

Podstawy biologiczne terapii ukierunkowanej na receptor czynnika wzrostu naskórka (EGFR)

Marek Z. Wojtukiewicz, Mirosław Rybałtowski, Ewa Sierko

Receptor czynnika wzrostu naskórka (EGFR) należy do rodziny ErbB receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej. Składa się z trzech domen: zewnętrznej i wewnątrzkomórkowej oraz domeny przezbłonowej, kotwiczącej ten receptor w błonie komórkowej. Domena wewnątrzkomórkowa jest miejscem efektorowym receptora o aktywności kinazy tyrozynowej. Posiada również funkcje regulatorowe. Nadmierna ekspresja EGFR stwierdzana jest na powierzchni komórek nowotworowych wielu nowotworów. Wiąże się to z większym zaawansowaniem choroby w momencie rozpoznania oraz większą zdolnością komórek nowotworowych do inwazji. Stanowi także niekorzystny czynnik prognostyczny. Uwagę zwraca zbliżona do 100% częstość występowania nadmiernej ekspresji EGFR na komórkach nowotworów okolicy głowy i szyi. Nadmierna ekspresja EGFR jest również zjawiskiem charakterystycznym w nowotworach złośliwych płuc, jelita grubego, piersi oraz szyjki macicy i gruczołu krokowego. Do ważnych zjawisk związanych z nadmierną aktywnością EGFR zalicza się: nadmierną ekspresję EGFR; wadliwy mechanizm hamowania aktywności receptora; zwiększone stężenie liganda; samopobudzanie na drodze mechanizmu autokrynnego, tzw. „autocrine switch”; heterodimeryzację; wymianę sygnałów pomiędzy receptorami, tzw. „cross-talk”; fosforylację krzyżową, tzw. „cross-phosphorylation” oraz mutacje genu kodującego syntezę EGFR. Wśród wielu poznanych mutacji genu dla EGFR najczęściej spotykane są EGFRvIII (wariant III mutacji EGFR), delecja 6-7 kodonów w eksonie 19 oraz mutacja punktowa L858R w eksonie 21. Głównymi ligandami EGFR są: czynnik wzrostu naskórka (EGF) oraz transformujący czynnik wzrostu – α (TGF- α). Efektem przyłączenia liganda do EGFR, a w następstwie jego dimeryzacji i pobudzenia, jest aktywacja szlaków przekazywania wewnątrzkomórkowego. Prowadzi to do proliferacji komórek, hamowania ich apoptozy oraz zwiększenia zdolności tych komórek do przeżycia, a także do pobudzenia inwazji, tworzenia przerzutów odległych, angiogenezy – a w konsekwencji – do progresji choroby nowotworowej. Aktywacja EGFR może być również przyczyną oporności na hormono-, radio- i/lub chemioterapię.

Biologic basis of therapy targeted to EGFR

The epidermal growth factor receptor (EGFR) belongs to the group of tyrosine kinase receptors, i.e. the ErbB family. The receptor consists of three regions: an extracellular ligand-binding region, an intracellular region and a transmembrane domain which anchors the molecule in the cell membrane. The intracellular domain is responsible for tyrosine kinase activity and EGFR regulatory functions. EGFR overexpression is present on the surface of the neoplastic cells of many cancer types. It is associated with tumor clinical stage and facilitates cancer invasion. EGFR overexpression is a negative prognostic factor. Furthermore, EGFR overexpression in patients suffering from head and neck cancer is almost 100%. Increased expression of EGFR is also a common finding in cases of lung, colon, breast, cervical and prostate cancer. An important phenomena associated with EGFR hyperactivity include: overexpression of the receptor and its ligands, defective mechanism of the receptor downregulation, “autocrine-switch”, heterodimerization, “cross-talk”, “cross-phosphorylation” and EGFR gene mutations. Among the many known EGFR mutations the most prevalent are: variant III of EGFR mutation (EGFRvIII) and small deletion centered around codons 6-7 in exon 19 and missens mutations L858R in exon 21. The main ligands of EGFR are: epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor- α (TGF- α). After ligand binding and receptors dimerization and activation, EGFR elicits cell responses through multiple divergent pathways. EGFR stimulation results in increased cell proliferation, enhanced invasion, distant metastases formation, increased angiogenesis, decreased apoptosis, prolonged cancer cell survival and, in consequence, cancer progression. EGFR activation in cancer cells may lead to hormone-, radio- and/or chemotherapy resistance.

Słowa kluczowe: EGFR, czynnik wzrostu naskórka – receptor, EGF, czynnik wzrostu naskórka, terapia celowana, mutacje EGFR, dimeryzacja, heterodimeryzacja

Key words: EGFR, epidermal growth factor receptor, EGF, epidermal growth factor, targeted therapy, EGFR mutations, „cross-talk”, „cross-phosphorylation”, „autocrine switch”, dimerization, heterodimerization

Stanley Cohen i wsp. [1] zidentyfikowali czynnik wzrostu naskórka (*epidermal growth factor* – EGF) już w roku 1963. Z kolei rok 1980 obfitował w odkrycia związane z poznaniem procesów przekazywania sygnału z przestrzeni pozakomórkowej do jądra komórki. Gordon Sato i wsp. [2] zaproponowali hipotezę, iż proliferacja komórek w warunkach *in vitro* jest regulowana przez czynniki i hormony zawarte w płynie międzykomórkowym, a nie jedynie, jak poprzednio uważano, w surowicy krwi. W tym też roku Sporn i Todaro [3] przedstawili hipotezę autokrynną rozwoju nowotworów, według której komórki nowotworowe mogą syntetyzować czynniki wzrostu, które stymulują receptory na powierzchni tych komórek, co może powodować autonomiczny i niepodlegający regulacji wzrost nowotworu. Cohen [4] zidentyfikował również receptor czynnika wzrostu naskórka (*epidermal growth factor receptor* – EGFR) oraz wykazał, iż receptor ten jest białkiem przezbłonowym, zależnym od aktywności kinazy tyrozynowej. Następnie pojawiły się pierwsze doniesienia o nadmiernej ekspresji EGFR na błonach komórek nowotworowych, która korelowała z dużym zaawansowaniem choroby, agresywnością jej przebiegu oraz gorszą odpowiedzią na leczenie przeciwnowotworowe i krótszym przeżyciem chorych [5, 6]. Aktualnie wiadomo, że receptory dla EGF znajdują się na błonach wszystkich komórek nabłonkowych i wielu komórek mezynchymalnych. Odgrywają ważną rolę w wielu procesach fizjologicznych, takich jak wzrost i implantacja zarodka oraz naprawa dojrzałych, uszkodzonych organów [7]. Nadekspresja EGFR może jednak prowadzić do niekontrolowanego podziału komórek i rozwoju nowotworu.

Odkrycie EGFR i określenie jego roli w rozwoju nowotworów doprowadziły niemal natychmiast do wyprodukowania przeciwciała monoklonalnego, skierowanego przeciwko temu receptorowi. Sato i wsp. [8] opisali mechanizm blokowania EGFR przy pomocy przeciwciała monoklonalnego, co uniemożliwiało jego pobudzenie. W latach 1983-1984 pojawiły się pierwsze doniesienia o skuteczności terapii ukierunkowanej na EGFR [9, 10]. W tym samym okresie zsyntetyzowano również pierwsze preparaty, interferujące ze składowymi kaskady kinazy tyrozynowej, tj. inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR [11].

O randze odkryć Stanley’ a Cohena świadczy fakt, iż w 1986 roku Królewska Akademia Nauk uhonorowała dokonania tego badacza nagrodą Nobla [12].

Należy zauważyć, iż nadmierna ekspresja EGFR stwierdzana jest na błonach komórek nowotworowych wielu nowotworów (Tab. I). Jest ona obecna w przypadku guzów o większej objętości w momencie rozpoznania choroby. Implikuje także większą zdolność komórek nowotworowych do inwazji niż w przypadku słabej ekspresji tego receptora na komórkach nowotworowych lub

jej braku [13-15]. Co więcej, okazało się, że nadmierna ekspresja EGFR na komórkach nowotworowych stanowi niekorzystny czynnik prognostyczny (Tab. I) [16, 17].

Tab. I. Nowotwory złośliwe, na komórkach których stwierdza się nadmierną ekspresję receptora czynnika wzrostu naskórka (EGFR) [18-23]

Nowotwory złośliwe charakteryzujące się nadmierną ekspresją EGFR	Nadmierna ekspresja EGFR (% przypadków)
Nowotwory złośliwe okolicy głowy i szyi	70-100
Niedrobnokomórkowy rak płuca	34-90
Rak jelita grubego	45-80
Rak szyjki macicy	25-72
Rak gruczołu krokowego	40-70
Rak piersi	35-70
Rak jajnika	35-60
Rak żołądka	30-60
Rak trzustki	30-50
Glejak wielopostaciowy	10-50

Uwagę zwraca wysoka (zbliżona do 100%) częstość występowania nadmiernej ekspresji EGFR na komórkach nowotworów okolicy głowy i szyi. Wykazano, iż ekspresja EGFR jest 50-krotnie bardziej nasiloną w komórkach tych nowotworów złośliwych, niż w normalnych keratynocytach [24]. Zwiększoną ekspresję EGFR wykazano również na komórkach nowotworowych raka krtani, w porównaniu do komórek zdrowej tkanki tego narządu [25]. Wykazano także, że bardziej nasilonej ekspresji EGFR w komórkach nowotworowych raka krtani towarzyszy większa objętość guza, stopień zaawansowania choroby, częstsze są przerzuty w węzłach chłonnych, zaś całkowity czas przeżycia chorych na ten nowotwór jest krótszy [26, 27]. Okazuje się również, iż dla nowotworów złośliwych okolicy głowy i szyi charakterystyczne jest współistnienie nadmiernej ekspresji EGFR oraz jego liganda TGF- α (*transforming growth factor* – α , transformujący czynnik wzrostu – α), co stanowi niezależny i niekorzystny czynnik prognostyczny [28, 29]. Nie dziwi więc fakt, iż podjęto próby hamowania funkcji tego receptora jako celu terapeutycznego u chorych na nowotwory złośliwe okolicy głowy i szyi. W trakcie badań klinicznych pozostaje wiele leków interferujących z przekaźnictwem wewnątrzkomórkowym, zapoczątkowanym przez aktywację EGFR, które testowane są w monoterapii, bądź w skojarzeniu z radio- i/lub chemioterapią. Zważywszy, iż rocznie na świecie ok. pół miliona osób zapada na

nowotwory złośliwe okolicy głowy i szyi, a 5 lat przeżywa jedynie 40-80% pacjentów (w zależności od zaawansowania choroby), nowoczesne leczenie może stanowić szansę na uratowanie wielu istnień ludzkich. Nowotwory okolicy głowy i szyi, w których stwierdza się nadmierną ekspresję wariantu III mutacji EGFR (około 40% przypadków), wykazują częściej oporność na leczenie.

Nadmierna ekspresja EGFR jest również zjawiskiem charakterystycznym w nowotworach złośliwych płuc. Około 1/3 niedrobnokomórkowych raków tego narządu (*non-small cell lung cancer* – NSCLC) wykazuje nadmierną ekspresję EGFR w komórkach nowotworowych [30]. W 78% przypadków nadmierna ekspresja tego receptora związana jest z amplifikacją genów odpowiedzialnych za syntezę EGFR. Co więcej, wykazano, iż występowanie nadmiernej ekspresji EGFR i amplifikacji genu kodującego syntezę tego białka może korelować ze zwiększonym ryzykiem powstawania przerzutów w węzłach chłonnych i bardziej agresywnym przebiegiem choroby, niż w przypadkach, w których nie wykazano nadmiernej ekspresji tego receptora. W 2006 roku przeprowadzono metaanalizę 18 badań klinicznych, w której podsumowano dane dotyczące 2972 chorych na NSCLC [31]. Wykazano, iż częstość występowania nadmiernej ekspresji EGFR w raku płuca różniła się w zależności od typu histopatologicznego tego nowotworu i wynosiła odpowiednio: 39% w gruczolakorakach płuca, 58% w rakach płaskonabłonkowych, 38% w rakach wielkokomórkowych i 32% w mieszanych postaciach NSCLC. Na podstawie powyższej metaanalizy stwierdzono, że nadmierna ekspresja EGFR w komórkach NSCLC nie wpływa na przeżycie całkowite w tej grupie chorych. Jedynie w pojedynczym badaniu, przeprowadzonym na niewielkiej grupie chorych na NSCLC, wykazano, iż zawartość EGFR na błonie komórek nowotworowych korelowała niekorzystnie z przeżyciem całkowitym pacjentów [32].

Wśród wielu poznanych mutacji genu kodującego syntezę EGFR najczęściej spotykaną mutacją tego receptora u chorych na raka płuca jest EGFRvIII (wariant III mutacji EGFR). Częstość jej występowania wynosi około 40% [33]. Fakt wpływu EGFR, a w szczególności EGFRvIII, na patogenzę raka płuca wydaje się bezsporny. Wyniki badań wskazują, że nadmierna ekspresja obu tych form receptora (EGFR i EGFRvIII) wpływa na zwiększenie inwazyjności komórek raka płuca [34], wskaźnika ich proliferacji [35], nasilenie ich różnicowania i przylegania [36]. Ciekawostką, która może zaważyć na dalszym rozwoju terapii ukierunkowanej na EGFRvIII, jest stwierdzenie obecności tej mutacji w komórkach prawidłowej tkanki płuca (m.in. w nabłonku oskrzeli) [33].

Niezmiernie istotne, z punktu widzenia kwalifikacji do leczenia chorych na NSCLC, są mutacje genu kodującego domeny kinazy tyrozynowej EGFR, których obecność warunkuje korzystny efekt stosowania inhibitorów kinazy tyrozynowej (opis w tekście poniżej).

W części badań przeprowadzonych na hodowlach komórkowych drobnokomórkowego raka płuca (*small cell lung cancer* – SCLC) nie wykazano ekspresji EGFR [23, 37], bądź wykazano ją w niewielkim stopniu [38].

Inne badania potwierdzają jednak obecność omawianego receptora na tych komórkach (w ok. połowie przypadków tego nowotworu stwierdza się ekspresję EGFR) [39]. Wpływ EGFR i zmutowanej formy tego receptora na patogenzę SCLC wymaga dalszych badań.

Rak piersi to najczęstszy nowotwór złośliwy u kobiet. Co ciekawe, w przypadku tego nowotworu udokumentowano obecność wszystkich receptorów z rodziny ErbB na komórkach nowotworowych. Nadmierna ekspresja receptora HER-2 na komórkach raka piersi jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym i predykcyjnym. Nadmierna ekspresja tego receptora stwarza chorym możliwość skorzystania z nowoczesnej terapii trastuzumabem (przeciwciało monoklonalne anty-HER-2), która poprawia wyniki leczenia tej subpopulacji pacjentów. Nie należy jednak zapominać, że receptory z tej rodziny odgrywają ważną rolę w fizjologii, m.in. w rozwoju i we wzroście gruczołu piersiowego oraz podczas laktacji [40]. Ekspresja EGFR (HER-1) na komórkach raka piersi wykrywana jest w 14-91% przypadków, zależnie od metody oznaczeń [41, 42]. Ekspresję EGFR wykrywa się również w raku przewodowym *in situ* [43]. Obecność EGFR i jego ligandów (EGF, TGF- α), a przede wszystkim zjawisko heterodimersacji receptorów z tej rodziny (omówione poniżej) [44], stymulacja autokrynną lub parakrynną EGFR są kluczowymi zjawiskami w procesie rozwoju raka piersi. Na komórkach raka piersi stwierdza się również obecność zmutowanej formy receptora, tj. EGFRvIII [45]. Wykazano, iż obecność powyższej mutacji genu kodującego syntezę EGFR koreluje z większą objętością guza nowotworowego w momencie rozpoznania choroby [46]. Potwierdzono również, że im większa jest ekspresja EGFR na komórkach raka piersi, tym większa oporność na różne metody leczenia (chemio-, radio- i hormonoterapię).

Rak gruczołu krokowego to jeden z najczęściej występujących nowotworów u mężczyzn. Większość tych nowotworów w początkowym stadium leczenia jest wrażliwa na terapię hormonalną. Istnieją jednak dowody, że nabycie oporności na blokadę androgenową wiąże się z aktywacją EGFR [47, 48]. Pośrednio wykazano, iż nadekspresja EGFR powoduje zmniejszenie ekspresji receptorów androgenowych, a to skutkuje niekorzystnym dla pacjenta przebiegiem choroby [49]. W prawidłowej tkance gruczołu krokowego EGFR odpowiada za utrzymywanie integralności nabłonka [50]. W łagodnym przerzucie tego narządu oraz w prawidłowych komórkach tego narządu zauważa się podobną ekspresję EGFR (ok. 50% komórek wykazuje ekspresję tego receptora). Co ciekawe, 62% komórek nowotworowych nieleczonego raka gruczołu krokowego charakteryzuje się obecnością tego receptora, zaś po leczeniu odsetek ten wzrasta do 71% [51]. Podnosi się również rolę aktywacji auto- i parakrynną (tzw. „*autocrine switch*”) EGFR w patogenzie raka tego narządu, co mają potwierdzać zwiększone stężenia EGF i TGF- α w nabłonku wydzielniczym gruczołu krokowego [52] oraz zwiększenie stężeń tych czynników wzrostu w przerzutowym, hormonoopornym raku gruczołu krokowego [53]. Wyniki badań wskazują również, iż hamowanie aktywności EGFR może spowodować

Tab. II. Rodzina receptorów ErbB

Receptor	ErbB-1 HER-1 EGFR	ErbB-2 HER-2 neu	ErbB-3 HER-3	ErbB-4 HER-4
Ligandy	EGF (nadrodzina –ok. 3 tys. związków) HB-EGF TGF- α Amfiregulina Betacelulina Epiregulina	brak zidentyfikowanych ligandów	Heregulina NRG1 NRG2	NRG1 NRG2 NRG3 NRG4 Heregulina Betacelulina HB-EGF Epiregulina

EGF (*epidermal growth factor*) – czynnik wzrostu naskórka, HB-EGF (*heparin binding – epidermal growth factor*) – czynnik wzrostu naskórka wiążący heparynę, TGF- α (*transforming growth factor – α*) – transformujący czynnik wzrostu – α , NRG-1, -2, -3 i -4 – neuregulina-1, -2, -3 i -4

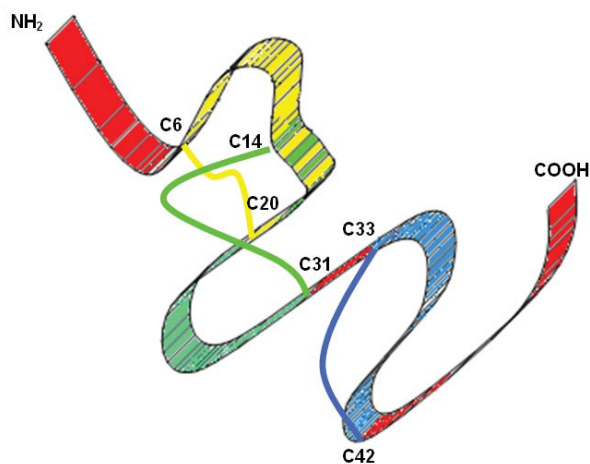
zmniejszenie ilości przerzutów raka gruczołu krokowego do kości [54].

Receptor czynnika wzrostu naskórka należy do grupy receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej, rodziny ErbB. Zidentyfikowano 4 receptory tej rodziny (Tab. II). W dalszej części niniejszego artykułu omówiony zostanie pierwszy z nich, ErbB-1, zwany inaczej HER-1 lub EGFR.

Zidentyfikowano wiele substancji będących agonistami tej grupy receptorów. Należy do niej ponad 3 tysiące związków. Głównie są to czynniki i modulatory wzrostu. Ich wspólną cechą jest obecność przynajmniej jednej domeny podobnej do EGF [13]. Należy podkreślić, że ligandy te mają różne powinowactwo do poszczególnych receptorów rodziny ErbB. Przykładami substancji o wyłącznym powinowactwie do receptora ErbB-1 (HER-1, EGFR) są: EGF, TGF- α , amfiregulina, zaś neuregulina-3 i 4 – ligandami receptora HER-4. Istnieją substancje o powinowactwie do dwóch receptorów z tej rodziny, m.in. ligandami zarówno receptora HER-1, jak i HER-4 są HB-EGF (*heparin binding – epidermal growth factor* – czynnik wzrostu naskórka wiążący heparynę), betacelulina i epiregulina. Wspólnym ligandem receptora HER-3 i HER-4 są z kolei neuregulina-1 i -2. Co ciekawe, do tej pory nie udało się jednak zidentyfikować liganda dla receptora HER-2. Skłoniło to naukowców do poszukiwania interakcji pomiędzy poszczególnymi receptorami.

Głównymi czynnikami stymulującymi EGFR są EGF i TGF- α [55]. EGF jest jednym z głównych czynników stymulujących komórki naskórka i śródbłónka [56]. W warunkach *in vitro* EGF odpowiada za proliferację i dojrzewanie różnych komórek, w tym komórek nowotworowych. Wspomniana wcześniej domena podobna do EGF, składa się z około 50 aminokwasów, przy czym sześć reszt cysteinowych posiada stałą lokalizację [57]. Aminokwasy te połączone są mostkami dwusiarczkowymi, tworząc strukturę trójpierścieniową (Ryc. 1).

Transformujący czynnik wzrostu – α (TGF- α) jest syntetyzowany przez makrofagi, komórki ośrodkowego układu nerwowego oraz keratynocyty. Sekwencja aminokwasów TGF- α jest niemal identyczna z sekwencją EGF, co warunkuje analogiczną strukturę trójpierścieniową, utrzymywaną przez mostki dwusiarczkowe [58]. Jego główne działanie związane jest z aktywacją EGFR [59].

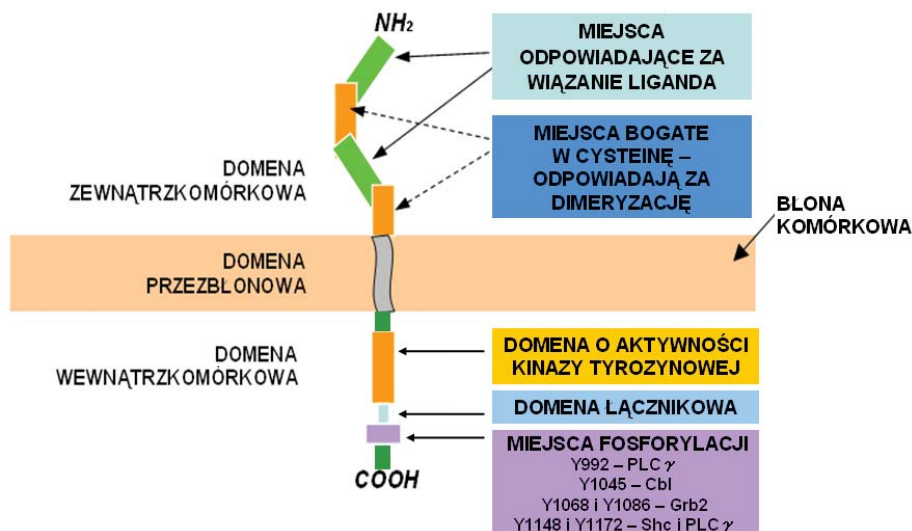


Ryc. 1. Budowa cząsteczki EGF (*epidermal growth factor* – czynnik wzrostu naskórka). C6, C14, C20, C31, C33, C42 – reszty cysteinowe biorące udział w tworzeniu mostków dwusiarczkowych; COOH – C-końcowy fragment łańcucha białkowego; NH₂ – N-końcowy fragment łańcucha białkowego

Komórki ekspozowane na jego działanie tracą właściwości antyproliferacyjne, związane z przyleganiem komórek do siebie, przez co stymulowane są do niekontrolowanej proliferacji. Należy jednak podkreślić, iż TGF- α działa również na inne komórki.

Budowa EGFR

Receptor czynnika wzrostu naskórka (EGFR) zbudowany jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o masie 170 kDa, składającego się z 1186 aminokwasów [60]. Ma on formę przezbłonowego białka, w którym wyróżnia się trzy domeny [61]. Domena zewnątrzkomórkowa, będąca N-końcowym fragmentem łańcucha polipeptydowego, zbudowana jest z 621 aminokwasów. W domenie tej znajdują się dwa miejsca odpowiadające za wiązanie liganda oraz dwa miejsca bogate w cysteinę, biorące udział w dimeryzacji receptorów. Podjednostki wiążące ligand i znajdująca się pomiędzy nimi jednostka bogata w cysteinę tworzą swego rodzaju „kieszneń”, gdzie przyłącza się ligand [62]. W dalszej kolejności, aminokwasy łańcucha polipeptydowego tworzą domenę przezbłonową, zakotwiczącą receptor w błonie komórkowej. Składa



Ryc. 2. Schematyczna budowa receptora czynnika wzrostu naskórka – EGFR (*epidermal growth factor receptor*)

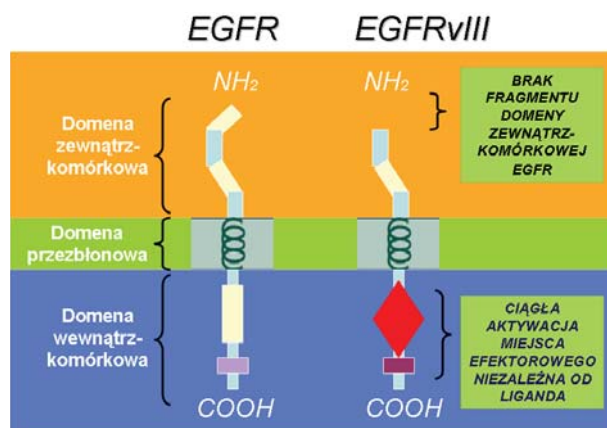
Cbl – rodzina ligaz związanych z ubikwityną, będących regulatorami hamującymi receptory związane z kinazą tyrozynową; COOH – C-końcowy fragment łańcucha polipeptydowego; Grb2 (*growth factor receptor binding protein 2*) – białko wiążące receptor czynnika wzrostu 2; NH₂ – N-końcowy fragment łańcucha polipeptydowego; PLC γ (*phospholipase C gamma*) – fosfolipaza C gamma; Shc – rodzina białek łącznikowych; Y992, Y1045, Y1068, Y1086, Y1148 i Y1172 – lokalizacje miejsc fosforylacji (liczby odpowiadają numerom kolejnych aminokwasów związanych z procesami fosforylacji)

się ona z 23 aminokwasów. Trzecia, wewnątrzkomórkowa domena EGFR, jest miejscem efektorowym receptora o aktywności kinazy tyrozynowej. Zbudowana jest z 542 aminokwasów i posiada kilka miejsc fosforylacji oraz region łącznikowy (Ryc. 2). Region łącznikowy (*juxtamembrane region*) odpowiada za funkcje regulatorowe, takie, jak hamowanie aktywności receptora – *downregulation* i internalizacja zależna od liganda [63].

Synteza EGFR kodowana jest przez protoonkogeny z rodziny *c-erbB*, zlokalizowane na krótkim ramieniu chromosomu 7 (p12.3-p12.1). W efekcie wystąpienia mutacji w obrębie tych genów pojawiają się nieprawidłowe formy EGFR [64]. Mutacje te dzieli się na mutacje dotyczące fragmentów łańcucha należących do poszczególnych domen, tj. zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej oraz mutacje dotyczące wyłącznie domeny kinazy tyrozynowej [65, 66]. Większość mutacji jest niezwykle rzadka. Zostały one opisane głównie w glejaku wielopostaciowym i niedrobnokomórkowym raku płuca. Na specjalną uwagę zasługuje wariant III mutacji EGFR, tj. EGFRvIII (Δ EGFR) [67, 68]. Dochodzi do niej w wyniku eliminacji fragmentu DNA, zawierającego eksony 2-7 genu dla EGFR (delecja 801 par zasad – nukleotydy z pozycji 275-1075), co warunkuje utratę aminokwasów z pozycji 2-273 z domeny zewnątrzkomórkowej receptora. Efektem tej mutacji jest brak miejsca wiążącego ligand oraz, co jest bardzo istotne – samoistna, ciągła aktywacja kinazy tyrozynowej EGFR. Sprawia to, że receptor ten jest cały czas aktywny bez konieczności przyłączenia liganda (Ryc. 3). Fakt, iż wariantu III receptora dla EGF nie wykrywa się w komórkach prawidłowego gruczołu piersiowego ani w komórkach łagodnych guzów piersi, zaś stwierdza się go w komórkach nowotworowych raka

piersi, sugeruje, że pełni on istotną rolę w procesie rozwoju choroby nowotworowej [46].

Nadmierną ekspresję EGFRvIII wykrywa się w komórkach wielu nowotworów złośliwych (Tab. III). Pozostałe, częściej występujące mutacje, opisane głównie w przypadkach NSCLC, dotyczą genu dla domeny kinazy tyrozynowej. Są to: delecja 6-7 kodonów w eksonie 19 (utrata aminokwasów w pozycjach 746-753) oraz mutacja punktowa L858R w eksonie 21 [69, 70]. W wyniku mutacji genu odpowiedzialnego za syntezę domeny kinazy tyrozynowej dochodzi do stałego jej pobudzenia. Obecność powyższych mutacji warunkuje skuteczność leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej (gefitinib, erlotinib) chorych na NSCLC. Mutacje te wykryto u 8 z 9 pacjentów, którzy dobrze odpowiedzieli na leczenie gefitinibem, nie wykryto ich zaś u żadnego z pacjentów (n=7), u których ta terapia nie przyniosła oczekiwanych rezultatów [69].



Ryc. 3. Schematycznie przedstawione różnice pomiędzy EGFR i jego nieprawidłową formą, tj. EGFRvIII

Tab. III. Częstość występowania wariantu III mutacji genu kodującego syntezę receptora czynnika wzrostu naskórka (EGFRvIII) w różnych nowotworach [67, 73-76]

Typ nowotworu	Częstość występowania EGFRvIII (% przypadków)
Rak gruczołu krokowego	100
Rdzeniaki	86
Rak wewnątrzprzewodowy piersi	78
Rak jajnika	75
Pierwotnie inwazyjny rak piersi	68
Glejak u dzieci	66
Rak żołądka	61
Glejak wielopostaciowy	58
Gwiaździaki	56
Nowotwory złośliwe okolicy głowy i szyi	42
Niedrobnokomórkowy rak płuca	16

W innym badaniu aż 16 z 17 pacjentów (94,1%), u których wykryto ww. mutacje, odpowiedziało na leczenie gefitinibem [70]. Dla porównania, odpowiedź w grupie 51 pacjentów, u których nie stwierdzono tych mutacji, wyniosła zaledwie 13%.

Innym przykładem może być wariant V mutacji EGFR, w wyniku której dochodzi do utraty zdolności wiązania c-Cbl przez EGFR [71], przez co dochodzi do zaburzeń internalizacji receptora [72]. (Tab. III).

Efekt pobudzenia receptora

Przyłączenie liganda do receptora EGFR prowadzi do uruchomienia kaskady przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego. Schematycznie szlak ten przedstawia Rycina 4 [14, 77].

Połączenie liganda z domeną zewnątrzkomórkową receptora dla EGF jest tzw. „mechanizmem spustowym”, którego efektem jest zainicjowanie ciągu zdarzeń

wewnątrzkomórkowych. Nasilenie powstałego sygnału wewnątrzkomórkowego zależy od [78]:

- rodzaju i stężenia liganda,
- rodzaju receptora i nasilenia jego ekspresji,
- czasu trwania połączenia liganda z receptorem.

Nadmierna aktywność EGFR

Nadmierna aktywność EGFR uzależniona jest od kilku ważnych zjawisk. Jak podkreślono wcześniej: jeden ligand może wiązać się z wieloma typami receptorów z rodziny ErbB, z drugiej zaś strony – jeden receptor może wiązać wiele rodzajów ligandów. Mechanizm ten optymalizuje efektywność układu receptorowego, co w warunkach zdrowia jest zjawiskiem korzystnym. Łatwo można sobie bowiem wyobrazić agenezę lub hipogenezę tkanki, spowodowaną brakiem szlaków molekularnych warunkujących jej rozwój. Z drugiej zaś strony, jest to zjawisko, które komplikuje podejście terapeutyczne do hamowania procesu nowotworzenia poprzez blokowanie receptorów błonowych. Gdyby za przekazanie sygnału odpowiadał tylko jeden receptor, łączący się wyłącznie z jednym ligandem, zablokowanie tego procesu byłoby stosunkowo proste. Przy obecnych możliwościach technicznych wyprodukowanie przeciwciała blokującego ten układ nie stanowiłoby istotnego problemu. Istnieje jednak szereg uwarunkowań nadmiernej aktywności EGFR, do których zalicza się (Ryc. 5):

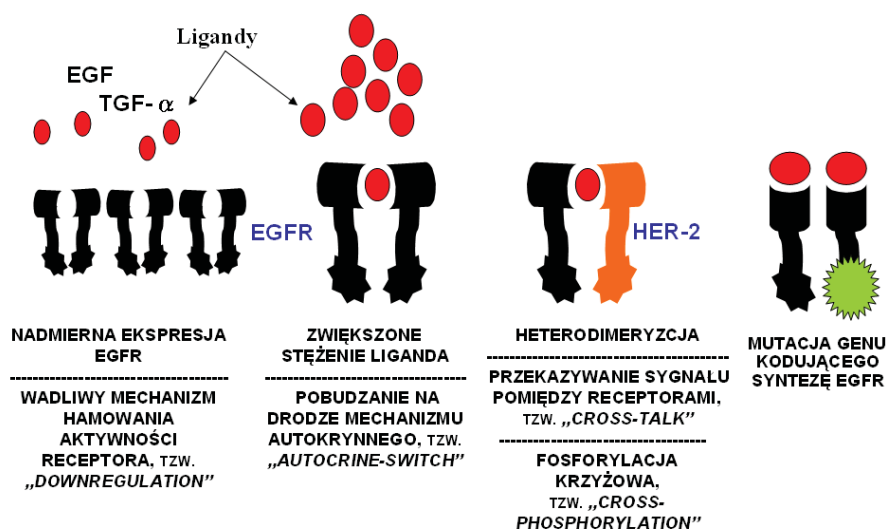
- nadmierną ekspresję EGFR;
- wadliwy mechanizm hamowania aktywności receptora;
- zwiększone stężenie liganda;
- samopobudzanie EGFR na drodze mechanizmu autokrynnego, tzw. *autocrine switch*;
- heterodimeryzację;
- wymianę sygnałów pomiędzy receptorami, tzw. *cross-talk*;
- fosforylację krzyżową, tzw. *cross-phosphorylation*;
- mutację genu kodującego syntezę EGFR.

Samopobudzenie EGFR na drodze mechanizmu autokrynnego, tzw. *autocrine switch*, polega na zmianie rodzaju oddziaływania ligand – receptor. W warunkach



Ryc. 4. Efekt pobudzenia EGFR [14, 77]

EGFR (*epidermal growth factor receptor*) – receptor czynnika wzrostu naskórka; PLC – fosfolipaza C; Ras – szlak przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego; STATs (*signal transducers and activators of transcription*) – przekaźniki sygnału i aktywatory transkrypcji



Ryc. 5. Mechanizmy nadmiernej aktywności EGFR [79]

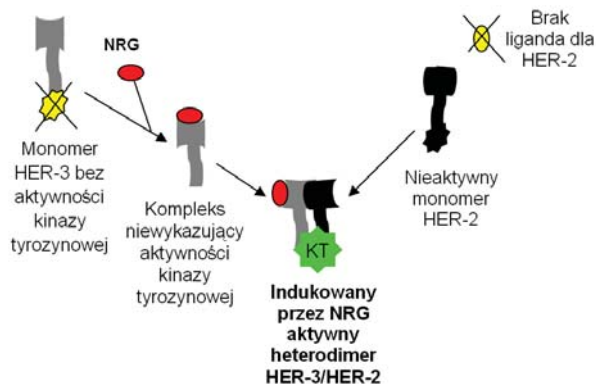
EGF (*epidermal growth factor*) – czynnik wzrostu naskórka; EGFR (*epidermal growth factor receptor*) – receptor czynnika wzrostu naskórka; HER-2 (ErbB-2) – receptor z rodziny ErbB; TGF- α (*transforming growth factor- α*) – transformujący czynnik wzrostu – α

fizjologii hormony wzrostu działają na receptory na drodze parakrynej. Wraz z płynem międzykomórkowym hormony docierają do receptorów zlokalizowanych na sąsiadujących komórkach. W wyniku transformacji nowotworowej dochodzi do zmian w komórce, prowadzących do wydzielania przez nią czynników wzrostu, stymulujących receptory obecne na tej komórce – oddziaływanie autokryne. Może też dochodzić do zapoczątkowania syntezy EGFR i w konsekwencji – zwiększenia ekspresji receptorów, które łączą się z syntetyzowanymi wcześniej przez tą komórkę czynnikami wzrostu [80]. *Autocrine-switch* przyczynia się do progresji choroby nowotworowej.

Dimeryzacja to proces łączenia się dwóch pobudzo-nych receptorów. Połączenie jednakowych receptorów nazywane jest homodimeryzacją, zaś o heterodimeryzacji mówi się, gdy dochodzi do interakcji receptorów o różnej budowie. Z analizy struktury homo- i heterodimerów [81] wynika, iż EGFR jest zdolny tworzyć aktywne homodimery oraz heterodimery z receptorem HER-2. Zaobserwowano również, że zarówno homodimery EGFR, jak i heterodimery EGFR/HER-2 mają wysokie powinowactwo do EGF, TGF- α , betaceluliny, bireguliny i HB-EGF. Chociaż wcześniej opublikowane prace wskazują na aktywność heterodimerów EGFR/HER-3 [82, 83] oraz EGFR/HER-4 [84], to wydaje się, że aktywność ta jest zależna od obecności EGFR w danym heterodimerze oraz od rodzaju przyłączonego liganda.

W wyniku dimeryzacji dochodzi do optymalnego wykorzystania właściwości receptorów ulegających połączeniu. Dimeryzacją można wytłumaczyć wiele zjawisk, które jak dotąd pozostawały poza możliwością wyjaśnienia. Skąd bowiem gorsze rokowanie u chorych na raka piersi, u których na komórkach nowotworowych stwierdza się nadekspresję receptora HER-2, skoro do chwili obecnej nie zidentyfikowano liganda, który go pobudza. Niejasna była również przyczyna nasilonego przekazywania wewnątrzkomórkowego w komórkach charakteryzu-

jących się nadmierną ekspresją tego receptora, w porównaniu do komórek o mniejszej ekspresji [85]. Z drugiej strony zwraca również uwagę aktywność receptora HER-3, który nie wykazuje aktywności kinazy tyrozynowej. Interesujące jest, iż izolowana obecność receptora HER-2 lub HER-3 na błonie komórkowej nie prowadzi do pobudzenia kaskady sygnałów wewnątrzkomórkowych. Opisano jednak interakcję między tymi dwoma receptorami [85]. Nieaktywny receptor HER-3 łączy się ze swoim ligandem – neuregulina, co doprowadza do zmiany jego konformacji przestrzennej i umożliwia dimeryzację z nieaktywnym receptorem HER-2, którego ważną cechą jest konstytucjonalnie otwarta konformacja (umożliwiająca połączenie się z innym receptorem, niezależnie od przyłączenia liganda). Dimeryzacja taka prowadzi do uaktywnienia kinazy tyrozynowej HER-2. Dzięki temu receptor bez aktywności efektorowej (HER-3) „korzysta” z domeny wewnątrzkomórkowej receptora HER-2,



Ryc. 6. Heterodimeryzacja – optymalne wykorzystanie „nieoptymalnych” form receptorów [85].

HER-2 (ErbB-2) – receptor z rodziny ErbB; HER-3 (ErbB-3) – receptor z rodziny ErbB; HER-3/HER-2 – heterodimer HER-3 i HER-2; HER-3/NRG – kompleks receptora HER-3 z jego ligandem – neuregulina; NRG – neuregulina

do pobudzenia którego nie mogłoby dojść bez zjawiska heterodimeryzacji (Ryc. 6).

Należy również wspomnieć o innych konsekwencjach heterodimeryzacji. Wiadomo, że aktywność receptora jest hamowana w wyniku endocytozy. Homodimery EGFR ulegają szybkiej endocytozie, tzn. unieczynnieniu poprzez internalizację wraz z częścią błony komórkowej. Proces ten związany jest z dużym wzajemnym powinowactwem kompleksów homodimerów EGFR i ligazy ubikwityny (c-Cbl), która „naznacza” białka przeznaczone do degradacji. Natomiast heterodimery, np. EGFR/HER-2 i EGFR/HER-3, pozostają na powierzchni błony komórkowej dłużej niż homodimery EGFR [86]. Heterodimery zawierające HER-2 wywołują dłuższą i silniejszą aktywację szlaków przekazywania niż heterodimery nie zawierające tego receptora, ponieważ obecność HER-2 w dimerze skutkuje szeregiem następstw [85]:

- zwiększa powinowactwo liganda do partnera z kompleksu receptorowego,
- zmniejsza dynamikę internalizacji kompleksu receptor – ligand,
- ułatwia ponowne wykorzystanie receptora.

Wyniki badań przedklinicznych wskazują, iż działanie antyproliferacyjne leków skierowanych przeciwko jednemu z receptorów ErbB może zostać zniesione przez obecność liganda dla innego receptora z tej rodziny. Otóż skuteczność przeciwciała 4d5 przeciwko HER-2 znoszona jest przez peptyd podobny do EGF, reagujący z EGFR, natomiast stymulacja HER-2 przy zastosowaniu tego peptydu niwelowana jest przez podanie inhibitora kinazy tyrozynowej, wykazującego aktywność anti-HER-2 i anti-EGFR [87]. Może to mieć implikacje kliniczne, związane z opornością na przeciwciała stosowane w monoterapii.

Dimeryzacja umożliwia krzyżową fosforylację domen kinazy tyrozynowej receptorów, pozostających w kompleksie (*cross-phosphorylation*). Warunkiem wystąpienia transfosforylacji jest obecność podobnych fragmentów szlaków przekazywania wewnątrzkomórkowego (Ryc. 7). Szlak sygnałowy jest specyficzny dla każdego dimeru i zależy od rodzaju receptorów ulegających połączeniu. I tak, homodimer EGFR przyłącza białka: Shc

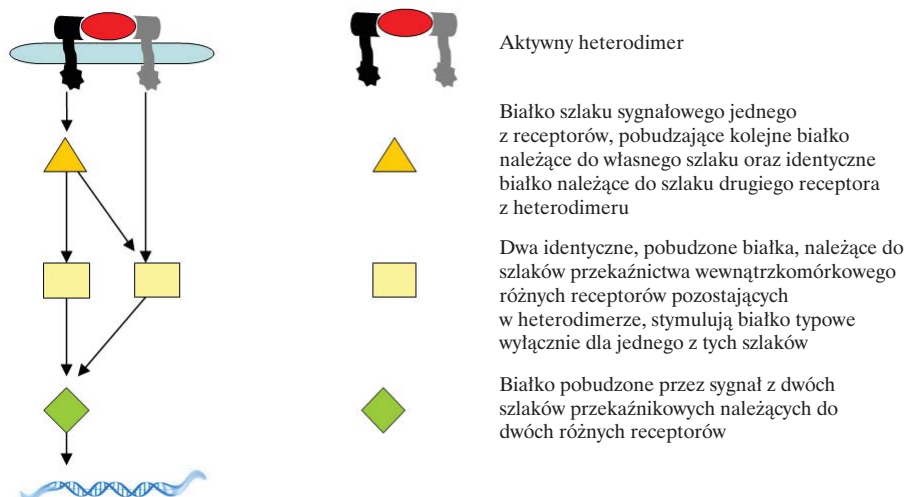
(rodzina białek łącznikowych), Cbl (rodzina ligaz związanych z ubikwityną) i Grb2 (białko wiążące receptor dla czynnika wzrostu typu 2). Heterodimer EGFR/HER-4 przyłącza zaś Shc, natomiast nie łączy się z Cbl ani z Grb2.

Wymiana sygnałów pomiędzy receptorami, tzw. *cross-talk*, to aktywacja białek przezbłonowych, należących do odmiennych układów receptorowych. Opisano dwa mechanizmy *cross-talk* [61]:

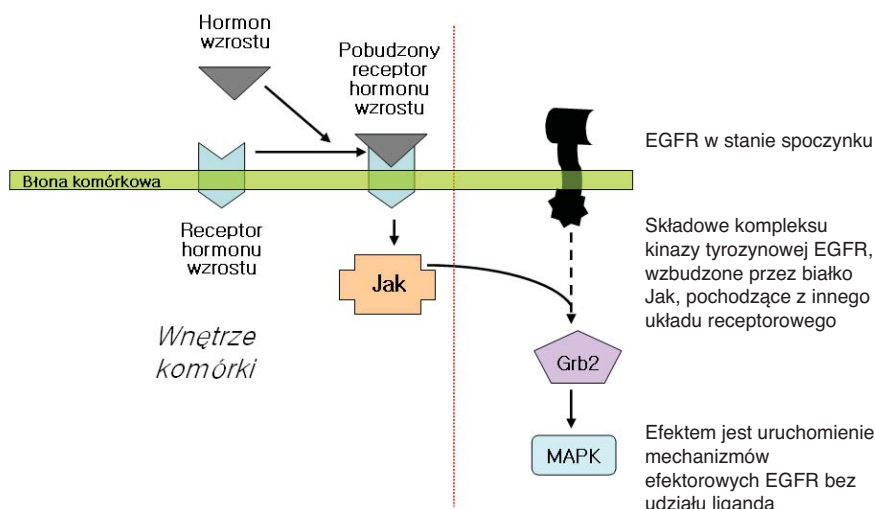
- składowe kaskady kinazy tyrozynowej receptora z rodziny ErbB są fosforylowane przez domeny kinazy tyrozynowej receptora z innej grupy;
- pobudzenie receptora z rodziny ErbB następuje w wyniku aktywności receptora z innej grupy.

Pierwszy z tych mechanizmów dobitnie obrazuje interakcja, do jakiej dochodzi pomiędzy receptorem dla hormonu wzrostu, a EGFR (Ryc. 8). W konsekwencji aktywacji kinazy tyrozynowej receptora hormonu wzrostu dochodzi do aktywacji białka Jak (*Janus-type tyrosine kinase* – kinaza tyrozynowa typu Janus), która z kolei fosforyluje tyrozynę jednej z domen kompleksu kinazy zależnej od EGFR. Prowadzi to do utworzenia miejsca wiązania dla Grb2, a przez to – do aktywacji MAPK (*mitogen-activated protein kinase* – kinaza białkowa aktywowana mitogenem) [88], będącej składową kaskady kinazy tyrozynowej EGFR. Podobne zjawisko występuje w przypadku interakcji receptora HER-3 i kompleksu sygnałowego, związanego z INF- α (interferonem – α) [89]. Receptory cytokin i integryn mogą również transaktywować EGFR w analogiczny sposób [90].

Wpływ receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCRs – *G protein-coupled receptors*) na EGFR jest egzemplifikacją drugiego mechanizmu transaktywacji EGFR. Otóż połączenie liganda (np. endoteliny, trombiny, bombazyny) z receptorem GPCR powoduje aktywację jednej z metaloproteinaz, która z kolei aktywuje pro-HB-EGF (*pro-heparin-binding-epidermal growth factor* – prekursor czynnika wzrostu naskórka wiążącego heparynę) do HB-EGF [91]. Aktywna forma HB-EGF pobudza EGFR na drodze auto- i parakrynej.



Ryc. 7. Schemat fosforylacji krzyżowej, „*cross-phosphorylation*”



Ryc. 8. Wymiana sygnałów pomiędzy receptorami, tzw. „cross-talk”: receptor hormonu wzrostu i EGFR [88] EGFR (*epidermal growth factor receptor*) – receptor czynnika wzrostu naskórka; Grb2 (*growth factor receptor binding protein type 2*) – białko wiążące receptor dla czynnika wzrostu typu 2; Jak (*Janus-type tyrosine kinase*) – kinaza tyrozynowa typu Janus; MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) – kinaza białkowa aktywowana mitogenem

Ważna, z punktu widzenia biologii nowotworu, jest wymiana sygnałów pomiędzy receptorami, tzw. *cross-talk*, pomiędzy EGFR, a receptorem czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (*vascular endothelial growth factor receptor* – VEGFR). Szlaki przekazywania wewnątrzkomórkowego obu tych receptorów nie są całkowicie izolowane. W związku z tym może dochodzić do interakcji pomiędzy składowymi obu tych szlaków (transaktywacja). Zahamowanie jednego z tych szlaków niwelowane jest przez sygnały pochodzące z pokrewnych fragmentów szlaku należącego do drugiego receptora. Zablockowanie obu tych receptorów może doprowadzić do całkowitego przerwania szlaku odpowiedzialnego za progresję choroby nowotworowej. Ponadto, badania przedkliniczne potwierdziły, iż aktywność EGF indukuje syntezę VEGF w komórkach nowotworowych różnych guzów złośliwych [92]. W modelach zwierzęcych EGFR wykrywany jest również w śródbłonku naczyń zaopatrujących nowotwór [93]. Zwiększona synteza VEGF, wynikająca z pobudzenia EGFR, może zostać całkowicie zablockowana przez inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR. Skutkuje to zmniejszeniem sieci unaczynienia guza, zahamowaniem proliferacji oraz pobudzeniem apoptozy komórek nowotworowych i komórek śródbłonka naczyń [94, 95]. Badania na zwierzętach wykazały lepszy efekt skojarzonego leczenia przeciwciałami anty-EGFR i anty-VEGFR, niż w przypadku stosowania tych leków w monoterapii [96, 97]. Obserwacje te zostały potwierdzone w badaniach klinicznych nad skutecznością terapii skojarzonej, w skład której wchodzi przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko odmiennym celom molekularnym [98].

Efektym przyłączenia liganda do EGFR, w następstwie jego dimeryzacji i pobudzenia, jest aktywacja szlaków przekazywania wewnątrzkomórkowego. Prowadzi to do proliferacji komórek nowotworowych, hamowania apoptozy, zwiększenia zdolności tych komórek do przeżycia, a także do pobudzenia inwazji, nasilenia angiogenezy,

ułatwienia tworzenia przerzutów odległych – a w konsekwencji – do progresji choroby nowotworowej [14, 15]. Aktywacja EGFR może być również przyczyną oporności na radio- i/lub chemioterapię [99].

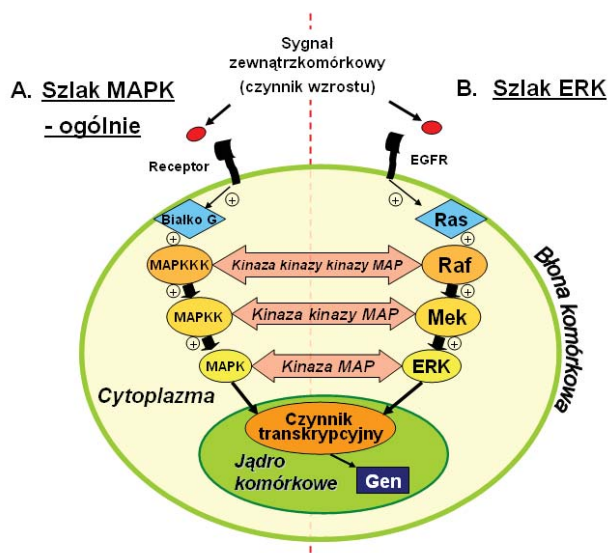
Główne szlaki przekazywania wewnątrzkomórkowego związane z aktywnością EGFR

Map (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*) – kinaza białkowa aktywowana mioginem jest szeroko rozpowszechnioną grupą kinaz serynowo-treoninowych, które „tłumaczą” sygnały zewnątrzkomórkowe na język „zrozumiały” dla komórki. Przekazują ważne sygnały istotne w regulacji cyklu komórkowego, procesach proliferacji, a także różnicowania komórek [100, 101]. Szlak Map odpowiada również za tzw. efekt *oncogenic switch*, czyli nabycie przez komórkę cech złośliwości. Wyróżnia się 3 główne grupy kinaz Map [102]:

- rodzina ERK (*extracellular signal-regulated kinase family*) – rodzina kinaz regulowanych sygnałem zewnątrzkomórkowym;
- rodzina kinaz p38 Map;
- rodzina kinaz c-Jun NH₂ (NH₂ – *terminal kinase family*) – rodzina kinaz NH₂ – końcowych.

Map działa poprzez fosforylację kolejnych białek, aż do fosforylacji czynników transkrypcyjnych, a przez to reguluje ekspresję genów (Ryc. 9).

Akt (PKB, *protein kinase B* – kinaza białkowa B) to kinaza serynowo-treoninowa, odpowiedzialna głównie za regulowanie procesów proliferacji i przeżycia komórki. Akt jest aktywowane przez kinazę fosfatydylo-3-inozytolu (PI3K – *phosphatidylinositol-3 kinase*) [104]. Akt fosforyluje wiele białek cytoplazmatycznych i jądrowych, regulujących metabolizm i dojrzewanie komórki. Zaburzenia funkcjonowania Akt prowadzą, między innymi, do rozwoju wielu nowotworów i powstania cukrzycy. Nadmierną ekspresję genów kodujących Akt1 i 2 stwier-



Ryc. 9. A. Schemat szlaku przekąźnikowego MAPK; B. Szlak ERK [103]

EGFR (*epidermal growth factor receptor*) – receptor czynnika wzrostu naskórka; ERK (*extracellular signal-regulated kinase family*) – rodzina kinaz regulowanych sygnałem zewnątrzkomórkowym; MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) – kinaza białkowa aktywowana mitogenem; Mek – kinaza białkowa, substrat ERK; Raf – specyficzna kinaza serynowo-treoninowa; Ras – białko, błonowa GTP-aza; + – pobudzenie

dzono w nowotworach złośliwych jajnika, gruczołu krokowego, trzustki, żołądka i piersi [105]. Akt może również aktywować śródbłonkową syntezę tlenu azotu, będącą czynnikiem proangiogennym. Aktywacja szlaku kinazy białkowej B może również prowadzić do powstania metaloproteinaz, odpowiedzialnych za inwazję i tworzenie przerzutów [106].

Podsumowanie

Receptor czynnika wzrostu naskórka (EGFR) był jednym z najwcześniej zidentyfikowanych i opisanych białek, odpowiedzialnych za przekazywanie sygnału z zewnątrz do wnętrza komórki. Jego ligandami są czynniki wzrostu, co czyni go ważnym ogniwem w procesach proliferacji, różnicowania, adhezji, migracji i przeżycia komórek. O ile prawidłowe funkcjonowanie tego układu zapewnia prawidłowy rozwój organizmu, o tyle zaburzenia jego funkcji mogą być brzemienne w skutkach i prowadzić do rozwoju choroby nowotworowej. Aktualnie preparaty interferujące z aktywnością EGFR stosowane są w praktyce klinicznej. Coraz częściej leczenie ukierunkowane na EGFR kojarzone jest z innymi metodami postępowania przeciwnowotworowego, stwarzając chorym na nowotwory szansę na wydłużenie życia. Ten sukces terapii celowanej wydaje się jednak niepełny. Optymistyczne wyniki badań eksperymentalnych nie zawsze potwierdzają się w badaniach klinicznych. Przykładem jest zidentyfikowanie u części chorych na raka płuca mutacji genu kodującego syntezę EGFR, która odpowiada za korzystny efekt stosowania inhibitorów kinazy tyrozynowej [69, 107]. Wyjaśnienie przyczyn tego stanu rzeczy może zależeć od dokładnego zrozumienia mechanizmów funkcjonowania układów

receptorowych, będących celem tej terapii. Kolejnym, ważnym aspektem leczenia celowanego jest kwalifikacja pacjentów do optymalnej dla nich formy terapii.

Prof. dr hab. med. Marek Z. Wojtukiewicz
Klinika Onkologii
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Białostockie Centrum Onkologii
ul. Ogrodowa 12
15-027 Białystok
e-mail: mwojtuk@amb.edu.pl
e-mail: ewa.sierko@iq.pl

Piśmiennictwo

- Cohen S, Elliott GA. The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. *J Invest Dermatol* 1963; 40: 1-5.
- Barnes D, Sato G. Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal Biochem* 1980; 102: 255-70.
- Sporn MB, Todaro GJ. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Engl J Med* 1980; 303: 878-80.
- Cohen S, Carpenter G, King L Jr. Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J Biol Chem* 1980; 255: 4834-42.
- Weber RS, Pathak S, Frankenthaler R i wsp. Effect of epidermal growth factor (EGF) on a newly established head and neck squamous carcinoma cell line. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1988; 99: 567-73.
- Thompson DM, Gill GN. The EGF receptor: structure, regulation and potential role in malignancy. *Cancer Surv* 1985; 4: 767-88.
- Edwin F, Wiepuz GJ, Singh R i wsp. A historical perspective of the EGF receptor and related systems. *Methods Mol Bio.* 2006; 327: 1-24.
- Sato JD, Kawamoto T, Le AD i wsp. Biological effects *in vitro* of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors. *Mol Biol Med* 1983; 1: 511-29.
- Masui H, Kawamoto T, Sato JD i wsp. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1984; 44: 1002-7.
- Gill GN, Kawamoto T, Cochet C i wsp. Monoclonal anti-epidermal growth factor receptor antibodies which are inhibitors of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity. *J Biol Chem* 1984; 259: 7755-60.
- Cigarroa FG, Coughlin JP, Donahoe PK i wsp. Recombinant human mullerian inhibiting substance inhibits epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Growth Factors* 1989; 1: 179-91.
- Cohen S Nobel lecture. Epidermal growth factor. *Biosci Rep* 1986; 6: 1017-28.
- Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F i wsp. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995; 19: 183-232.
- Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 637-43.
- Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 1999; 82: 241-250.
- Laimer K, Spizzo G, Gastl G i wsp. High EGFR expression predicts poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: A TMA-based immunohistochemical analysis. *Oral Oncol* 2006; 43: 193-8.
- Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001; 37: 9-15.
- Ritter CA, Arteaga CL. The epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase: a promising therapeutic target in solid tumors. *Semin Oncol* 2003; 30: 3-11.
- Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8: 3-9.
- Kim JW, Kim YT, Kim DK i wsp. Expression of epidermal growth factor receptor in carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1996; 60: 283-7.
- Fuchs I, Vorstehar N, Buhler H i wsp. The prognostic significance of human epidermal growth factor receptor correlations in squamous cell cervical carcinoma. *Anticancer Res* 2007; 27: 959-63.

22. Rusch V, Baselga J, Cordon-Cardo C i wsp. Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung. *Cancer Res* 1993; 53: 2379-85.
23. Cerny T, Barnes DM, Hasleton P i wsp. Expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human lung tumours. *Br J Cancer* 1986; 54: 265-9.
24. Cowley GP, Smith JA, Gusterson BA. Increased EGF receptors on human squamous carcinoma cell lines. *Br J Cancer* 1986; 53: 223-9.
25. Lee CS, Redshaw A, Boag G. Epidermal growth factor receptor immunoreactivity in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Pathology* 1997; 29: 251-4.
26. Almadori G, Cadoni G, Galli J i wsp. Epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal cancer: an independent prognostic factor of neck node relapse. *Int J Cancer* 1999; 84: 188-91.
27. Maurizi M. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 74: 1253-7.
28. Wang SS, Guan ZZ, Xiang YQ i wsp. Significance of EGFR and p-ERK expression in nasopharyngeal carcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2006; 28: 28-31.
29. Ang KK, Berkey BA, Tu X i wsp. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 7350-6.
30. Suzuki S, Dobashi Y, Sakurai H i wsp. Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in non-small cell lung carcinomas. An immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study. *Cancer* 2005; 103: 1265-73.
31. Nakamura H, Kawasaki N, Taguchi M i wsp. Survival impact of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Thorax* 2006; 61: 140-5.
32. Veale D. The relationship of quantitative epidermal growth factor receptor expression in non-small cell lung cancer to long term survival. *Br J Cancer* 1993; 68: 162-5.
33. Okamoto I. Expression of constitutively activated EGFRvIII in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2003; 94: 50-6.
34. Hamada J. Enhanced effect of epidermal growth factor on pulmonary metastasis and in vitro invasion of rat mammary carcinoma cells. *Cancer Lett* 1995; 89: 161-7.
35. Fang K, Chen MH. Transfection of anti-sense complementary DNA of human epidermal-growth-factor receptor attenuates the proliferation of human non-small-cell-lung-cancer cells. *Int J Cancer* 1999; 81: 471-8.
36. Al Moustafa AE, Yansouni C, Alaoui-Jamali MA i wsp. Up-regulation of E-cadherin by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 681-6.
37. Gamou S, Hunts J, Harigai H i wsp. Molecular evidence for the lack of epidermal growth factor receptor gene expression in small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res* 1987; 47: 2668-73.
38. Haeder M, Rotsch M, Bepler G i wsp. Epidermal growth factor receptor expression in human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1988; 48: 1132-6.
39. Damstrup L. *In vitro* invasion of small-cell lung cancer cell lines correlates with expression of epidermal growth factor receptor. *Br J Cancer* 1998; 78: 631-40.
40. Normanno N, Ciardiello FJ. EGF-related peptides in the pathophysiology of the mammary gland. *Mammary Gland Biol Neoplasia* 1997; 2: 143-51.
41. Walker RA, Dearing SJ. Expression of epidermal growth factor receptor mRNA and protein in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 53: 167-76.
42. Klijn JG, Berns PM, Schmitz PI i wsp. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGFR) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr Rev* 1992; 13: 3-17.
43. Chan KC, Knox WF, Gandhi A i wsp. Blockade of growth factor receptors in ductal carcinoma in situ inhibits epithelial proliferation. *Br J Surg* 2001; 88: 412-8.
44. Kim H, Muller WJ. The role of the epidermal growth factor receptor family in mammary tumorigenesis and metastasis. *Exp Cell Res* 1999; 253: 78-87.
45. Wikstrand CJ, Hale LP, Batra SK i wsp. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res* 1995; 55: 3140-8.
46. Tang CK, Gong XQ, Moscatello DK i wsp. Epidermal growth factor receptor vIII enhances tumorigenicity in human breast cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 3081-7.
47. Tørring N, Jørgensen PE, Sørensen BS i wsp. Increased expression of heparin binding EGF (HB-EGF), amphiregulin, TGF alpha and epiregulin in androgen-independent prostate cancer cell lines. *Anticancer Res* 2000; 20: 91-5.
48. Shah RB, Ghosh D, Elder JT. Epidermal growth factor receptor (ErbB1) expression in prostate cancer progression: correlation with androgen independence. *Prostate* 2006; 66: 1437-44.
49. Schafer W, Funke PJ, Kunde D i wsp. Intensity of androgen and epidermal growth factor receptor immunoreactivity in samples of radical prostatectomy as prognostic indicator: correlation with clinical data of long-term observations. *J Urol* 2006; 176: 532-7.
50. Kim HG, Kassis J, Souto JC i wsp. EGF receptor signaling in prostate morphogenesis and tumorigenesis. *Histol Histopathol* 1999; 14: 1175-82.
51. Kumar VL, Majumder PK, Gujral S i wsp. Comparative analysis of epidermal growth factor receptor mRNA levels in normal, benign hyperplastic and carcinomatous prostate. *Cancer Lett* 1998; 134: 177-80.
52. De Miguel P, Royuela, Bethencourt R i wsp. Immunohistochemical comparative analysis of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor in normal, hyperplastic and neoplastic human prostates. *Cytokine* 1999; 11: 722-7.
53. Lu Y, Cai Z, Galson DL i wsp. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) acts as a paracrine and autocrine factor for prostate cancer growth and invasion. *Prostate* 2006; 66: 1311-8.
54. Angelucci A, Gravina GL, Rucci N i wsp. Suppression of EGF-R signaling reduces the incidence of prostate cancer metastasis in nude mice. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 197-210.
55. Hynes NE, Horsch K, Olayioye MA i wsp. The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8: 151-9.
56. Cohen S, Carpenter G. Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 1317-21.
57. Ogiso H, Ishitani R, Nureki O i wsp. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 2002; 110: 775-87.
58. Richter A, Drummond DR, MacGarvie J i wsp. Contribution of the transforming growth factor alpha B-loop beta-sheet to binding and activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1995; 270: 1612-6.
59. Derynck R. The physiology of transforming growth factor-alpha. *Adv Cancer Res* 1992; 58: 27-52.
60. Hunter T. The epidermal growth factor receptor gene and its product. *Nature* 1984; 311: 414-6.
61. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 2003; 284: 99-110.
62. Garrett TP, McKern NM, Lou M i wsp. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 2002; 110: 763-73.
63. Martin-Nieto J, Villalobo A. The human epidermal growth factor receptor contains a juxtamembrane calmodulin-binding site. *Biochemistry* 1998; 37: 227-36.
64. Zandi R, Larsen AB, Andersen P i wsp. Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell Signal* 2007; 19: 2013-23.
65. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH i wsp. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 2965-9.
66. Frederick L, Wang XY, Eley G i wsp. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res* 2000; 60: 1383-7.
67. Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM i wsp. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5064-73.
68. Okamoto I, Kenyon LC, Emlen DR i wsp. Expression of constitutively activated EGFRvIII in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2003; 94: 50-6.
69. Paez JG, Janne PA, Lee JC i wsp. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304: 1497-500.
70. Mitsudomi T, Kosaka T, Endoh H i wsp. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2513-20.
71. Peschard P, Park M. Escape from Cbl-mediated downregulation: a recurrent theme for oncogenic deregulation of receptor tyrosine kinases. *Cancer Cell* 2003; 3: 519-23.
72. Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA i wsp. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell* 1999; 4: 1029-40.
73. Wikstrand CJ, McLendon RE, Friedman AH i wsp. Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII. *Cancer Res* 1997; 57: 4130-40.
74. Garcia de Palazzo IE, Adams GP i wsp. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 1993; 53: 3217-20.

75. Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK i wsp. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 1995; 55: 5536-9.
76. Ge H, Gong X, Tang CK. Evidence of high incidence of EGFRvIII expression and coexpression with EGFR in human invasive breast cancer by laser capture microdissection and immunohistochemical analysis. *Int J Cancer* 2002; 98: 357-61.
77. Sedlacek HH. Kinase inhibitors in cancer therapy: a look ahead. *Drugs* 2000; 59: 435-76.
78. Adamson ED, Rees AR. Epidermal growth factor receptors. *Mol Cell Biochem* 1981; 34: 129-52.
79. Arteaga CL. Epidermal Growth Factor Receptor Dependence in Human Tumors: More Than Just Expression? *Oncologist* 2002; 7: 31-39.
80. Lu C, Kerbel RS. Interleukin-6 undergoes transition from paracrine growth inhibitor to autocrine stimulator during human melanoma progression. *J Cell Biol* 1993; 120: 1281-8.
81. Jones JT, Akita RW, Sliwkowski MX. Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett* 1999; 447: 227-31.
82. Riese DJ, van Raaij TM, Plowman GD i wsp. The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the ErbB receptor family. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 5770-6.
83. Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H i wsp. Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J* 1996; 15: 2452-67.
84. Riese DJ, Kim ED, Elenius K i wsp. The epidermal growth factor receptor couples transforming growth factor-alpha, heparin-binding epidermal growth factor-like factor, and amphiregulin to Neu, ErbB-3, and ErbB-4. *J Biol Chem* 1996; 271: 20047-52.
85. Britten CD. Targeting ErbB receptor signaling: a pan-ErbB approach to cancer. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 1335-42.
86. Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML i wsp. Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J* 1998; 17: 3385-97.
87. Motoyama AB, Hynes NE, Lane HA. The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res* 2002; 2: 3151-8.
88. Zwick E, Hackel PO, Prenzel N i wsp. The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20: 408-12.
89. Walters DK, Jelinek DF. A role for Janus kinases in crosstalk between ErbB3 and the interferon-alpha signaling complex in myeloma cells. *Oncogene* 2004; 23: 1197-205.
90. Yamauchi T, Ueki K, Tobe K i wsp. Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone. *Nature* 1997; 390: 91-6.
91. Yan Y, Shirakabe K, Werb Z. The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *J Cell Biol* 2002; 158: 221-6.
92. Akagi M, Kawaguchi M, Liu W i wsp. Induction of neuropilin-1 ad vascular endothelial growth factor by epidermal growth factor in human gastric cancer cells. *Br J Cancer* 2003; 88: 796-802.
93. Kim SJ, Uehara H, Karashima T i wsp. Blockade of epidermal growth factor receptor signaling in tumor cells and tumor-associated endothelial cells for therapy of androgen-independent human prostate cancer growing in the bone of nude mice. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1200-10.
94. Kedar D, Baker CH, Killion JJ i wsp. Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling inhibits angiogenesis leading to regression of human renal cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3592-600.
95. Hirata A, Ogawa S, Kometani T i wsp. ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res* 2002; 62: 2554-60.
96. Jung YD, Mansfield PF, Akagi M i wsp. Effects of combination anti-vascular endothelial growth factor receptor and anti-epidermal growth factor receptor therapies on the growth of gastric cancer in a nude mouse model. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1133-40.
97. Shaheen RM, Ahmad SA, Liu W i wsp. Inhibited growth of colon cancer carcinomatosis by antibodies to vascular endothelial and epidermal growth factor receptors. *Br J Cancer* 2001; 85: 584-9.
98. Saltz LB, Lenz HJ, Kindler HL i wsp. Randomized Phase II Trial of Cetuximab, Bevacizumab, and Irinotecan Compared With Cetuximab and Bevacizumab Alone in Irinotecan-Refractory Colorectal Cancer: The BOND-2 Study. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4557-61.
99. Chakravarti A, Chakladar A, Delaney MA i wsp. The epidermal growth factor receptor pathway mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary human glioblastoma cells in a RAS-dependent manner. *Cancer Res* 2002; 62: 4307-15.
100. Lowes VL, Ip NY, Wong YH. Integration of signals from receptor tyrosine kinases and G protein-coupled receptors. *Neurosignals* 2002; 11: 5-19.
101. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995; 9: 726-35.
102. Platanias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* 2003; 101: 4667-79.
103. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000; 351: 289-305.
104. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 59-71.
105. Yang J, Cron P, Good VM i wsp. Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat Struct Biol* 2002; 9: 940-944.
106. Troussard AA, Costello P, Yoganathan TN i wsp. The integrin linked kinase (ILK) induces an invasive phenotype via AP-1 transcription factor-dependent upregulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). *Oncogene* 2000; 19: 5444-52.
107. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R i wsp. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350: 2129-39.

Otrzymano: 12 listopada 2007 r.

Przyjęto do druku: 27 listopada 2007 r.