estas alteraciones moleculares podría considerarse como un evento temprano de la carcinogénesis, al menos en el pulmón⁸⁰. La correlación entre el desarrollo de algunas mutaciones y la activación de EGFR se ha demostrado por la transfección del gen EGFR en cultivos mutantes de células de NSCLC, con la consiguiente mayor autofosforilación del receptor y aumento de vías de señalización de activación⁷⁷. De hecho, en las células tumorales con EGFR mutante activan las vías de supervivencia PDK/Akt y STAT preferentemente, y el tratamiento de estas células con un TKI induce la apoptosis.

Una de las funciones más interesantes de EGFR en la progresión tumoral es su participación en la angiogénesis a través de la regulación positiva del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y metaloproteinasas (MMP).

En las células de cáncer humano, la vía del EGFR autocrina controla parcialmente la producción de varios factores de crecimiento pro-angiogénicos, incluyendo VEGF⁸¹ y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). Una vez activado EGFR induce una sobre regulación de VEGF *in vitro* en células de diferentes cánceres, incluyendo CRC, el cáncer de próstata, el glioma humano y CECC⁸². Por el contrario, el uso de los inhibidores de EGFR, como los anticuerpos monoclonales (MAB), dan lugar a una baja regulación simultánea de tumor inducido, y la angiogénesis mediada por VEGF. Por otra parte, la transfección de VEGF en las células cancerosas, de manera significativa los hace resistentes a los anticuerpos monoclonales anti-EGFR cuando se inyectan en ratones desnudos, lo que demuestra el vínculo funcional entre las dos vías y el papel causal de la sobre-expresión del VEGF en la resistencia adquirida a los anticuerpos monoclonales anti-EGFR⁸³.

En el cáncer humano, el equilibrio entre la muerte celular y la supervivencia a menudo se altera y las células cancerosas son capaces de sobrevivir en condiciones que normalmente inducen la muerte celular por apoptosis. EGFR desempeña un papel relevante en la prevención de la apoptosis, uno de los mecanismos del desarrollo del cáncer. De hecho, el EGFR es eficaz en el bloqueo de la apoptosis inducida por receptores de

muerte⁸⁴ como la familia del receptor de factor de necrosis tumoral (TNF), que incluyen su receptor (TNFR), FAS, receptor de muerte 4 (DR4) y 5 (DR5). Los ligandos naturales de estos receptores son TNF, FAS ligando (FasL) y relacionada con el TNF, el ligando inductor de apoptosis (TRAIL). EGFR activado también puede afectar la apoptosis mediante la vía de regulación, a través de RAS/ERK⁸⁵, la expresión de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), tales como c-FLIP capaces de inhibir específicamente la función de la caspasa-8, mediante la reducción de la inactivación del receptor de la apoptosis inducida⁸⁶. La estimulación de EGFR también es capaz de afectar la expresión del receptor de muerte y ligando FASL y el camino a través de la inhibición del factor de transcripción Forkhead o receptores de muerte DR-5 y DR4 a través de la inhibición de p53⁸⁷. Esto se traduce en reducción de la inactivación del receptor mediada por la apoptosis⁸⁸. Uno de los grupos más caracterizados de las proteínas que regulan la apoptosis es la familia Bcl-2, que incluye a dos grupos distintos de las proteínas, pro-apoptóticas y los miembros anti-apoptóticos, respectivamente. La señalización del EGFR a través de la estimulación de NFκB por la vía de señalización PI3K/Akt, puede alterar el equilibrio entre los dos grupos, hasta la regulación de las moléculas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, tales como Bcl-2, Bcl-xL o Mcl-1⁸⁹. Además, la activación de la transcripción NFκB parece ser mayor en algunas células cancerosas⁹⁰.

El punto crítico del cruce entre las vías de señalización del EGFR y la red de apoptosis se estratifica en múltiples niveles y finalmente regula e influye en el potencial apoptótico de la célula, lo que representa uno de los determinantes más importantes de la supervivencia de las células cancerosas. Además de las perturbaciones en la expresión de EGFR, mutaciones y la producción del ligando, las vías de señalización intracelular posteriores están bajo el control de los receptores y son frecuentemente alteradas en las células tumorales. El aumento de la actividad del EGFR y la supervivencia celular mediada por Akt se han descrito en aproximadamente el 25% de los tumores sólidos como el de mama y mutaciones de PTEN en glioblastomas⁹¹. Finalmente, la activación de EGFR se correlaciona con la desregulación de la activación constitutiva de las proteínas STAT, que posee propiedades oncogénicas como la capacidad de prevención de la apoptosis en varios tipos de cáncer humano⁹². Estas alteraciones del EGFR relacionadas con las vías de señalización a menudo se presentan simultáneamente en la célula cancerosa, asegurando la supervivencia sostenida, metástasis y resistencia a cualquiera de las terapias convencionales o específicas.

CONCLUSIONES

El EGFR se descubrió hace más de 40 años, y hasta la fecha hay gran cantidad de estudios sobre el mecanismo de activación y regulación, incluyendo análisis bioquímicos y cristalográficos sobre la estructura del EGFR en diferentes estados de activación y conformaciones. Además, se ha demostrado que la mutación y sobre-expresión de EGFR están asociados con el desarrollo de gran variedad de tumores humanos. Se ha encontrado que EGFR

se expresa en tumores de pulmón, cabeza y cuello, colon, páncreas, mama, ovario, vejiga, riñón, y en gliomas. Aún se llevan a cabo gran cantidad de estudios para dilucidar su mecanismo de activación. El avance en nuestro entendimiento de la estructura y biología del EGFR son de vital importancia para el desarrollo de mejores terapias y de estrategias que permitan combinar los inhibidores dirigidos de manera específica al EGFR y los tratamientos convencionales como quimioterapia y radioterapia. Retos futuros incluyen el dilucidar la complejidad de los agentes anti-EGFR individuales, las posibles combinaciones entre ellos y con los agentes que tienen como blanco a otros miembros de la familia erbB, así como las vías de señalización y las moléculas efectoras que permitan interferir de manera eficiente estas vías y poder desarrollar de esa manera un tratamiento eficiente contra el cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

- Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev* 2004; 4:361-370.
- www.cellsignalling.com
- Burgess A. EGFR family: Structure physiology signaling and therapeutics targets, *Growth Factors*, 2008; 26(5): 263 – 274.
- Riese D, Gallo R, Settleman J. Mutational activation of ErbB family receptor tyrosine kinases: insights into mechanisms of signal transduction and tumorigenesis, *BioEssays* 2007; 29: 558 – 565.
- Roskoski R. The ErbB/HER2 receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *BBRC* 2004; 319:1-11.
- Shannon E, Telesco R. Atomistic insights into regulatory mechanisms of the HER2 tyrosine kinase domain: A molecular dynamics study. *Biophysical Journal* 2009; 96:2321-2334.
- Wang E, Narasana A, Torres P, Xiang B, Wu F, Yang S, Carpenter G, Gazdar F. HER 2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Cell* 2006; 10: 25–38.
- Qing-Bai She, Chandralapaty S, Qing Ye, Lobo J, Haskell K, Leander K, DeFeo-Jones D., Huber H, Rosen N. Breast Tumor Cells with PI3K Mutation or HER2 Amplification Are Selectively Addicted to Akt Signaling. *PLoS ONE* 2008; 3(8): 3065.
- Mounawar M, Mukeira A, Le Calvez F, Hong J, Renard H. Patterns of EGFR, HER2, TP53 and KRAS mutations in relationship to smoking story. *Cancer Res* 2007; 67(12):5667-5672.
- Castiglioni F, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa M, Balsari A. Role of exon 16- deleted HER2 in breast carcinomas. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13:221-232.
- Huang Y, Li X, Jiang J, Frank S. Prolactine modulates phosphorylation signaling and trafficking of epidermal growth factor receptor in human T47D breast cells. *Oncogene* 2006; 25:7565-7576.
- Morrison C, Zanagnolo V, Ramirez N. HER2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer association with outcome in a large cohort of surgically staged patients. *J Clin Oncol* 2006; 24:2376-2385.
- Abba M, Mourón A, Güerci A. Amplificación del proto-oncogén

- Her2/Neu, asociada a la infección por VHP de bajo riesgo, en citología exfoliativa cervical. *Rev Mex Patol Clín* 2000; 47(1): 26-31.
14. Konecny G, Venkatesan N, Dering J, Ginther C, Finn R, Rahmed M. Activity of a novel HER2 and EGFR dual kinase inhibitor in human endometrial cancer cell. *BJC* 2008; 98:1076-1084.
 15. Grushko J, Filiaci V, Mundt J, Riderstrale K, Olopade O, Fleming G. An exploratory analysis of HER2 amplification and overexpression in advanced endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2008; 198:3-9.
 16. Kim H, Chan R, Dankort D, Zuo D, Najoukas M, Park M, Muller J. The c-Src tyrosine kinase associates with the catalytic domain of ERBB2, implications for ERBB2 mediated signaling and transformation. *Oncogene* 2005; 24:7599-7607.
 17. Payne W, Holden A, Layfield J. Detection of EGFR and HER2 activating mutations in squamous cell carcinoma involving the head and neck. *Mod Pathol* 2006; 19: 634-640.
 18. Normano N, Bianco C, Strizzi L, Mancinno M, Maiello M, De Luca A. The ErbB receptors and their ligands in Cancer: An Overview, *Current Drug Targets* 2005; 6: 243-257.
 19. Shi X, Xu L, Yu J, Fang X. Study of inhibition effect of hereceptin on interaction between heregulin and erbB receptors HER3/HER2 by single-molecule force spectroscopy. *Exp Cell Res* 2009; 315:2847-2855.
 20. Burke CL, Stern D. Activation of Neu(ErbB-2) mediated by disulfide bond-induced dimerization reveals a receptor tyrosine kinase dimer interface. *Mol Cell Biol* 1998; 18:5371-5379.
 21. Ferguson K, Berger M, Mendrola J, Cho H, Leahy D, Lemmon M. EGF activates its receptor by removing interactions that inhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* 2003; 11:507-517
 22. Burgess A, Cho H, Eigenbrot C, Ferguson K, Garret D, Sliwkowski M, Ward W, Yocoyama S. An open and shut case? Recent insights into the activation of EGFR/ErbB receptors. *Mol Cell* 2003; 12: 541-552
 23. Stephens P, Hunter C, Bignell G, Edkings S, Davies H, Lung cancer: intragenic ErbB kinase mutations in tumours. *Nature* 2004; 431:525-526.
 24. Soung Y, Lee J, Kim S, Wang P, Jo K. Somatic mutations of the ErbB4 kinase domain in human cancers. *International Journal of Cancer* 2006; 118:1426-1429.
 25. Karunagaran D, Azahar E, Beerli D, Chen X, Grass-Porta D, Ratzin B, Seger, Hynes E, Yarden. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications in breast cancer. *EMBO J* 1996; 15(2):254-264.
 26. André F, Nahta R, Conforti R, Boulet T, Aziz M, Yuan L, Meslin F, Spilmann M, Esteva J. Expresión patterns and predictive value of phosphorylated AKT in early-stage breast cancer. *Ann Oncol* 2008; 19: 315-320.
 27. Prenzel N, Zwick E, Leserer M, Ullrich A. Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification. *Breast Cancer Res* 2000; 2:184-190.
 28. Hanks S, Quinn A, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of catalytic domains. *Science* 1988; 241:42-52.
 29. Salomon D, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995; 19:183-235.
 30. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2003; 103:211-225.
 31. Garret N, McKern N, Lou M, Elleman T, Adams T, Lovrecz G, Zhu H, Walker F, Frenkel M, Hoyne P, Jorissen R, Nice E, Burgess A, Ward W. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor-b. *Cell* 2002; 110:763-773.
 32. Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamakana M, Kim H, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama J. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 2002; 110:775-787.
 33. Bryan T. Hennessy, Debra L. Smith, Prahlad T. Ram, Yiling Lu and Gordon B. Mills. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug. *Nature Drug Discover* 2005; 4: 988-1004.
 34. Blume P, Hunter T. Oncogenic kinase signaling. *Nature* 2001; 411:355 -3653.
 35. Yarden Y, Sliwkowski. Untangling the ErbB signaling network. *Nature Rev* 2001; 2:127-137.
 36. Harris R, Chung E, Coffey R. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 2003; 284:2-13.
 37. Jorissen R, Walker F, Pouliot N, Garrett T, Ward C, Burgess A. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling. *Exp Cell Res* 2003; 284:31-53.
 38. Zheng J, Knighton D, Ten Eyck L, Karlsson R, Xuong N, Taylor S, Sowadski J. Crystal structure of catalytic subunit of c-AMP-dependent protein kinase complexed with Mg-ATP and peptide inhibitor. *Biochemistry* 1993; 32:2154-2161.
 39. Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney Jr DW, Leahy DJ. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 2003; 421:756-760.
 40. Yarden Y, Schlessinger. Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation. *Biochemistry* 1987; 26:1437-1444.
 41. Mitsudomi T, Yatabe Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. *Cancer Sci* 2007; 98:1817-1824.
 42. Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 2001; 305:1163-1167.
 43. Greulich H, Chen T-H, Feng W, Jänne PA, Alvarez JV, Zappaterra M, Bulmer SE, Frank DA, Hahn WC, Sellers WR, Meyerson M. Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutants. *PLoS Med* 2005; 2, e313:1167-1176.
 44. Mulloy R, Ferrand A, Kim Y, Sordella R, Bell DW, Haber DA, Anderson KS, Settleman J. Epidermal growth factor receptor mutants from human lung cancers exhibit enhanced catalytic activity and

- increased sensitivity to gefitinib. *Cancer Res* 2007; 67:2325-2330.
45. Ji H, Li D, Chen L, Shimamura T, Kobayashi S, McNamara K, Mahmood U, Mitchell A, Sun Y, Al-Hashem R, *et al.* The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vivo sensitivity to EGFR-targeted therapies. *Cancer Cell* 2006; 9:485-495.
46. Politi K, Zakowski MF, Fan PD, Schonfeld EA, Pao W, Varmus HE. Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors. *Genes Dev* 2006; 20:1496-1510.
47. Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Poulsen HS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 1997; 8:1197-1206.
48. Ji H, Zhao X, Yuza Y, Shimamura T, Li D, Protopopov A, Jung BL, McNamara K, Xia H, Glatt KA, *et al.* Epidermal growth factor receptor variant III mutations in lung tumorigenesis and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:7817-7822.
49. Lee JC, Vivanco I, Beroukhim R, Huang JH, Feng WL, DeBiasi RM, Yoshimoto K, King JC, Nghiemphu P, *et al.* Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain. *PLoS Med* 2006; 3:e485:2264-2273.
50. Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, *et al.* Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 1984; 307: 521-527.
51. Herbst RS, Shin DM. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: A new paradigm for cancer therapy. *Cancer* 2002; 94:1593-1611.
52. Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Rel Cancer* 2001; 8:3-9.
53. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:127- 137.
54. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001; 37(Suppl. 4):S9-S15.
55. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995; 19:183-232.
56. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem* 1979; 48:193-216.
57. Ennis BW, Lippman ME, Dickson RB. The EGF receptor system as a target for antitumor therapy. *Cancer Invest* 1991; 9:553-562.
58. Petrides PE, Bock S, Bovens J, Hofmann R, Jakse G. Modulation of pro-epidermal growth factor, pro-transforming growth factor and epidermal growth factor receptor gene expression in human renal carcinomas. *Cancer Res* 1990; 50:3934-3939.
59. Yao M, Shuin T, Misaki H, Kubota Y. Enhanced expression of c-myc and epidermal growth factor receptor (CerbB- 1) genes in primary human renal cancer. *Cancer Res* 1988; 48:6753-6757.
60. Mendelsohn J, Baselga J. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin. Oncol* 2006; 33:369-385.
61. Ford AC, Grandis JR. Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer. *Head Neck* 2003; 25:67-73.
62. Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: A model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12:5268-5272.
63. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995; 19:183-232.
64. Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. *Exp. Cell Res* 2003; 284:2-13.
65. Luttrell LM, Daaka Y, Lefkowitz RJ. Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11:177-183.
66. Prenzel N, Zwick e, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A. EGF receptor transactivation by G-protein coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 1999; 402:884-888.
67. Borrell-Pages M, Rojo F, Albanell J, Baselga J, Arribas J. TACE is required for the activation of the EGFR by TGF-alpha in tumors. *EMBO J* 2003; 22:1114-1124.
68. Scher HI, Sarkis A, Reuter V, Cohen D, Netto G, Petrylak D, *et al.* Changing pattern of expression of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor a in the progression of prostatic neoplasms. *Clin Cancer Res* 1995; 1:545-550.
69. Daaka Y. G proteins in cancer: The prostate cancer paradigm. *Sci STKE* 2004; 216:re2.
70. Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem* 2003; 278:2701-2712.
71. Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, *et al.* Mechanisms of tamoxifen resistance: Increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2- positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:926-935.
72. Ohgaki H. Genetic pathways to glioblastoma. *Neuropathology* 2005; 25:1-7.
73. Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP. (1992). Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:4309-4313.
74. Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD. EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy. *End Relat Cancer* 2001; 8:83-96.
75. Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, Da R, Holst VA, Wagener MM, *et al.* Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:824-832.
76. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001; 37(Suppl. 4):S9-S15.
77. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA,

- Brannigan B W, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350:2129–2139.
78. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304:1497–1500.
79. Blencke S, Ullrich A, Daub H. Mutation of threonine 766 in the epidermal growth factor receptor reveals a hotspot for resistance formation against selective tyrosine kinase inhibitors. *J Biol Chem* 2003; 278:15435–15440.
80. Tang X, Shigematsu H, Bekele BN, Roth JA, Minna JD, Hong WK, et al. EGFR tyrosine kinase domain mutations are detected in histologically normal respiratory epithelium in lung cancer patients. *Cancer Res* 2005; 65:7568–7572.
81. O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Modjtahedi H, Eccles SA. Vascular endothelial growth factor family members are differentially regulated by c-erbB signaling in head and neck squamous carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 2000; 18:155–161.
82. Ravindranath N, Wion D, Brachet P, Djakiew D. Epidermal growth factor modulates the expression of vascular endothelial growth factor in the human prostate. *J Androl* 2001; 22:432–443.
83. Vioria-Petit A, Crombet T, Jothy S, Hicklin D, Bohlen P, Schlaeppli JM, et al. Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies in vivo. A role for altered tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2001; 61:5090–5101.
84. Gibson EM, Henson ES, Haney N, Villanueva J, Gibson SB. Epidermal growth factor protects epithelial-derived cells from tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induced apoptosis by inhibiting cytochrome c release. *Cancer Res* 2002; 62:488–496.
85. Gibson S, Tu S, Oyer R, Anderson SM, Johnson GL. Epidermal growth factor protects epithelial cells against Fas-induced apoptosis. Requirement for Akt activation. *J Biol Chem* 1999; 274:17418-17612.
86. Liu Z, Li H, Derouet M, Filmus J, Lacasse EC, Korneluk RG, et al. ras Oncogene triggers up-regulation of cIAP2 and XIAP in intestinal epithelial cells: Epidermal growth factor receptor-dependent and -independent mechanisms of ras-induced transformation. *J Biol Chem* 2005; 280:37383–37392.
87. Benoit V, Chariot A, Delacroix L, Derogowski V, Jacobs N, Merville MP, Bours V. Caspase-8-dependent HER-2 cleavage in response to tumor necrosis factor alpha stimulation is counteracted by nuclear factor kappaB through c-FLIP-L expression. *Cancer Res* 2004; 64:2684-2691.
88. Liu X, Yue P, Khuri FR, Sun SY. p53 upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site. *Cancer Res* 2004; 64:5078–5083.
89. Henson, E. S., & Gibson, S. B. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: Implications for cancer therapy. *Cell Signal* 2006; 18:2089–2097.
90. Henson ES, Gibson EM, Villanueva J, Bristow NA, Haney N, Gibson SB. Increased expression of Mcl-1 is responsible for the blockage of TRAIL-induced apoptosis mediated by EGF/ErbB1 signaling pathway. *J Cell Biochem* 2003; 89:1177–1192.
91. Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* 2004; 22(14), 2954–2963.
92. Amit-Vazina M, Shishodia S, Harris D, Van Q, Wang M, Weber D, et al. Atiprimod blocks STAT3 phosphorylation and induces apoptosis in multiple myeloma cells. *Br J Cancer* 2005; 93:70–80.