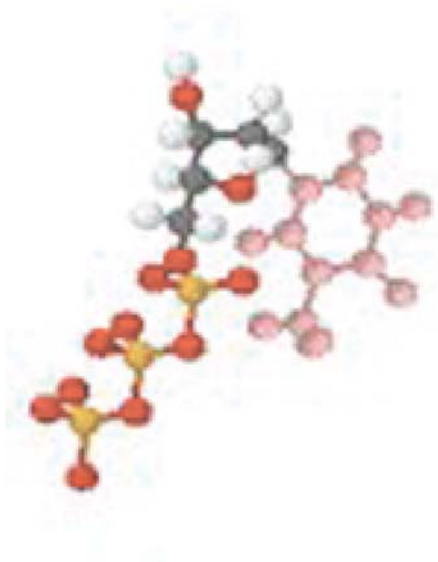


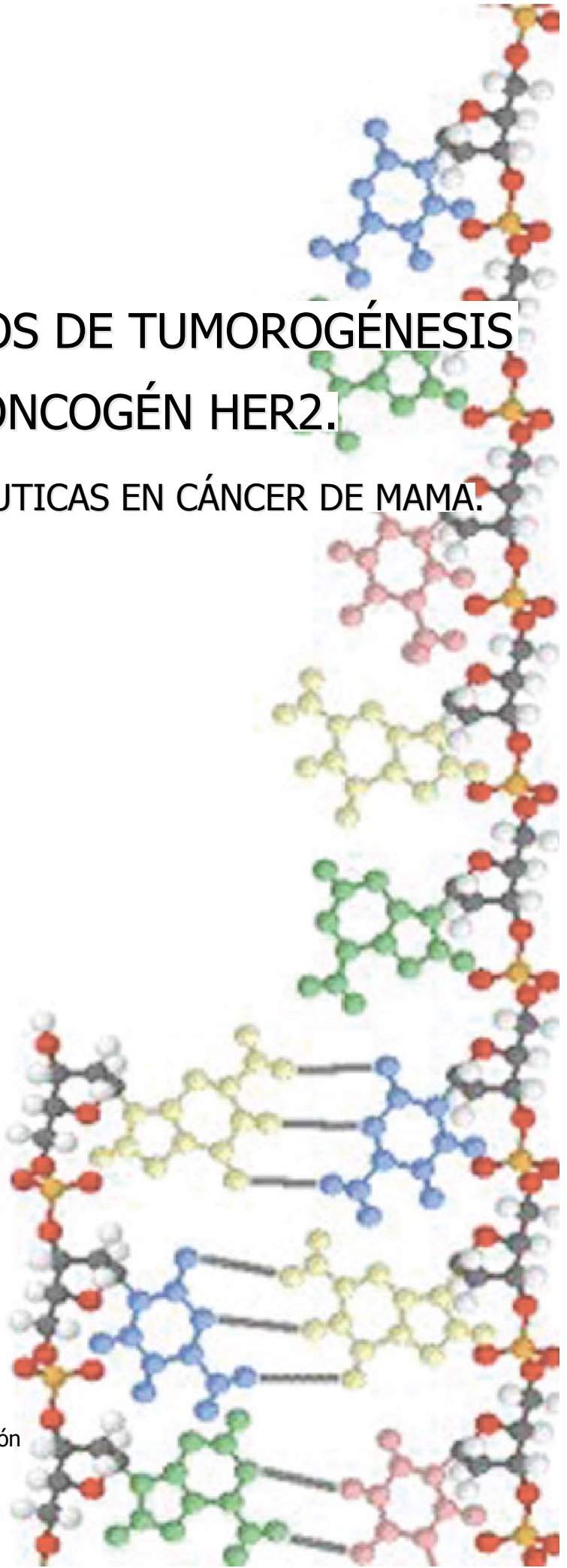
# NUEVOS MECANISMOS DE TUMOROGÉNESIS DEL PROTOONCOGÉN HER2.

IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS EN CÁNCER DE MAMA.



**Judit Anido Folgueira**

Laboratorio de Investigación Oncológica  
Instuto de Investigación del Hospital Vall d'Hebrón



Programa de Doctorado de Genética  
Departamento de Genética de la Facultad de Biología  
Universidad de Barcelona  
Bienio 2000-2002

## **NUEVOS MECANISMOS DE TUMOROGÉNESIS DEL PROTOONCOGÉN HER2. IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS EN CÁNCER DE MAMA.**

Memoria presentada por  
**Judit Anido Folgueira**

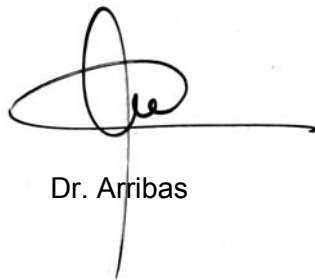
Para optar al grado de  
**Doctora en Biología**

Esta Tesis ha sido realizada en el “Programa de Investigación en Oncología Médica” del Instituto de Investigación del Hospital Universitario Vall d’ Hebrón, bajo la dirección del Doctor **Joaquín Arribas** y el Doctor **Josep Baselga**.

Los Directores,

La Tutora,

El Doctorando,



Dr. Baselga

Dr. Arribas

Dra. Balcells

Judit Anido Folgueira

Barcelona, Junio del 2006



*A mis padres y a mi hermano*

*A Diego*



Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral:

A mis directores de Tesis, el Dr. Joaquín Arribas y el Dr. Josep Baselga, por haber confiado en mi para llevar a cabo este trabajo en su laboratorio. Por todo lo que me han enseñado, por las oportunidades que me han ofrecido, por los buenos consejos científicos, y por su atención y dedicación durante estos años.

Al Doctor Joan Albanell, por enseñarme a pensar, por su capacidad didáctica y sobretodo por su calidad humana.

A la Dra. Susana Balcells y a todos los profesores del Departamento de Genética, que siempre han tenido un momento para atender mis dudas y ofrecerme sus mejores consejos.

A todos los que habéis contribuido de algún modo ( científico o no) a la realización de este trabajo.

Y sobretodo, a todos aquellos que a lo largo de mi vida habéis confiado incondicionalmente en mis posibilidades. Sois la fuerza que me empuja hacia adelante.



*ÍNDICE*

---





<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<hr/>	
LA FAMILIA DE RECEPTORES HER	2
EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES HER	2
LIGANDOS DE LA FAMILIA HER	3
DIMERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES HER	4
VÍA CANÓNICA DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR	6
OTRAS VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL :LOS RECEPTORES HER EN EL NÚCLEO	9
MECANISMOS DE TRANSPORTE DE LOS RECEPTORES HER AL NÚCLEO	10
FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES HER EN EL NÚCLEO	12
FORMAS TRUNCADAS DE LOS RECEPTORES HER	13
LOS RECEPTORES HER EN CÁNCER	16
LOS RECEPTORES HER COMO DIANAS TERAPÉUTICAS	20
CONCLUSIONES	24
<b>OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<hr/>	
<b>RESULTADOS</b>	<b>27</b>
<hr/>	
ARTÍCULO 1:	27
<b>“Iressa, a Specific Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Tyrosine Kinase Inhibitor, Induces the Formation of Inactive EGFR/HER2 and EGFR/HER3 Heterodimers and Prevents Heregulin Signaling in HER2-overexpressing Breast Cancer Cells.”</b>	
<u>Clinical Cancer Research</u> . 2003 Apr; Vol.9, No.4, pp.1274-83	
ARTÍCULO 2:	39
<b>“Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation.”</b>	
<u>EMBO Journal</u> . 2006 Jul; Vol.25, No.13, pp.3234-3244	

<u>DISCUSIÓN</u>	<u>55</u>
<u>IRESSA Y HER1</u>	55
IRESSA NO SÓLO ES EFECTIVO EN LÍNEAS CELULARES CON SOBREEXPRESIÓN DE HER1	55
MECANISMO DE ACCIÓN DE IRESSA	56
RESPUESTAS CLÍNICAS A IRESSA	58
<u>HERCEPTIN Y HER2</u>	60
UN NUEVO MECANISMO PARA GENERAR FRAGMENTOS CARBOXILO-TERMINALES DEL RECEPTOR HER2	60
LOS CTFs NO SON GENERADOS EXCLUSIVAMENTE POR SHEDDING DE ECTODOMINIOS	61
USO ALTERNATIVO DE DIFERENTES CODONES DE INICIACIÓN	62
LOS CTFs PROMUEVEN LA FORMACIÓN DE TUMORES RESISTENTES A HERCEPTIN. IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS	63
PRESENCIA DE RECEPTORES TRUNCADOS EN FAMILIA HER	64
PODER PRONÓSTICO DE LOS RECEPTORES HER NUCLEARES	67
<u>PERSPECTIVAS</u>	69
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>73</u>
<u>ABREVIATURAS</u>	<u>75</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>77</u>
<u>ANEXO</u>	<u>87</u>


OTRAS PUBLICACIONES OBTENIDAS: ARTÍCULO 3:

**“Activated Extracellular Signal-regulated Kinases:  
Association with Epidermal Growth Factor  
Receptor/Transforming Growth Factor  $\alpha$  Expression in  
Head and Neck Squamous Carcinoma and Inhibition by  
Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Treatments”**  
Cancer Research 61, 6500–6510, September 1, 2001

## INTRODUCCIÓN

---



 Las células de los organismos superiores están sometidas a un flujo continuo de información que proviene tanto de otras células como del exterior del organismo. La correcta interpretación e integración de todas estas señales es crucial para la supervivencia y adaptación tanto de la propia célula como del organismo completo. Durante la evolución, se han desarrollado múltiples mecanismos para interpretar e integrar señales, y los receptores localizados en la membrana son una parte esencial de dichos mecanismos. Entre estos, los receptores con actividad quinasa de tirosinas son capaces de traducir la información que proviene del exterior a un mensaje intracelular, que en última instancia controlará la expresión génica y por lo tanto la fisiología de la célula.

## LA FAMILIA DE RECEPTORES HER

Reflejando la complejidad creciente de los organismos durante la evolución, la familia de receptores con actividad quinasa de tirosinas conocida como familia del EGFR ( Recceptor del Factor de Crecimiento Epidérmico) o familia HER ha pasado de una simple combinación entre un único factor de crecimiento y su receptor monomérico en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Aroian, Koga et al. 1990), pasando por un único receptor y cuatro ligandos en *Drosophila melanogaster* (Freeman 1998), hasta un sistema complejo comprendido por cuatro receptores y más de una docena de ligandos como encontramos en humanos (Yarden and Sliwkowski 2001). Las múltiples combinaciones receptor-ligando permiten una gran diversidad de respuestas biológicas durante el desarrollo y en el estadio adulto.

Los miembros de la familia HER son: El EGFR/HER1/ErbB1 (Ullrich, Coussens et al. 1984), HER2/ErbB2/neu (Schechter, Hung et al. 1985), HER3/ErbB3 (Kraus, Issing et al. 1989) y HER4/ErbB4 (Plowman, Culouscou et al. 1993) (Figura 1). Todos ellos tienen una región extracelular que se divide en cuatro dominios denominados I, II, III y IV. Se ha propuesto que los dominios I y III participan en la unión al ligando mientras que los dominios II y IV están involucrados en la dimerización entre receptores. A continuación encontramos una región transmembrana y una región citoplasmática que contiene un dominio quinasa de tirosinas (formado por un lóbulo N y un lóbulo C donde encontramos el bucle de activación). El dominio quinasa de tirosinas está seguido por una cola carboxilo-terminal con sitios de autofosforilación (revisado en (Schlessinger 2002)) (Figura 2). HER3 es el único miembro de la familia que carece de actividad quinasa debido a sustituciones de residuos del dominio quinasa fundamentales para su función (Guy, Platko et al. 1994).

## EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES HER

La función concreta de cada uno de los receptores HER se ha estudiado mediante la creación de modelos animales “knock out” (KO) en ratón. Mutaciones o deleciones que inactivan cualquiera de los receptores HER dan lugar a la muerte durante la embriogénesis o la etapa postnatal. Del análisis de los defectos causados por la ausencia de cada receptor en estos modelos se ha podido deducir su función durante el desarrollo. Por ejemplo, HER1 participa en el desarrollo de las estructuras epiteliales del sistema respiratorio, el tracto gastrointestinal, el tejido epidérmico y los folículos pilosos (Miettinen,

Berger et al. 1995; Sibia and Wagner 1995; Threadgill, Dlugosz et al. 1995; Sibia, Steinbach et al. 1998). HER2 y HER4 tienen un papel esencial en el desarrollo del corazón y estructuras neuronales (Gassmann, Casagrande et al. 1995; Lee, Simon et al. 1995; Leu, Bellmunt et al. 2003) y HER3 está implicado en la formación de precursores de la células de Schwann, que se requieren para el desarrollo de la cresta neuronal (Riethmacher, Brinkmann et al. 1995; Erickson, O'Shea et al. 1997).

El hecho de que muchas de las mutaciones nulas de los receptores HER son letales durante el desarrollo embrionario o la etapa postnatal de los animales KO, ha hecho difícil el estudio de las funciones de estos receptores en estadios posteriores del desarrollo. Una manera elegante de solucionar este problema ha sido la creación de ratones KO condicionales, donde se inactiva el gen sólo en un tejido determinado. Otra manera útil de solventar el problema ha sido el uso de formas dominante-negativas de los receptores bajo el control de promotores específicos de tejido. De esta manera, se ha mostrado que la familia de receptores HER también es necesaria para el correcto funcionamiento del organismo en su fase adulta. Por ejemplo, HER1 participa en el desarrollo de la glándula mamaria (Fowler, Walker et al. 1995; Xie, Paterson et al. 1997) y HER2 y HER4 son necesarios durante la diferenciación alveolar y la lactancia (Jones and Stern 1999). HER2 también tiene un papel en el mantenimiento del corazón en la vida adulta (Crone, Zhao et al. 2002).

## **LIGANDOS DE LA FAMILIA HER**

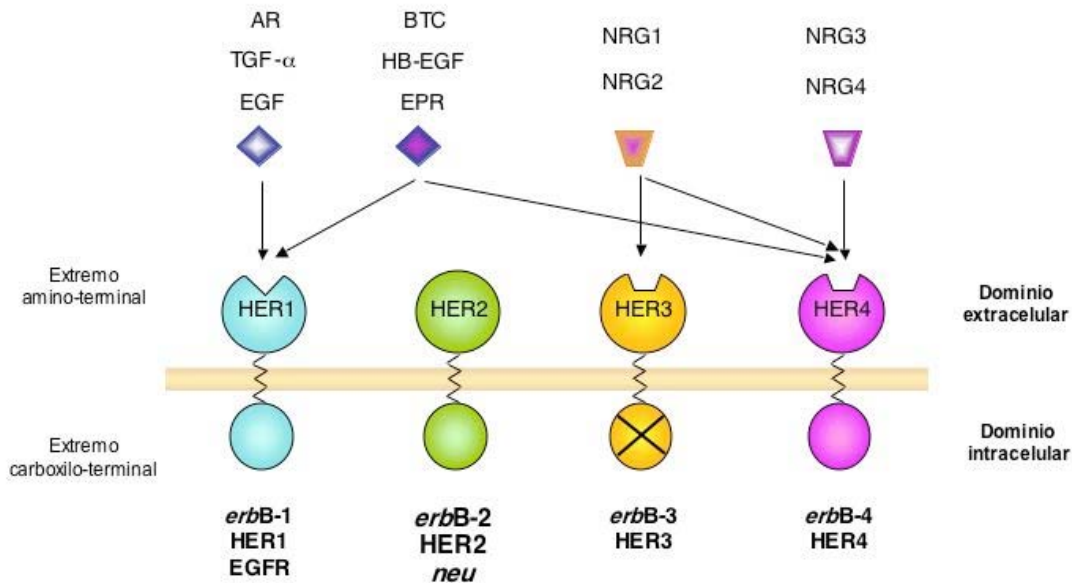
La familia de factores de crecimiento similares al EGF son los ligandos de la familia de receptores HER. Todos ellos son sintetizados como precursores transmembrana y sus ectodominios pueden ser procesados mediante un corte proteolítico llevado a cabo por proteasas de la familia ADAM (zinc-dependent and disintegrin-like and metalloproteinase containing proteins). Este corte resulta en la liberación del factor de crecimiento soluble. Bajo condiciones fisiológicamente normales la activación de los receptores HER se controla tanto mediante la expresión espacial y temporal de sus ligandos (revisado en (Riese and Stern 1998; Yarden and Sliwkowski 2001)) como por la disponibilidad del ligando soluble regulada por proteólisis (Arribas and Borroto 2002).

El dominio EGF presente en todos los ligandos de la familia se caracteriza por un determinado espaciamiento entre seis cisteínas a lo largo de una región de 35-40 aminoácidos. Lo que resulta en tres giros intramoleculares unidos por puentes disulfuro, críticos para el mantenimiento de la estructura del dominio (Davis 1990).

La especificidad de los ligandos nos permite dividirlos en tres grupos: el primero incluye el EGF, el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF  $\alpha$ ) y la amfiregulina (AR), los cuales



se unen a HER1; el segundo incluye la betacelulina (BTC), el factor de crecimiento de unión a la heparina (HB-EGF) y la epiregulina (EPR), los cuales muestran una especificidad dual, uniendo tanto HER1 como HER4. El tercer grupo se compone de las neuregulinas (NRGs) (también llamadas heregulinas, HRG) que forman dos subgrupos; las que unen HER3 y HER4 (NRG1 y NRG2) y las que se unen a HER4 (NRG3 y NRG4) (Figura 1). Ninguno de los ligandos se une a HER2 con alta afinidad.



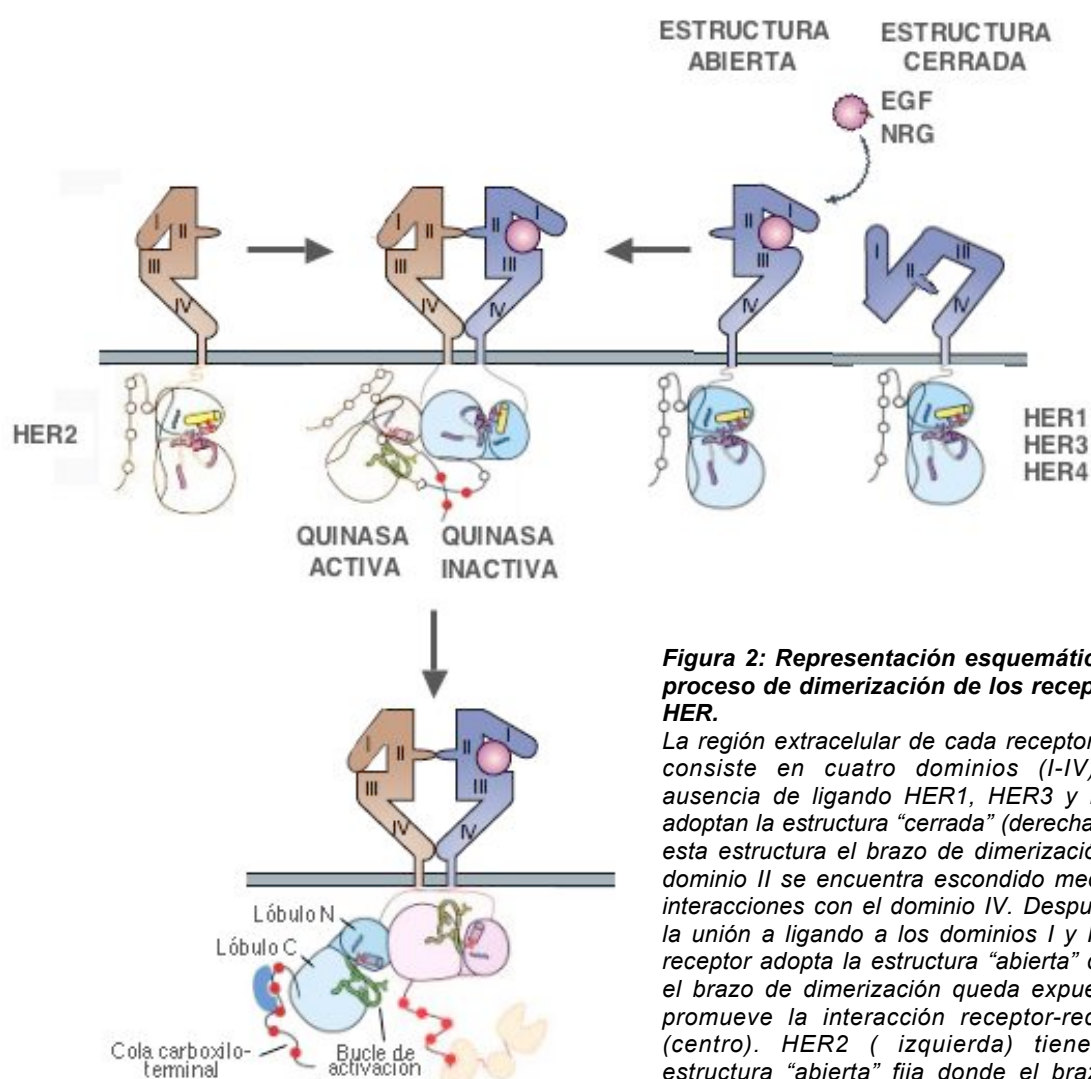
**Figura 1: Miembros de la familia HER y especificidad de sus ligandos.**

Los receptores de la familia HER tienen un dominio extracelular en el que se encuentra el dominio de unión a ligando, un dominio transmembrana y un dominio intracelular que contiene el dominio quinasa. HER2 no se une a ningún ligando con alta afinidad y HER3 no tiene actividad quinasa (indicado con una cruz en el dominio intracelular).

## DIMERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES HER.

La unión del ligando induce la dimerización entre dos receptores idénticos (homodímeros) o dos receptores diferentes de la misma familia (heterodímeros). La publicación de la estructura tridimensional de los ectodominios de HER1, HER2 y HER3 (revisado en (Burgess, Cho et al. 2003) ha aclarado distintos aspectos del proceso de dimerización. La estructura de HER1 (Ferguson, Berger et al. 2003) o HER3 inactivos (no unidos a ligando) (Cho and Leahy 2002) se caracteriza por que los receptores asumen la llamada conformación “cerrada” en la cual el brazo de dimerización del dominio II está bloqueado por interacciones intramoleculares con el dominio IV (Figura 2). Cuando HER1 se une a EGF (Ogiso, Ishitani et al. 2002) o TGF $\alpha$  (Garrett, McKern et al. 2002) hay una reorganización sustancial de los dominios dando lugar a la conformación “abierta” donde los dominios I y III están accesibles para su unión al ligando (revisado en

(Burgess, Cho et al. 2003)). La estructura “abierta” también se caracteriza por la exposición del brazo de dimerización (presente en el dominio II del receptor). El brazo de dimerización de un receptor interacciona con el brazo de dimerización del otro receptor, promoviendo una interacción directa receptor-receptor. En este dímero formado por dos complejos 1:1 receptor-ligando, los dos ligandos están distantes uno del otro y solo interaccionan con el receptor, lo que indica que los ligandos no están involucrados en la dimerización (Garrett, McKern et al. 2002; Ogiso, Ishitani et al. 2002) (Figura 2).



**Figura 2: Representación esquemática del proceso de dimerización de los receptores HER.**

La región extracelular de cada receptor HER consiste en cuatro dominios (I-IV). En ausencia de ligando HER1, HER3 y HER4 adoptan la estructura “cerrada” (derecha). En esta estructura el brazo de dimerización del dominio II se encuentra escondido mediante interacciones con el dominio IV. Después de la unión a ligando a los dominios I y III, el receptor adopta la estructura “abierta” donde el brazo de dimerización queda expuesto y promueve la interacción receptor-receptor (centro). HER2 (izquierda) tiene una estructura “abierta” fija donde el brazo de dimerización del dominio II está permanente expuesto y el dominio I y III interaccionan haciendo imposible su unión a ligando.

La dimerización de los receptores HER da lugar a la formación de un dímero asimétrico entre los dominios quinasa de los receptores. En este dímero el lóbulo C de un receptor interacciona con el lóbulo N del segundo receptor, activando su dominio quinasa. Esto provoca la fosforilación en los residuos tirosina presentes en la cola carboxilo-terminal del receptor (representado como esferas rojas) que servirán como sitios de anclaje para diferentes proteínas.

La estructura de la región extracelular de HER2 es diferente a la de los otros receptores. HER2 tiene una conformación abierta fija que mimetiza la estructura “abierta” de los

receptores HER1, 3 y 4 unidos a ligando. Los dominios II y IV de HER2 no interactúan quedando permanentemente expuesto el brazo de dimerización del dominio II (Cho, Mason et al. 2003; Garrett, McKern et al. 2003). La orientación del dominio II de HER2 es un poco diferente al de los otros receptores HER. La parte carboxilo-terminal del dominio II de HER2 presente en la interfaz de dimerización del receptor es más protuberante que en los otros receptores HER. En un homodímero HER2, estas zonas protuberantes chocarían entre ellas impidiendo la interacción entre los brazos de dimerización de los dos receptores. Como consecuencia se romperían las interacciones necesarias para la dimerización, explicando porqué HER2 no suele homodimerizar (Franklin, Carey et al. 2004). Esto no ocurre cuando HER2 dimeriza con otro miembro de la familia, lo que explica la facilidad de HER2 para formar heterodímeros, ya que HER2 está permanentemente posicionado para interactuar con otros receptores de la familia unidos a ligando. También se ha visto que entre los dominios de unión a ligando I y III de HER2 se establece una interacción que los hace inaccesibles al ligando. Esto explica porqué no se han encontrado ligandos de HER2 (Klapper, Glathe et al. 1999) (Figura 2).

Además de estas, otras interacciones adicionales receptor-receptor donde intervienen regiones tanto extracelulares como intracelulares contribuyen a la estabilización del dímero (Qian, O'Rourke et al. 1999; Ferguson, Darling et al. 2000; Penuel, Akita et al. 2002).

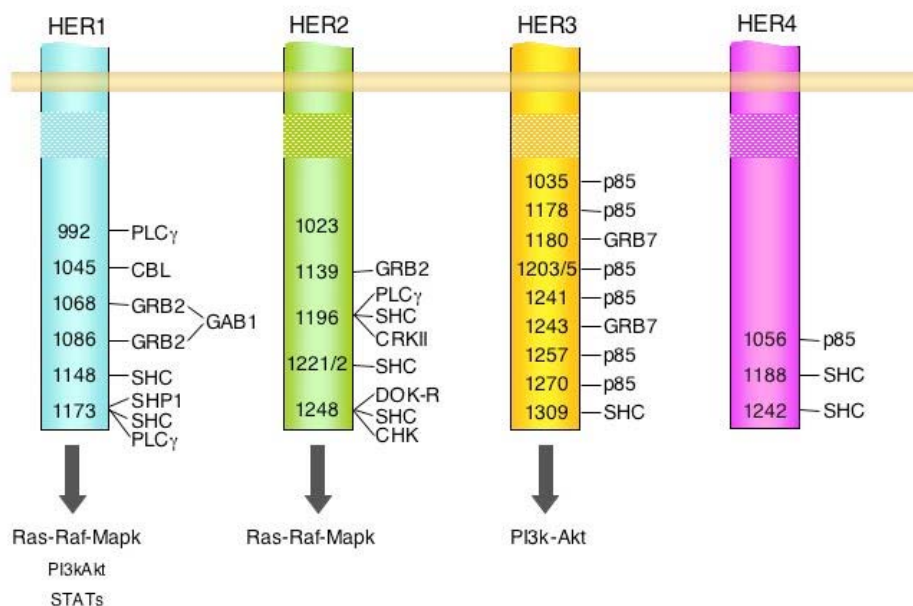
Como consecuencia de la dimerización de los receptores de la familia HER los dominios quinasa de tirosina de los dos receptores forman un dímero asimétrico. En este dímero el lóbulo C del dominio quinasa de un receptor entra en contacto con el lóbulo N del dominio quinasa del segundo receptor presente en el dímero (Zhang, Gureasko et al. 2006). Esta interacción activa alostericamente el dominio quinasa del segundo receptor mediante un cambio conformacional que afecta al bucle de activación presente en el lóbulo C (Figura 2). Este mecanismo explica porque HER3, que tiene sustituciones en residuos esenciales del lóbulo N, no puede ser activado, pero puede activar a otro receptor de la familia HER presente en un heterodímero (Zhang, Gureasko et al. 2006).

Finalmente, la cola carboxilo-terminal del receptor, que se encontraba interactuando con el dominio quinasa en una conformación autoinhibitoria, se libera y se fosforila en residuos tirosina específicos (Landau, Fleishman et al. 2004) (Figura 2).

### **VÍA CANÓNICA DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR**

Los residuos tirosina fosforilados sirven como sitios de anclaje para numerosas proteínas adaptadoras, que inician vías de transducción de señal intracelulares (revisado en (Olayioye, Neve et al. 2000; Yarden and Sliwkowski 2001; Schlessinger 2004)). Estas

proteínas efectoras se unen mediante sus dominios de homología a Src-2 (SH2) o de unión a fosfotirosinas (PTB) (Yaffe 2002), mientras que la especificidad del reclutamiento está determinada por los aminoácidos que rodean los sitios de autofosforilación del receptor (Figura 3).



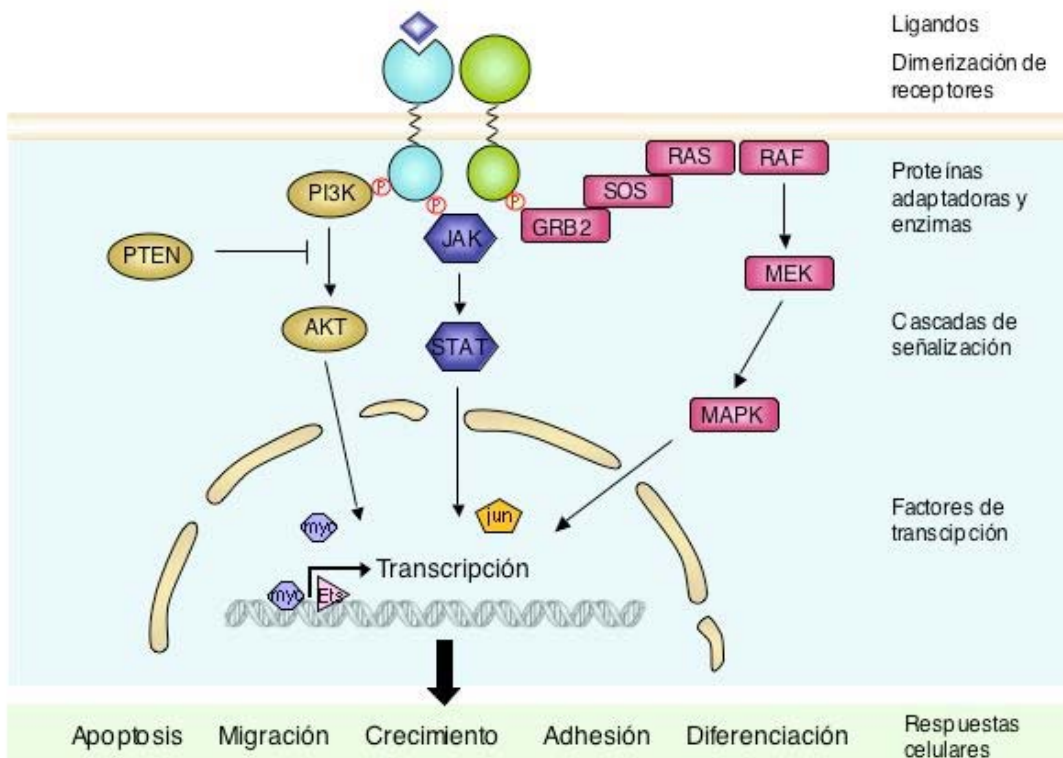
**Figura 3: Residuos tirosina específicos de cada receptor HER.**

Representación esquemática de los principales sitios de autofosforilación de HER1, HER2, HER3 y HER4 y de las proteínas que se asocian a estas tirosinas fosforiladas. Revisado en (Olayioye, Neve et al. 2000; Hynes and Lane 2005). Para simplificar solo se han representado el dominio transmembrana y citoplasmático de los receptores HER. El dominio quinasa de tirosinas está representado por una caja punteada. Abajo se indican que vías de señalización son activadas preferencialmente por cada receptor.

La regulación de las señales intracelulares activadas por la familia HER es muy compleja y participan diversos factores como la identidad del ligando, los receptores presentes en la célula, la disponibilidad de moléculas intracelulares o los efectores negativos que apagan la señal. Una función importante de los ligandos es controlar la formación definida de dímeros HER mediante la unión selectiva a su receptor específico, que luego puede formar a su vez homo o heterodímeros. Los receptores presentes en el dímero determinarán que tirosinas se fosforilarán y por lo tanto que tipo de moléculas señalizadoras van a participar (Olayioye, Graus-Porta et al. 1998; Sweeney, Lai et al. 2000)

Las principales vías de transducción de señal activadas por los receptores HER son la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), la vía del fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI3K)-Akt (revisado en (Olayioye, Neve et al. 2000; Yarden and Sliwkowski 2001; Schlessinger 2004) y el transductor de señal y activador de proteínas de transcripción

(STATs, revisado en (Yu and Jove 2004)) ( Figura 3 y 4). A pesar de la gran redundancia en las moléculas adaptadoras que son reclutadas hacia los diferentes receptores HER activos, cada receptor activa preferencialmente ciertas vías de transducción de señal.



**Figura 4: Transducción de señal por la familia HER.**

La señalización por la familia HER es muy compleja y consta de diferentes etapas. Los ligandos se unen a los receptores promoviendo su dimerización. Para simplificar, se muestra un solo dímero unido a su ligando representativo de las múltiples combinaciones posibles. Tras la dimerización se fosforilan los residuos de tirosina de los receptores que reclutan diferentes proteínas adaptadoras que activan cascadas de señalización, segundos mensajeros y factores de transcripción (solo se han representado algunos de los componentes de las principales vías de señalización). Esto resulta en una gran variedad de respuestas celulares incluyendo apoptosis, migración, crecimiento, adhesión o diferenciación.

Por ejemplo, HER1 y HER2 activan preferencialmente la vía de la MAPK (Dankort, Jeyabalan et al. 2001; Jorissen, Walker et al. 2003; Marone, Hess et al. 2004) (aunque HER1 también puede activar las vías de la PI3K-Akt y STAT en determinadas circunstancias (Lynch, Bell et al. 2004)) y HER3 activa muy eficientemente la vía PI3K-Akt (revisado en (Olayioye, Neve et al. 2000) (Figura 3).

Las diferentes vías de señalización transportan la señal al núcleo lo que resulta en cambios en la actividad de determinados factores de transcripción que, a su vez, inician diferentes programas transcripcionales. Se han descrito numerosos factores de transcripción regulados por la familia HER: c-jun (Quantin and Breathnach 1988), c-fos, c-myc (Cutry, Kinniburgh et al. 1989; Neve, Sutterluty et al. 2000), NF- $\kappa$ B (Biswas, Cruz et

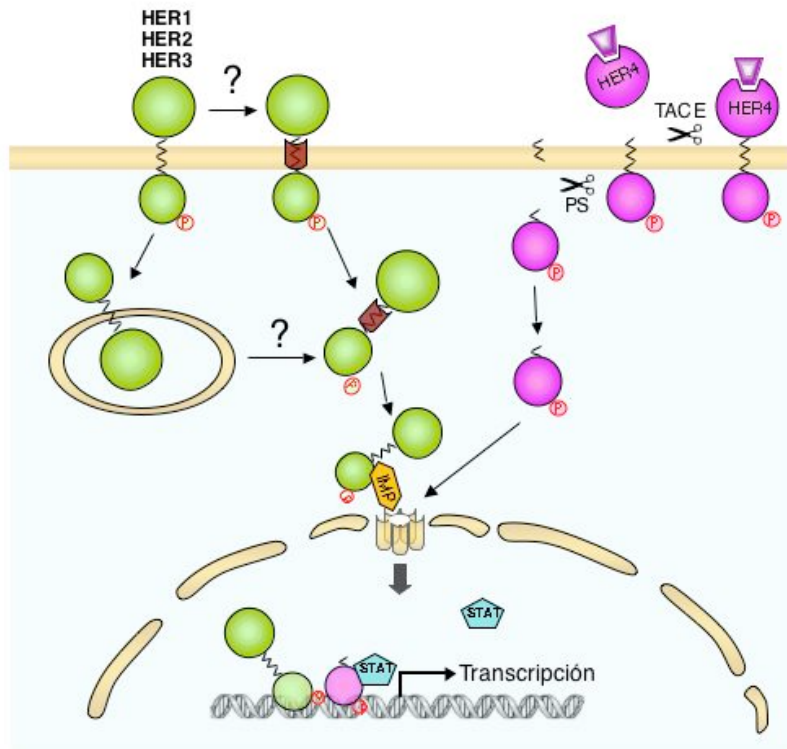
al. 2000; Zhou, Hu et al. 2000), Sp1 (Alroy, Soussan et al. 1999), la familia Ets (O'Hagan and Hassell 1998) y los factores de transcripción Forkhead (Jackson, Kreisberg et al. 2000). Gracias a estos programas transcripcionales, la red de señalización de la familia HER controla una gran variedad de funciones biológicas incluyendo proliferación, diferenciación, supervivencia, adhesión y migración (Holbro, Civenni et al. 2003) (Figura 4).

### **OTRAS VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL: LOS RECEPTORES HER EN EL NÚCLEO**

A pesar de que la vía más conocida de transducción de señal sitúa a los receptores HER en la membrana plasmática y en la vía secretora, varios artículos recientes indican que receptores o fragmentos de receptores HER viajan directamente desde la membrana plasmática hacia el núcleo pudiendo constituir un nuevo modo de señalización.

Se ha observado localización nuclear en HER1 (Lin, Makino et al. 2001; Marti, Ruchti et al. 2001), HER2 (Wang, Lien et al. 2004), HER3 (Offterdinger, Schofer et al. 2002) y la cola citoplasmática de HER4 (Ni, Murphy et al. 2001) tanto en líneas celulares establecidas como en distintos tumores primarios de incluyendo los de cáncer de mama (Rakowicz-Szulczynska, Otwiaska et al. 1989; Kamio, Shigematsu et al. 1990; Holt, Alexander et al. 1994; Lipponen and Eskelinen 1994; Tervahauta, Syrjanen et al. 1994; Xie and Hung 1994; Srinivasan, Gillett et al. 2000; Lin, Makino et al. 2001; Marti, Ruchti et al. 2001; Offterdinger, Schofer et al. 2002; Wang, Lien et al. 2004; Lo, Hsu et al. 2005; Lo, Xia et al. 2005; Psyri, Yu et al. 2005). Pero también encontramos localización nuclear de estos receptores en un amplio abanico de tejidos no tumorales bajo condiciones fisiológicas muy diversas (Cao, Lei et al. 1995; Srinivasan, Poulsom et al. 1998; Srinivasan, Benton et al. 1999; Marti, Ruchti et al. 2001; Offterdinger, Schofer et al. 2002; Zhang, Ding et al. 2002). Entre ellos, se ha podido detectar HER1 en el núcleo de tejidos con una alta tasa de división como hepatocitos en proceso de regeneración (Marti, Burwen et al. 1991) o embriones de ratón de 10 días de edad (Lin, Makino et al. 2001). En el lado opuesto, se ha encontrado HER3 en el nucleolo de células polarizadas y por lo tanto diferenciadas (Offterdinger, Schofer et al. 2002). A pesar de esto, es importante destacar que la tinción nuclear detectada en estos casos no es uniforme y además es muy variable entre diferentes muestras y diferentes estudios por lo que todavía no está muy claro en que circunstancias se pueden detectar receptores HER en el núcleo celular.

## MECANISMO DE TRANSPORTE DE LOS RECEPTORES HER AL NÚCLEO



**Figura 5: Mecanismos de transporte de los receptores HER al núcleo propuestos.**

Los receptores HER1, HER2 y HER3 se han encontrado en su forma entera en el núcleo de diversas líneas celulares y tejidos. Parece que la internalización del receptor es importante para su posterior tráfico al núcleo. Se ha postulado que pueda existir un mecanismo común a todos ellos que permita la extracción del receptor de la membrana plasmática a través de un mecanismo desconocido (izquierda).

HER4 sufre un proceso secuencial de corte proteolítico que libera su dominio intracelular soluble al citoplasma (derecha). Una vez cerca de la membrana nuclear la NLS de los receptores podría interactuar con importinas que mediarían su entrada al núcleo a través del poro nuclear.

Una vez en el núcleo, se ha demostrado que HER1 y HER2 se pueden unir a secuencias específicas de DNA y activar la transcripción de genes diana. También se ha visto que HER1 y HER4 pueden unirse a factores de transcripción para co-regular la transcripción génica. PS: presenilina; IMP: importina; ?: mecanismo desconocido responsable de la extracción de los receptores HER de la membrana.

Hasta la fecha, se sabe muy poco de que factores controlan la entrada o salida de los receptores HER del núcleo aunque se ha demostrado que el importe nuclear del HER1 puede ser iniciado por irradiación, heat shock, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cisplatino (Cao, Lei et al. 1995; Lin, Makino et al. 2001; Dittmann, Mayer et al. 2005) o estimulación por ligando (Jans and Hassan 1998; Lin, Makino et al. 2001). A su vez, se ha visto que HER2 requiere su actividad quinasa para entrar en el núcleo (Wang, Lien et al. 2004; Giri, Ali-Seyed et al. 2005) ya que inhibidores de la quinasa de tirosinas de HER2 (Levitzki and Gazit 1995) o mutaciones que bloquean la actividad quinasa de HER2 impiden su localización nuclear. En conjunto, estos datos sugieren que es necesaria la activación de HER1 y HER2 para

su translocación al núcleo. Consistentemente con esta hipótesis HER1 y HER2 nucleares parecen estar en su forma fosforilada en tirosinas (Xie and Hung 1994; Cao, Lei et al. 1995; Lin, Makino et al. 2001; Cordero, Cozzolino et al. 2002; Dittmann, Mayer et al. 2005; Lo, Hsu et al. 2005; Lo, Xia et al. 2005). En cambio, contrariamente a lo que ocurre con HER1, la adición de HRG<sup>®1</sup> induce la translocación de HER3 desde el nucleolo al nucleoplasma y después al citoplasma (Offterdinger, Schofer et al. 2002) (Figura 5).

HER1, HER2 y HER3 están en el núcleo en sus formas enteras y de manera no unida a membrana (Holt, Alexander et al. 1994; Lin, Makino et al. 2001; Wang, Lien et al. 2004; Giri, Ali-Seyed et al. 2005), lo cual es difícil de comprender dada la naturaleza transmembrana de estos receptores. Se especula que pueda existir un mecanismo común a todos ellos, que permita la extracción de estos receptores transmembrana de la bicapa lipídica antes de su paso por el poro nuclear. No obstante este mecanismo aún se desconoce, lo que ha generado un amplio debate alrededor de la presencia de estos receptores enteros en el núcleo (Figura 5). En cambio, el caso de HER4 es muy diferente, ya que como explicaré más adelante, sufre un corte proteolítico secuencial que resulta en la liberación del dominio citoplasmático de HER4 al citosol, que posteriormente es transportado al núcleo (Ni, Murphy et al. 2001) (Figura 5).

A pesar de la controversia, en el caso de los receptores enteros se cree que la internalización del receptor de manera dependiente o independiente de ligando puede servir como un paso inicial para su tránsito desde la superficie celular hasta el núcleo (Bryant and Stow 2005). De hecho, bloqueando la internalización y endocitosis de la célula, se previenen el importe nuclear de HER1 y HER2 (Bryant and Stow 2005; Giri, Ali-Seyed et al. 2005). Una vez los receptores se encuentran cerca del núcleo, las señales de localización nuclear en la región juxtamembrana de HER1, HER2 y HER4 y en la cola carboxilo-terminal de HER3 (Offterdinger, Schofer et al. 2002; Wang, Lien et al. 2004; Williams, Allison et al. 2004; Chen, Chen et al. 2005; Lo, Hsu et al. 2005), podrían ser importantes para la interacción del receptor con las importinas <sup>®/®</sup>, que mediarían la entrada del receptor al núcleo a través del poro nuclear (Reilly and Maher 2001; Dittmann, Mayer et al. 2005; Giri, Ali-Seyed et al. 2005; Lo, Xia et al. 2005) (Figura 5). De hecho, la delección de la señal de localización nuclear de HER2 impide su unión a la importina <sup>®1</sup> y su entrada al núcleo. Por otro lado, se conoce muy poco del proceso de exporte nuclear de estos receptores, aunque la observación de que tratamientos con leptomicina B inducen la acumulación nuclear de los cuatro receptores nos sugiere que el exporte nuclear puede involucrar la exportina CRM1 (Ni, Murphy et al. 2001; Offterdinger, Schofer et al. 2002; Dittmann, Mayer et al. 2005; Giri, Ali-Seyed et al. 2005; Lo, Hsu et al. 2005). A pesar de esto no se han encontrado secuencias de exporte nuclear en estos receptores.



## **FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES HER EN EL NÚCLEO**

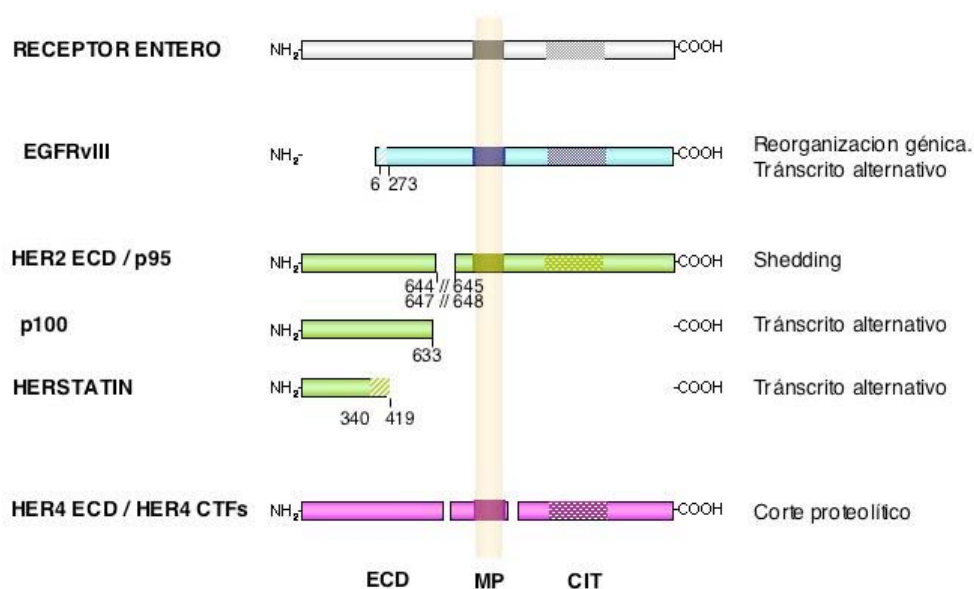
Mediante experimentos realizados tanto en levaduras como en mamíferos donde se utilizaban sistemas transcripcionales reportero con GAL4, se mostró hace más de una década que el dominio citoplasmático del homólogo de HER2 en rata tenía actividad transactivadora (Xie and Hung 1994). Más recientemente, usando la misma técnica se han encontrado dominios transactivadores activos dentro de HER1, HER2 y HER4 (Xie and Hung 1994; Lin, Makino et al. 2001; Ni, Murphy et al. 2001; Wang, Lien et al. 2004). Es importante tener en cuenta que mientras las colas carboxilo-terminales de HER1, HER2 y HER4 (sobre unos 200 residuos) dan positivo en este ensayo, los dominios citoplasmáticos enteros (unos 600 residuos) que contienen la cola carboxilo-terminal, no tienen efecto. Esta paradoja sugiere que el dominio quinasa de tirosinas regularía negativamente la transcripción mediante algún mecanismo desconocido (Lin, Makino et al. 2001) o puede indicar que los receptores sufren procesamientos adicionales aunque no hay evidencias de que estas colas carboxilo-terminales libres se encuentren en el núcleo.

Se ha demostrado que HER1 y HER2 nucleares se asocian con secuencias de DNA específicas ricas en AT (que se han denominado ATRS) y secuencias asociadas a HER2 (HAS), respectivamente (Lin, Makino et al. 2001; Wang, Lien et al. 2004). Hasta la fecha, los promotores propuestos como dianas del HER1 nuclear son la ciclina D1, iNOS y B-Myb (Lin, Makino et al. 2001; Lo, Hsu et al. 2005; Hanada, Lo et al. 2006). HER2 nuclear, por su parte, se une a los promotores de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), PRPK, MMP-16 y DDX-10 (Wang, Lien et al. 2004; Williams, Allison et al. 2004), mientras que HER4 se une al promotor de la  $\kappa$ -caseína (Williams, Allison et al. 2004). Dado que los receptores HER no tienen un dominio putativo de unión a DNA, se sospecha que estos receptores se unen primero a factores de unión a DNA y después aumentan la transcripción del gen diana mediante su actividad transactivadora. Consistentemente se ha encontrado que el HER1 nuclear interacciona por un lado con STAT3 y co-regula la expresión de iNOS (Lo, Hsu et al. 2005), pero también puede formar un complejo con la proteína E2F1 y activar la expresión de B-myb, un regulador positivo de la progresión celular del ciclo G1/S (Hanada, Lo et al. 2006). De la misma manera, HER4 nuclear forma un complejo con STAT5a y coactiva el promotor del gen de la  $\kappa$ -caseína (Williams, Allison et al. 2004). A pesar de que las dianas transcripcionales identificadas hasta el momento de los receptores HER nucleares están muy relacionadas con tumorigénesis, proliferación tumoral y progresión (Lin, Makino et al. 2001; Wang, Lien et al. 2004; Lo, Hsu et al. 2005;

Hanada, Lo et al. 2006) aún no se ha establecido el significado biológico y la relevancia de la presencia de los receptores HER en el núcleo. Así pues, estos datos sugieren un papel de los receptores HER nucleares en el control de la expresión génica aunque no se descarta que estos receptores nucleares puedan tener otras funciones (revisado en (Wells and Marti 2002).

## FORMAS TRUNCADAS DE LOS RECEPTORES HER

A parte de la forma entera, se han encontrado formas truncadas de los receptores HER en diferentes líneas celulares, tejidos y tumores. Estas formas truncadas tienen características funcionales propias y se pueden generar mediante diferentes mecanismos que se discuten a continuación.



**Figura 6: Receptores HER truncados.**

Esquema mostrando las diferentes formas truncadas que podemos encontrar en los receptores HER y los mecanismos por el que se generan. El dominio transmembrana se representa mediante una caja oscura y el dominio quinasa de tirosinas mediante una caja punteada. NH<sub>2</sub>: extremo amino-terminal de la proteína; COOH: extremo carboxilo-terminal de la proteína; ECD: medio extracelular; MP: membrana plasmática; CIT: citoplasma.

### HER1:

Se ha demostrado que en gliomas HER1 puede sufrir una reorganización génica que da lugar a la variante EGFRvIII, la cual contiene una deleción que mantiene la pauta de lectura (Figura 6). Esta deleción elimina los aminoácidos 6 a 273, correspondientes a los exones 2-7 que codifican para el dominio extracelular del receptor (Humphrey, Wong et al. 1990; Sugawa, Ekstrand et al. 1990; Wong, Ruppert et al. 1992). La forma truncada

resultante carece del brazo de dimerización del dominio II, por lo que no puede asumir la estructura cerrada, y por tanto da lugar a una proteína constitutivamente activa (Batra, Castelino-Prabhu et al. 1995). De hecho, la expresión de EGFRvIII aumenta la proliferación, disminuye la apoptosis (Nagane, Coufal et al. 1996) y promueve la transformación celular (Connolly, Toutenhoofd et al. 1994; Huang, Nagane et al. 1997; Moscatello, Holgado-Madruga et al. 1998).

#### HER2:

Numerosos estudios, entre ellos uno desarrollado en nuestro laboratorio, han demostrado que el dominio extracelular de HER2 puede ser liberado mediante un corte proteolítico tipo  $\alpha$ -secretasa (o shedding de ectodominios) en diferentes líneas celulares de cáncer de mama y ovario (Warri, Isola et al. 1996; Christianson, Doherty et al. 1998; Codony-Servat, Albanell et al. 1999; Molina, Codony-Servat et al. 2001) (Figura 6). Este corte está localizado en la región juxtamembrana del dominio extracelular de HER2, mayoritariamente entre los aminoácidos 647 y 648, aunque se ha descrito otro lugar de corte minoritario entre los aminoácidos 644 y 645 (Yuan, Lasut et al. 2003). Recientemente, se ha propuesto que la metaloproteasa de transmembrana MT2-MMP es la responsable del shedding de HER2 (Carey, Dugger et al. 2005). Sin embargo, otro grupo ha propuesto que otras metaloproteasas de transmembrana, ADAM10 y ADAM15, también pueden contribuir al shedding de HER2 (Liu, Liu et al. 2006; Liu, Fridman et al. 2006). A diferencia de otros procesos de shedding, el de HER2 es muy lento y poco eficaz, e incluso en presencia de activadores inespecíficos de metaloproteasas, como el APMA (un compuesto mercuriado), afecta como máximo al 15% del HER2.

Como resultado del shedding de HER2 también se genera un fragmento de HER2 anclado a membrana, que comprende la región transmembrana y el dominio citoplasmático. Este fragmento se denomina p95 (ya que su peso es de 95KDa aproximadamente) (Christianson, Doherty et al. 1998; Codony-Servat, Albanell et al. 1999), está fosforilado y tiene actividad quinasa constitutiva (Christianson, Doherty et al. 1998; Molina, Codony-Servat et al. 2001), sugiriendo que el dominio extracelular de HER2 puede suprimir la actividad quinasa de HER2 cuando esta presente en el receptor intacto. Recientemente se ha propuesto que cuando se estimulan las células con heregulina, p95 se fosforila y heterodimeriza con HER3 (Xia, Liu et al. 2004).

Además de mediante shedding, el dominio extracelular de HER2 puede generarse a través de "splicing alternativo". Inicialmente se describió una variante de mRNA de 2.3 Kpb que genera un fragmento de 100 KDa que se denominó p100 (Figura 6). Este mRNA contiene la secuencia codificante para los primeros 633 aminoácidos de HER2 que comprenden casi todo el dominio extracelular de HER2 (subdominios I-IV) (Scott, Robles et al. 1993). Este transcrito alternativo se ha encontrado sobretodo en las células MKN7 (

línea de cáncer gástrico), pero también se ha detectado en las líneas celulares de cáncer de mama y ovario (Scott, Robles et al. 1993).

Más recientemente se ha descrito Herstatin, otra proteína soluble truncada de HER2 de 68 KDa que se secreta al medio. Esta forma se sintetiza a partir de un transcrito de 2.6 Kpb (Figura 6). Esta proteína contiene los primeros 340 aminoácidos de HER2 ( subdominios I y II del dominio extracelular de HER2) fusionados a un único fragmento de 79 aminoácidos que es codificado por el intrón 8 (Doherty, Bond et al. 1999). Herstatin se expresa en riñón fetal humano y hígado. También encontramos un nivel bajo de expresión de Herstatin en una línea celular de riñón, y en las líneas de cáncer de mama y ovario con amplificación de HER2 (Doherty, Bond et al. 1999).

Las dos variantes de splicing que dan lugar al dominio extracelular de HER2 truncado son secretadas al medio donde se unen a HER2 y actúan como inhibidores específicos de los receptores HER (Maihle, Baron et al. 2002) mediante la interferencia en la dimerización entre receptores y el secuestro de los factores de crecimiento (Doherty, Bond et al. 1999; Azios, Romero et al. 2001; Lee, Akita et al. 2001; Shamieh, Evans et al. 2004); como resultado se inhibe la señalización mediada por ligandos y la proliferación celular (Scott, Robles et al. 1993; Azios, Romero et al. 2001; Justman and Clinton 2002; Jhabvala-Romero, Evans et al. 2003).

#### HER4:

HER4 sufre un proceso secuencial de corte proteolítico donde intervienen dos proteasas (Figuras 5 y 6). La primera actividad proteolítica es de tipo *shedding*, tiene lugar en la región juxtamembrana de HER4 y es llevada a cabo por TACE ( Tumor necrosis factor-Alpha Converting Enzyme), también llamada ADAM17, una metaloproteasa de transmembrana (Vecchi and Carpenter 1997; Rio, Buxbaum et al. 2000). El corte de HER4 por TACE es estimulado por 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetato (TPA) (Vecchi, Baulida et al. 1996) o heregulina (Zhou and Carpenter 2000), pero en ausencia de estos agentes también hay un nivel basal de corte proteolítico (Vecchi and Carpenter 1997).

Como resultado del shedding se libera el dominio extracelular de HER4 (de 120 KDa) al medio a la vez que se genera un fragmento de 80KDa asociado a membrana, que contiene los dominios transmembrana y citoplasmático del receptor (Vecchi, Baulida et al. 1996; Vecchi and Carpenter 1997). La función potencial del dominio extracelular no está clara, pero el fragmento de 80 KDa tiene actividad quinasa de tirosinas, al menos *in vitro* (Vecchi and Carpenter 1997). El fragmento de 80 KDa de HER4 es procesado por una segunda actividad proteolítica, denominada @secretasa, que típicamente corta proteínas integrales de membrana dentro del dominio transmembrana (Ni, Murphy et al. 2001; Lee, Jung et al. 2002). Esta actividad libera el dominio citoplasmático de HER4, que contiene una señal de localización nuclear (Williams, Allison et al. 2004). A continuación este

fragmento se transloca al núcleo donde puede regular la transcripción de la  $\beta$ -caseína y la actividad pro-apoptótica de HER4 (Ni, Murphy et al. 2001; Ni, Yuan et al. 2003; Vidal, Naresh et al. 2005).

## LOS RECEPTORES HER EN CÁNCER

En muchos tipos diferentes de cáncer, los receptores HER, y en particular HER1 y HER2, están constitutivamente activados como resultado de la producción autocrina de ligando, sobreexpresión del receptor, o mutación. A continuación discutiremos la relevancia de cada uno de los receptores en distintos tipos de cáncer.

Receptor	Activación	Cáncer	Referencia
<b>HER1</b>	EGFRvIII	Glioma	(Ekstrand, Sugawa et al. 1992)
		Mama, ovario	(Moscatello, Holgado-Madruga et al. 1995)
	Sobreexpresión	SCCHN	(Rubin Grandis, Melhem et al. 1996)
		Mama	(Klijn, Berns et al. 1992)
		Ovario	(Bartlett, Langdon et al. 1996)
Loop autocrino (TGF $\alpha$ )	SCCHN	Glioma	(Watanabe, Tachibana et al. 1996)
		NSCLC	(Rubin Grandis, Melhem et al. 1998)
	Pulmón, colon	Pulmón	(Rusch, Klimstra et al. 1997; Hsieh, Shepherd et al. 2000)
		Mama	(Salomon, Brandt et al. 1995)
Dominio quinasa mutado	Pulmón	Mama	(Umekita, Ohi et al. 2000)
			(Lynch, Bell et al. 2004; Paez, Janne et al. 2004; Pao, Miller et al. 2004)
<b>HER2</b>	Sobreexpresión	Mama	(Slamon, Clark et al. 1987; Ross and Fletcher 1998)
		Ovario	(Slamon, Godolphin et al. 1989)
		Estomago	(Lemoine, Jain et al. 1991)
		Vejiga	(Sauter, Moch et al. 1993)
		Salival	(Stenman, Sandros et al. 1991)
		Pulmón	(Tateishi, Ishida et al. 1991)
	Dominio citoplasmático truncado	Mama, ovario	(Christianson, Doherty et al. 1998; Molina, Saez et al. 2002; Saez, Molina et al. 2006)
Dominio extracelular truncado	Mama	(Leitzel, Teramoto et al. 1992; Pupa, Menard et al. 1993)	

**Tabla I: Expresión de los receptores HER en cáncer.**

### HER1:

Diferentes estudios han demostrado que la sobreexpresión de HER1 da lugar a la transformación celular en presencia de niveles apropiados de sus ligandos (ver por ejemplo, (Di Fiore, Pierce et al. 1987)). Además, la sobreexpresión de HER1 en el tejido mamario de ratones transgénicos lleva a la formación de tumores (Brandt, Eisenbrandt et al. 2000). Esto sumado a que HER1 se encuentra sobreexpresado en la mayoría de carcinomas, sugiere que HER1 tiene un papel importante en la tumorigénesis.

La frecuencia de sobreexpresión de HER1 en carcinomas humanos es generalmente alta, alcanzando el 100% de los casos en algunos tumores como los de cabeza y cuello (Tabla I). Consecuentemente con los estudios en células que demuestran que la sobreexpresión del receptor normal conduce a la transformación sólo en presencia del ligando (Di Fiore, Pierce et al. 1987), HER1 habitualmente se co-expresa con alguno de sus ligandos, lo que conduce a su activación constitutiva (revisado en (Salomon, Brandt et al. 1995; Rubin Grandis, Melhem et al. 1998; Hsieh, Shepherd et al. 2000)).

La mutación más frecuente de HER1 encontrada en cáncer es la que conduce a la generación de EGFRvIII que, como he comentado anteriormente, se caracteriza por una delección del dominio extracelular originada por una reorganización génica, dando lugar a la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa (Wikstrand, Reist et al. 1998). Esta mutación se encuentra en el 40% de los gliomas (Wong, Ruppert et al. 1992), aunque recientemente se ha visto que EGFRvIII también se expresa en otros carcinomas humanos (Ekstrand, Sugawa et al. 1992; Wong, Ruppert et al. 1992; Garcia de Palazzo, Adams et al. 1993; Moscatello, Holgado-Madruga et al. 1995) (Tabla I). La sobreexpresión de EGFRvIII parece ser muy importante para la progresión tumoral, ya que da lugar a la transformación de manera independiente de la presencia de ligando (Nishikawa, Ji et al. 1994; Tang, Gong et al. 2000; Pedersen, Meltorn et al. 2001).

También se han detectado mutaciones puntuales o pequeñas deleciones en el dominio quinasa de HER1, aproximadamente en un 10% de NSCLC (Cáncer de pulmón de células no-pequeñas) (Lynch, Bell et al. 2004; Paez, Janne et al. 2004; Pao, Miller et al. 2004). Estas mutaciones son muy frecuentes en pacientes con un subtipo peculiar y poco común de cáncer de pulmón con características clínicas y patológicas definidas como ser no fumador o tener adenocarcinoma o carcinoma bronquioalveolar (Tabla I).

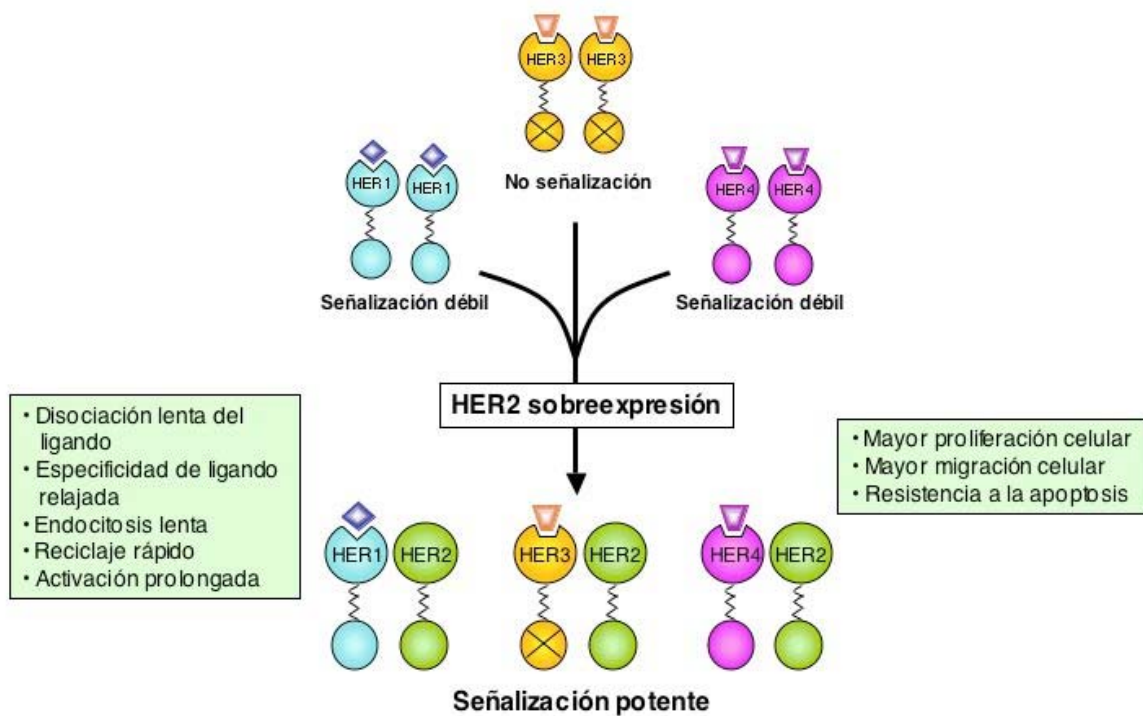
El posible significado pronóstico de la sobreexpresión o mutación de HER1 en pacientes con cáncer se ha analizado en muchos estudios. Generalmente, quizás debido a la falta de homogeneidad en las técnicas usadas para analizar los niveles de HER1 en los tumores, se han encontrado resultados discordantes en la correlación entre expresión de este receptor y la evolución del paciente. La mayor parte de estudios clínicos apoyan que HER1 correlaciona con peor pronóstico en cáncer de mama, pero hay algunos estudios que sólo han encontrado una tendencia o no han encontrado una relación significativa entre estos dos parámetros (Klijn, Berns et al. 1992). La misma situación de resultados contradictorios la encontramos en NSCLC y cáncer de colon, con algunos estudios que muestran correlación y otros que no (Rutherford, Veale et al. 1992; Rusch, Klimstra et al. 1997; Brabender, Danenberg et al. 2001; Volm, Koomagi et al. 2002; Khorana, Ryan et al. 2003; Kopp, Rothbauer et al. 2003; Resnick, Routhier et al. 2004).

En resumen, aunque los estudios preclínicos muestran una clara correlación entre la sobreactivación de HER1 y el desarrollo tumoral, no todos los estudios clínicos confirman esta hipótesis, quizá debido a la heterogeneidad de las técnicas usadas.

### HER2:

Como en el caso de HER1, los estudios preclínicos indican que la sobreactivación de HER2 conduce al desarrollo de tumores. Por ejemplo, la expresión de HER2 en el epitelio mamario de ratones transgénicos da lugar al desarrollo de tumores mamarios después de un largo tiempo de latencia (Guy, Webster et al. 1992).

La activación y señalización constitutiva de HER2 en la mayoría de tumores analizados hasta hoy se debe a su sobreexpresión, normalmente a consecuencia de su amplificación génica, por un mecanismo todavía desconocido. La sobreexpresión de HER2 conduce a la formación de heterodímeros que contienen HER2. A diferencia de los homodímeros de la familia HER que bien son inactivos (homodímeros HER3) o tienen bajo poder señalizador, los heterodímeros que contienen HER2 son más estables y su señalización es más potente y prolongada en el tiempo, potenciando sus repuestas biológicas como



**Figura 7: Características de los heterodímeros que contienen HER2.**

Cuando HER2 se sobreexpresa, preferencialmente se forman heterodímeros que contienen HER2. A diferencia de los homodímeros de la familia HER que o bien son inactivos (homodímeros HER3) o señalizan de manera muy débil, los heterodímeros que contienen HER2 tienen características que prolongan y aumentan su señalización (recuadro izquierdo) o sus respuestas celulares (recuadro derecho).

proliferación celular, migración y invasión (Tzahar, Waterman et al. 1996; Craven, Lightfoot et al. 2003) (Figura 7). Como resultado, la sobreexpresión de HER2 da lugar a la transformación de las células a un fenotipo maligno y acelera la tumorigénesis.

Un 30% de pacientes con tumores de mama sobreexpresan HER2 y dicha sobreexpresión correlaciona con un mal pronóstico ( mayor riesgo de recaída y muerte) (Slamon, Clark et al. 1987) (Tabla I). De hecho estos tumores suelen estar poco diferenciados, y el grado de sobreexpresión de HER2 se asocia con mayor tamaño del tumor, mayor grado, mayor porcentaje de células en fase S, aneuploidia y pérdida de los receptores de hormonas esteroides, lo que implica que HER2 confiere una fuerte ventaja proliferativa a las células tumorales (Ross and Fletcher 1998; Paik and Liu 2000). También se ha descrito la sobreexpresión de HER2 en otros carcinomas, incluyendo ovario, gástrico, vejiga entre otros (Slamon, Godolphin et al. 1989; Lemoine, Jain et al. 1991; Sauter, Moch et al. 1993; Yarden and Sliwkowski 2001), pero en estos casos raramente se encuentra amplificación génica, y suelen sobreexpresar HER2 en niveles más bajos por lo que no existe una correlación tan clara con un mal pronóstico.

En el análisis por western blot de biopsias de pacientes con cáncer de mama y ovario, a parte de la forma total de HER2, un porción significativa de los pacientes (aproximadamente un 25%) expresan una forma de menor peso molecular (aproximadamente de 95 KDa) que contiene el dominio citoplasmático de HER2 (Christianson, Doherty et al. 1998; Molina, Saez et al. 2002; Saez, Molina et al. 2006), a la que denominaremos CTFs (Fragmentos Carboxilo-Terminales) y cuya migración electroforética coincide parcialmente con la de p95. Además el ectodominio de HER2 soluble también se ha encontrado en el suero de pacientes con cáncer de mama avanzado (Leitzel, Teramoto et al. 1992; Pupa, Menard et al. 1993) (Tabla I). Aunque aún se desconoce cual es el mecanismo responsable de la producción de estos fragmentos truncados de HER2 en los tumores, la presencia tanto del dominio extracelular de HER2 como de los CTFs se ha relacionado a evoluciones clínicas desfavorables (Brandt-Rauf 1995; Christianson, Doherty et al. 1998; Baselga 2001; Lipton, Ali et al. 2002; Molina, Saez et al. 2002; Carney, Neumann et al. 2003; Hudelist, Kostler et al. 2004; Lipton, Leitzel et al. 2004). Por ejemplo, la presencia de los CTFs de HER2 en los tumores primarios de pacientes con cáncer de mama se asocia con metástasis en los ganglios linfáticos y peor pronóstico, sugiriendo un papel importante de los CTFs en la tumorigénesis (Molina, Saez et al. 2002; Saez, Molina et al. 2006).



**HER3:**

La frecuencia de sobreexpresión de HER3 en carcinomas humanos se ha revisado recientemente (Normanno, Bianco et al. 2003). A pesar de esto el posible significado pronóstico de HER3 no está claro y hay un amplio debate al respecto.

**HER4:**

El potencial oncogénico y el posible significado clínico de HER4 tampoco está muy claro. Hay artículos que muestran una alta expresión de HER4 en neoplasias, incluyendo las de tiroides (Haugen, Akslen et al. 1996), mama (Srinivasan, Gillett et al. 2000), ovario (Furger, Fiddes et al. 1998), endometrio (Srinivasan, Benton et al. 1999), cáncer oral de células escamosas (Bei, Pompa et al. 2001), meduloblastoma (Gilbertson, Perry et al. 1997), ependimoma (Gilbertson, Bentley et al. 2002) y osteosarcoma (Hughes, Thomas et al. 2004). Por otro lado, los niveles de HER4 son menores de lo normal en otros tumores, como algunos de próstata (Lyne, Melhem et al. 1997), riñón (Thomasson, Hedman et al. 2004) y páncreas (Graber, Friess et al. 1999).

En general, los niveles elevados de HER4 se asocian con un fenotipo diferenciado en células (Peles, Bacus et al. 1992; Sartor, Zhou et al. 2001; Chen, Chen et al. 2005) y en tumores de pacientes (Peles, Bacus et al. 1992; Bacus, Chin et al. 1996; Knowlden, Gee et al. 1998; Sartor, Zhou et al. 2001; Chen, Chen et al. 2005) y con un pronóstico favorable (Pawlowski, Revillion et al. 2000; Suo, Risberg et al. 2002; Witton, Reeves et al. 2003). Sin embargo, también se han encontrado resultados contradictorios sugiriendo un papel oncogénico de HER4 tanto de estudios biológicos con células (Cohen, Kiener et al. 1996; Tang, Concepcion et al. 1999; Alaoui-Jamali, Song et al. 2003) como clínicos (Bieche, Onody et al. 2003; Lodge, Anderson et al. 2003).

En resumen, hasta la fecha no se ha establecido una correlación clara entre niveles de HER4 y pronóstico clínico en estos pacientes.

**LOS RECEPTORES HER COMO DIANAS TERAPÉUTICAS**

Dada la clara correlación entre la sobreactivación de HER1 y HER2 y la progresión de diversos cánceres humanos, estos receptores HER fueron propuestos como dianas terapéuticas hace al menos una década (revisado en (Holbro and Hynes 2004)). En la actualidad hay dos tipos de tratamientos anti-HER que están dando resultados positivos: anticuerpos que se unen al dominio extracelular del receptor y pequeñas moléculas inhibitoras de la quinasa de tirosinas.

A continuación, me centraré en los compuestos clínicamente más relevantes en estos momentos: Herceptin, Iressa y Lapatinib (Figura 8).

### IRESSA:

Las mutaciones inactivantes en el dominio quinasa de HER1 bloquean su actividad biológica (Honegger, Szapary et al. 1987). Por tanto, parece lógico desarrollar inhibidores de la quinasa de tirosinas para el tratamiento del cáncer (Traxler 2003).



#### **HERCEPTIN:**

Anticuerpo humanizado dirigido al ectodominio de HER2.  
Disminuye los niveles de HER2 en la membrana plasmática.  
Previene el shedding de HER2 por metaloproteasas.  
Inhibe las vías de señalización reguladas por HER2.  
Induce la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.  
Es citostático: Causa arresto en G1 y disminuye la proliferación celular.  
Es anti-angiogénico: Reduce los niveles de factores angiogénicos como el VEGF.

**Aprobado para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastático en 1998. Una gran parte de las pacientes son o se vuelven resistentes al tratamiento.**

#### **GEFITINIB, LAPATINIB:**

Compuestos no-peptídicos de bajo peso molecular.  
Compite con el ATP por la unión al dominio quinasa de tirosinas, bloqueando la actividad quinasa del receptor.  
Inhibición de las vías de señalización reguladas por el receptor.  
Inhibición de la proliferación celular.

**Gefitinib fue aprobado para el tratamiento de NSCLC en Japón y USA en 2003.**

**Lapatinib está en ensayos clínicos fase III en pacientes con cáncer de mama.**

#### **Figura 8: Características de las drogas terapéuticas dirigidas a la familia HER.**

*Izquierda: estructura tridimensional de un homodímero HER2. En gris estructura tridimensional del anticuerpo Herceptin unido al ectodominio de HER2. En rojo esquema representando la molécula Lapatinib unida al dominio quinasa de HER2. A la derecha características principales de cada uno de los compuestos.*

Leivitzki y sus colaboradores hicieron algunos de los experimentos pioneros en el diseño de ciertos inhibidores de la quinasa de tirosinas denominados tirfostinas (Gazit, Yaish et al. 1989). La optimización de varias estructuras no peptídicas entre ellas las 4-anilinoquinazolonas dieron lugar a una prometedora lista de inhibidores que bloqueaban la actividad quinasa de HER1. Entre numerosos compuestos candidatos que se sintetizaron y caracterizaron, Iressa se identificó como una posible droga clínicamente efectiva (Ward, Cook et al. 1994; Barker, Gibson et al. 2001). Iressa® (también conocido como Gefitinib, ZD1839) se puede suministrar oralmente e inhibe selectivamente la quinasa de HER1 (Wakeling, Guy et al. 2002) mediante la competición con el ATP por su

sitio de unión, bloqueando así la señalización originada desde los propios receptores. Iressa inhibe la actividad de HER1 con una  $IC_{50}$  de 0.02  $\mu$ M y necesita una dosis al menos 200 veces superior para inhibir HER2 (3.7  $\mu$ M; (Wakeling, Barker et al. 1996)). Iressa inhibe la proliferación de líneas celulares que sobreexpresan HER1 de diversos orígenes entre ellos ovario, mama, colon, NSCLC y cáncer de cabeza y cuello. Además, se ha visto actividad antitumoral dosis-dependiente en ratones atímicos donde se han xenotransplantado estas líneas celulares (Ciardiello, Caputo et al. 2000). Otros procesos ligados a la progresión tumoral mediante los receptores HER como la angiogénesis, son también eficientemente bloqueados con el tratamiento con Iressa en células que sobreexpresan HER1 (Hirata, Ogawa et al. 2002).

Teniendo en cuenta estas evidencias preclínicas, en el 2003 se aprobó el uso de Iressa en Japón y Estados Unidos para el tratamiento de carcinoma de pulmón no microcítico (Cohen, Williams et al. 2003). Desafortunadamente, a pesar de la expectación inicial se ha comprobado que la terapia anti-HER1 sólo es efectiva en ciertos pacientes. Por el momento, no se puede predecir que pacientes responderán a Iressa por que no existe una correlación clara entre los niveles de expresión de HER1 y el grado de respuesta a la droga. A pesar de esto, estudios muy recientes han arrojado luz sobre este punto. Se ha descrito la correlación entre mutaciones somáticas en el dominio quinasa de HER1 y la respuesta clínica a dicho compuesto (Herbst, Fukuoka et al. 2004; Lynch, Bell et al. 2004; Paez, Janne et al. 2004; Pao, Miller et al. 2004). A pesar de esto hay que resaltar que algunos de los pacientes que responden no tienen estas mutaciones en el dominio quinasa. Por lo tanto, a pesar de que esta observación es muy interesante, el significado clínico del HER1 silvestre frente la versión mutada de HER1 para la respuesta a los inhibidores de la quinasa de tirosinas necesita mayor estudio y se discute en detalle en una revisión reciente (Herbst, Fukuoka et al. 2004). Por otro lado, estos resultados contradictorios con Iressa dejan entrever la importancia general de más estudios sobre las drogas dirigidas a la familia HER, con el objetivo principal de encontrar esos pacientes que se pueden beneficiar de una terapia determinada.

#### LAPATINIB:

Lapatinib (también llamado GW572016) (Rusnak, Lackey et al. 2001) es otro inhibidor de bajo peso molecular de la familia de las 4-anilinoquinazolonas. Lapatinib ha demostrado ser un inhibidor dual reversible potente y selectivo de las quinasas de HER1 y HER2 (Figura 8). Este compuesto inhibe el crecimiento tanto de células como de xenógrafos que sobreexpresan HER1 y/o HER2 y en la actualidad está siendo evaluado en diferentes ensayos clínicos.

### HERCEPTIN:

Ullrich y sus colaboradores (Hudziak, Lewis et al. 1989) aislaron por primera vez un anticuerpo dirigido contra el ectodominio de HER2 que bloquea su activación, el MAb 4D5. Su variante humanizada se conoce como Herceptin (Trastuzumab®) (Carter, Presta et al. 1992) (Figura 8). Gracias a la co-cristalización del dominio extracelular de HER2 unido a Herceptin, se ha determinado que esta interacción con HER2 se produce en la región juxtamembrana de HER2 (Cho, Mason et al. 2003).

El efecto antitumoral de Herceptin aún está en estudio y se cree que se debe a varios mecanismos independientes (Baselga, Albanell et al. 2001) (Figura 8). Por un lado produce un efecto citostático en células o xenógrafos que sobreexpresan HER2 mediante la downregulación del receptor que lleva a un arresto de las células en G1 y la inhibición de la proliferación celular. Y por otro lado tiene un efecto citotóxico que facilita la reacción inmune aumentando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo mediada por el receptor Fc $\gamma$ (ADCC).

Herceptin, se aprobó por la Food and Drug Administration (FDA) en 1998 para el tratamiento de cáncer metastático con sobreexpresión de HER2 ya sea por amplificación génica detectada por FISH o por sobreexpresión de la proteína detectada por IHQ (3+). Este subgrupo de pacientes se seleccionó en base a los resultados de ensayos preclínicos que demostraban que Herceptin tenía actividad antitumoral sólo en células de cáncer de mama con sobreexpresión HER2, pero no en aquellas células con bajos niveles del receptor (Hudziak, Lewis et al. 1989; Sliwkowski, Lofgren et al. 1999). Como era de esperar, Herceptin no produce ningún beneficio en pacientes de cáncer de mama HER2 negativos o con niveles normales de expresión del receptor. Esto sugiere que para el funcionamiento de Herceptin es crítico la densidad o cantidad de receptores HER2. De manera similar Herceptin no tienen efecto en otros tumores que no sean mamarios, a pesar de que estos expresen cantidades moderadamente elevadas de HER2.

Uno de los principales problemas del tratamiento con Herceptin es el alto índice de resistencia observado. Aproximadamente un 70% de los pacientes tratados con Herceptin, son o se vuelven resistentes a este fármaco. Aunque se están llevando a cabo numerosos estudios para determinar el mecanismo involucrado en la resistencia a este tratamiento, aún no se conoce la causa exacta que lo produce (revisado recientemente en (Nahta, Yu et al. 2006)). Estos datos sugieren que la sobreexpresión de HER2 no es el único parámetro a considerar antes de decidirse por esta aproximación terapéutica. Por lo que un mayor análisis de la actividad de HER2 en estos tumores podría aumentar la efectividad de la droga.

## **CONCLUSIONES**

Aunque los receptores HER parecen ser muy importantes para el desarrollo del cáncer y son dianas terapéuticas contra las que se han diseñado gran cantidad de drogas, aún hay muchos aspectos de su biología que no se entienden. Una continua búsqueda para profundizar en el mecanismo involucrado en la señalización fisiológica de los receptores HER, así como el papel de estos receptores durante la progresión tumoral, mejorará con toda probabilidad la eficacia de las drogas actualmente disponibles o todavía en desarrollo y finalmente podrá permitir a los clínicos escoger la mejor terapia para cada paciente.

*OBJETIVOS DEL TRABAJO*

---



Diversas líneas de evidencia muestran que los receptores quinasa de tirosinas HER tienen un papel importante en la progresión tumoral. Por ejemplo, la expresión de HER1 y HER2 está alterada en diversos tumores de origen epitelial, entre ellos el cáncer de mama. Consecuentemente, HER1 y HER2 están siendo exhaustivamente estudiados, tanto desde el punto de vista de la biología del cáncer como desde el punto de vista terapéutico. De hecho, en la actualidad, distintos fármacos dirigidos contra estos receptores están siendo usados en la clínica. Los objetivos de esta tesis se centran por un lado en estudiar los mecanismos de acción de estos fármacos, lo que ayudará a identificar el grupo de pacientes con más probabilidades de beneficiarse de estos tratamientos. Por otro lado, profundizaremos en algunos aspectos de la biología de estos receptores relevantes para su papel en la progresión tumoral.

Así pues, los objetivos concretos que planteamos en esta tesis son:

**1. Estudiar el mecanismo de acción de Iressa, un inhibidor de la quinasa de tirosinas de HER1:**

1.1. Estudiar el espectro de actividad de Iressa en un panel de líneas de cáncer de mama que expresan diferentes niveles de HER1 y HER2.

1.2. Caracterizar los efectos de Iressa sobre las vías de transducción de señales reguladas por la familia HER.

1.3. Analizar el efecto de Iressa sobre la dimerización de los receptores de la familia HER.

**2. Profundizar en la biología de los CTFs (fragmentos carboxilo-terminales de HER2):**

2.1. Caracterizar el mecanismo responsable de la generación de los CTFs.

2.2. Caracterizar bioquímicamente y estudiar la localización subcelular de dichos CTFs, tanto en líneas celulares como en tumores de pacientes con cáncer de mama.

2.3. Analizar el posible papel de los CTFs en la tumorigénesis.

2.4. Estudiar el efecto de la expresión de los CTFs sobre la actividad antitumoral de Herceptin y Lapatinib.





*RESULTADOS*

---



**Artículo 1.*****“Iressa, a Specific Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Tyrosine Kinase Inhibitor, Induces the Formation of Inactive EGFR/HER2 and EGFR/HER3 Heterodimers and Prevents Heregulin Signaling in HER2-overexpressing Breast Cancer Cells.”***

**Judit Anido**, Pablo Matar, Joan Albanell, Marta Guzman, Federico Rojo, Joaquín Arribas, Steve Averbuch and Josep Baselga.

*Clinical Cancer Research*. 2003 Apr; Vol.9, No.4, pp.1274-83.

Dos de los miembros de la familia HER, HER1 y HER2, se encuentran frecuentemente sobreexpresados y/o mutados en el cáncer de mama y se asocian con mal pronóstico. Iressa es un compuesto sintético de bajo peso molecular recientemente desarrollado para inhibir específicamente la quinasa de tirosinas de HER1.

Para explorar el espectro de actividad y caracterizar su potencial terapéutico, investigamos los efectos del Iressa sobre un panel de líneas celulares humanas de cáncer de mama, seleccionadas en base a sus niveles de expresión de HER1 y HER2. Como era predecible, nuestros hallazgos mostraron que Iressa inhibe el crecimiento de células con niveles elevados de expresión de HER1. Sin embargo, sorprendentemente, observamos que Iressa también inhibe el crecimiento de células, como las BT-474, que tienen bajos niveles de HER1 pero que sobreexpresan HER2. Además en esta línea celular, Iressa inhibe la activación de las vías de transducción de señal activadas por el EGF (un ligando que se une al EGFR) o la heregulina (un ligando que se une a HER3 y HER4 pero no a HER1 y HER2).

Los datos incluidos en este artículo muestran que Iressa bloquea esta activación mediante un mecanismo doble. Por un lado, Iressa inhibe directamente la quinasa de tirosinas de HER1; por otro, impide la formación de heterodímeros HER2/HER3 mediante el secuestro de los receptores HER2 y HER3 en heterodímeros inactivos HER1/HER2 y HER1/HER3.

Conjuntamente, estos hallazgos desvelan un nuevo mecanismo de acción de los inhibidores de la quinasa de HER1 y sugieren que Iressa podría tener utilidad terapéutica para el cáncer de mama no solo en pacientes que presentan niveles elevados de HER1 sino también en pacientes cuyos tumores sobreexpresen HER2.



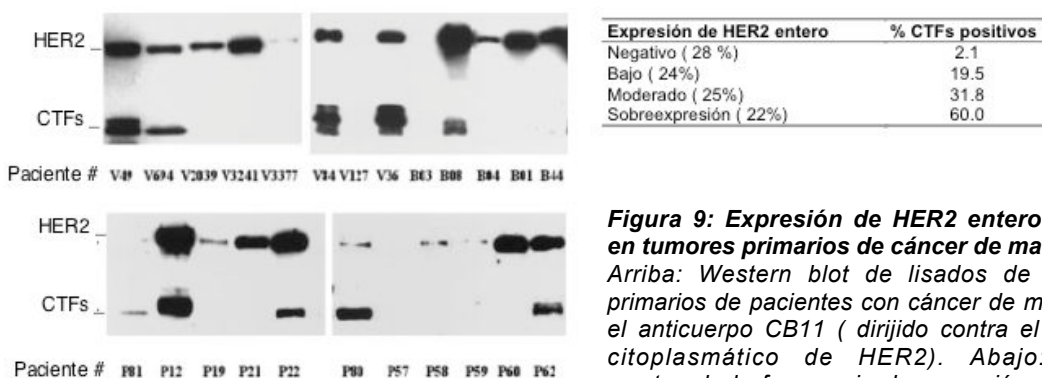
**Artículo 2.****“Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation.”**

**Judit Anido**, Maurizio Scaltriti, Joan Josep Bech Serra, Belén Santiago Josefát, Federico Rojo Todo, José Baselga, and Joaquín Arribas

*EMBO Journal*. 2006 Jul; Vol.25, No.13, pp.3234-3244

Los niveles de HER2 son elevados en un 30% de pacientes con cáncer de mama; donde se correlaciona con un mal pronóstico.

Recientemente en nuestro laboratorio hemos demostrado que, además de la forma completa del receptor, en el 25% de muestras de cáncer de mama analizadas se detecta una forma truncada de HER2 que hemos denominado CTFs (*Carboxy-Terminal Fragments*, Fragmentos Carboxilo-Terminales) (Figura 9). De acuerdo a su movilidad electroforética, los CTFs, podrían comprender el dominio citoplasmático de HER2 incluyendo, naturalmente, su dominio tirosina quinasa. Recientemente se ha demostrado que los CTFs correlacionan con metástasis en los ganglios linfáticos y peor pronóstico, sugiriendo que los CTFs tienen un papel importante en la tumorigénesis (Molina, Saez et al. 2002; Saez, Molina et al. 2006). Dado que el mecanismo de generación de estos CTFs y su posible papel en cáncer no se conocía, nuestro objetivo fue caracterizar la biología de los CTFs.



**Figura 9: Expresión de HER2 entero y CTFs en tumores primarios de cáncer de mama.**

Arriba: Western blot de lisados de tumores primarios de pacientes con cáncer de mama con el anticuerpo CB11 (dirigido contra el dominio citoplasmático de HER2). Abajo: Tabla mostrando la frecuencia de expresión de HER2 entero y CTFs en tumores primarios de cáncer de mama. Figura extraída de (Molina, Saez et al. 2002).

En este artículo demostramos que los CTFs se generan mediante inicio alternativo de la traducción a partir de las metioninas 611 y 687 de HER2. Dichas metioninas están situadas justo delante y detrás del dominio transmembrana, respectivamente. Los CTFs

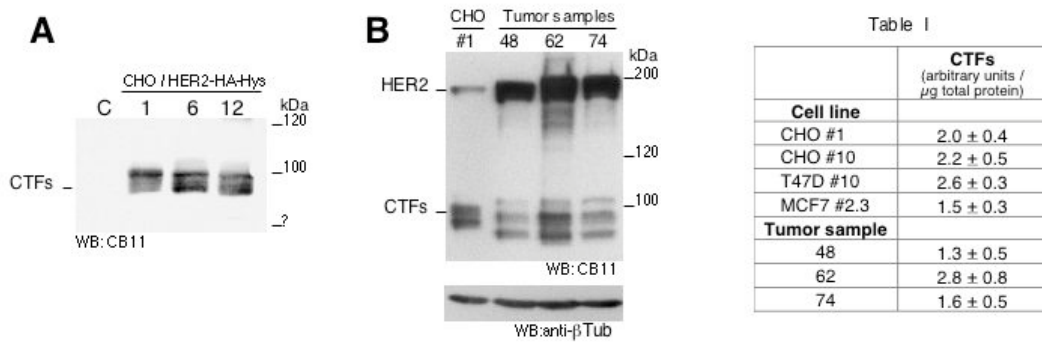
están fosforilados y tienen actividad quinasa in vitro. Se localizan en el citoplasma y núcleo de las células que los expresan, tanto en cultivos celulares como en muestras de pacientes con cáncer de mama. Finalmente, mostramos que la inyección subcutánea de células que sobreexpresan los CTFs en ratones atómicos da lugar a tumores que son resistentes al tratamiento con Herceptin, pero que responden a inhibidores de la quinasa de tirosinas de HER2.

Dado que un 60% de los pacientes con cáncer de mama que sobreexpresan HER2 (candidatos al tratamiento con Herceptin) sobreexpresan también los CTFs, nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de los CTFs en estos pacientes pueda tener un papel en la resistencia que se desarrolla al tratamiento con Herceptin.

Supplementary data.

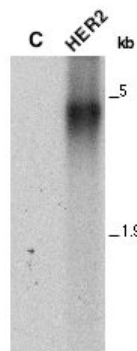
**Fig. 1. Analysis of CTFs expressed in different permanently transfected cell lines and tumor samples.** **A**, To compare the electrophoretic migration of the CTFs expressed by the permanently transfected cells shown in Fig. 1B, we analyzed by Western blotting 150, 10, 40 and 150  $\mu$ g of total proteins from cell lysates from parental CHO cells (C) or the stable transfectants 1, 6 and 12, respectively. **B**, Protein levels of lysates from tumor samples and permanently transfected cells expressing CTFs were quantified. 25  $\mu$ g of total protein were analyzed by western blot with CB11 antibodies or, as a loading control, with anti- $\alpha$  tubulin.

Table I. Samples from tumors and permanently transfected cells expressing CTFs were analyzed as in Fig.2, scanned, quantified and normalized. Results are the average + S. D. of three independent determinations.



Supplementary data. Fig. 1

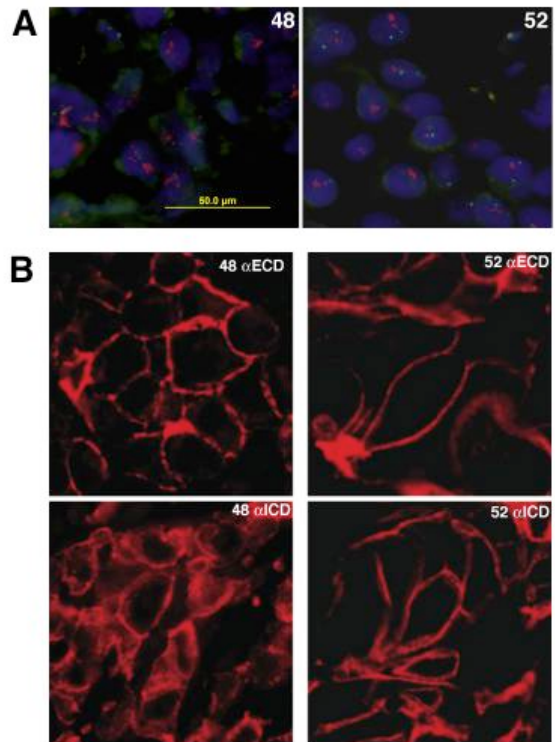
**Fig. 2. Northern blot analysis of in vitro transcribed and translated HER2 cDNA.** Empty pcDNA 3.1 vector (C) or the same plasmid containing the cDNA encoding HER2 were transcribed and translated in vitro and analyzed by Northern blotting with a probe specific for the extracellular domain of HER2.



Supplementary data. Fig. 2



**Fig. 3. Analysis of HER2 gene content and subcellular localization in tumors samples.** Preparations from the indicated tumors were analyzed by fluorescent in situ hybridization with probes against HER2 (A) or analyzed by immunofluorescence with the CBE1 antibody against the extracellular (ECD) domain or the CB11 antibody against the intracellular (ICD) domain of HER2, as described under materials and methods (B).



Supplementary data. Fig. 3



*DISCUSIÓN*

---



Durante la última década se han desarrollado nuevos compuestos anticancerosos dirigidos contra HER1 y HER2 (Baselga 2002). Iressa, un inhibidor selectivo de la quinasa de tirosinas de HER1 y Herceptin, un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio extracelular de HER2 son dos ejemplos de drogas que actualmente se están usando en la clínica. Desafortunadamente, el éxito terapéutico de estos compuestos no está siendo tan alto como se esperaba. Este fracaso puede ser atribuido en parte al desconocimiento que aún se tiene tanto del papel de los receptores HER en los procesos tumorales como del mecanismo de acción de los fármacos usados. Con este trabajo hemos intentado profundizar un poco más en estos aspectos con el fin de entender que aspectos moleculares son importantes para limitar la eficacia terapéutica tanto de Iressa como de Herceptin.

### **IRESSA Y HER1**

#### **IRESSA NO SÓLO ES EFECTIVO EN LÍNEAS CELULARES CON SOBREENPRESIÓN DE HER1**

Hemos demostrado que como se espera, Iressa inhibe el crecimiento de células con altos niveles de expresión de HER1. Curiosamente, Iressa es igualmente potente inhibiendo células con altos niveles de HER2 pero bajos niveles de HER1 (BT474 y SK-BR-3), confirmando los resultados publicados por otros grupos en células de cáncer de mama y ovario (Moasser, Basso et al. 2001; Moulder, Yakes et al. 2001; Normanno, Campiglio et al. 2002; Campiglio, Locatelli et al. 2004). Más recientemente, y de acuerdo con nuestros resultados, se ha demostrado que la transfección estable de HER2 pero no de HER1 en una línea celular de NSCLC con bajos niveles de HER1 y HER2 aumenta la sensibilidad de estas células al efecto anti-tumoral de Iressa (Ono, Hirata et al. 2004; Hirata, Hosoi et al. 2005). En conjunto, estos datos indican que la eficacia de Iressa no siempre se correlaciona con los niveles de HER1 celulares y que paradójicamente a pesar de la especificidad del inhibidor, la presencia de HER2 es determinante para el efecto anti-tumoral de Iressa.

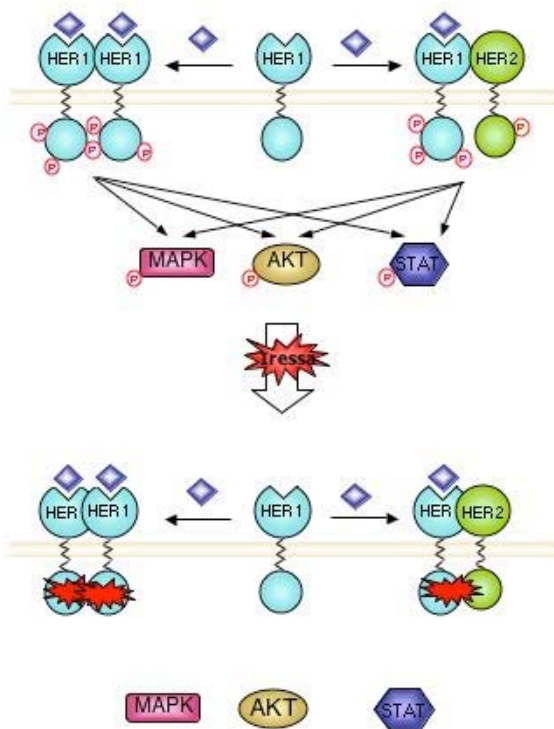
Se podría pensar que estos resultados son debidos a una inhibición directa de HER2 por Iressa. Hemos visto que la concentración de Iressa necesaria para inhibir la fosforilación de HER2 y la proliferación en las líneas celulares con altos niveles de HER2 a un 50% es de 0,5-2  $\mu\text{M}$  aproximadamente. Dado que la  $\text{IC}_{50}$  de Iressa sobre la actividad quinasa de tirosinas de HER2 es de 3,7  $\mu\text{M}$  (Wakeling, Barker et al. 1996), cabría la posibilidad de que esta inhibición se deba a un efecto directo de Iressa sobre el receptor HER2. No obstante es importante tener en cuenta que estas constantes de inhibición de

Iressa sobre los receptores HER se han obtenido *in vitro* mediante ensayos de quinasas y puede que no se correspondan con las  $IC_{50}$  que se dan en células intactas. De hecho, en experimentos con células intactas que expresan HER2 pero que no expresan HER1, nosotros y otros grupos hemos demostrado que incluso concentraciones superiores a  $5\mu M$  de Iressa no afectan a la activación de HER2 ni a las vías de señalización controladas por el receptor (Moulder, Yakes et al. 2001; Normanno, Campiglio et al. 2002; Campiglio, Locatelli et al. 2004). Por lo tanto, estos datos descartan un efecto directo de Iressa sobre HER2 a las concentraciones usadas en nuestros experimentos. En conjunto, estas observaciones sugieren que el efecto de Iressa en las células que sobreexpresan HER2 es mediado por HER1. Esto sumado al inesperado hallazgo de que Iressa inhibe la fosforilación de HER2 y de las vías de señalización activadas por heregulina, un ligando que se une a HER3 y HER4 pero no a HER1, nos llevó a explorar más profundamente los efectos de Iressa sobre la dimerización de receptores.

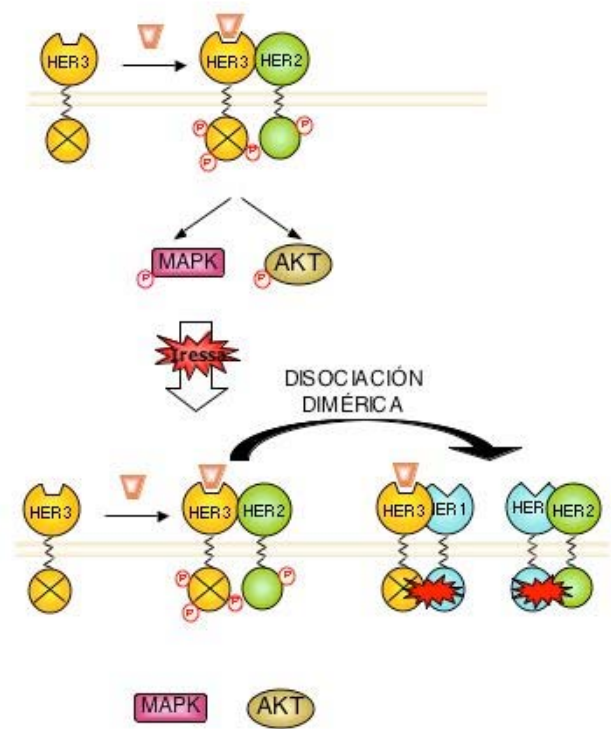
### **MECANISMO DE ACCIÓN DE IRESSA**

Ya se había demostrado anteriormente que inhibidores menos específicos de la quinasas de tirosinas del HER1 que también pertenecen a la familia de las quinazolinonas como el AG1478 y el AG1517 pueden inducir la formación de homodímeros HER1/HER1 así como heterodímeros HER1/HER2 inactivos (Arteaga, Ramsey et al. 1997). Más recientemente se ha visto que Iressa induce la formación de homodímeros inactivos HER1/HER1 e interfiere en la señalización de los dímeros HER2/HER3 (Moulder, Yakes et al. 2001). Finalmente, en nuestros estudios hemos observado que el tratamiento con Iressa da lugar a la formación no sólo de heterodímeros inactivos HER1/HER2, sino también a la formación de heterodímeros inactivos HER1/HER3. Nuestros resultados demuestran que tanto HER2 como HER3 son secuestrados directamente por el HER1 en heterodímeros inactivos HER1/HER2 y HER1/HER3. Este doble secuestro por HER1 en presencia de Iressa puede explicar la eficiente inhibición de la formación de heterodímeros HER2/HER3 activos y de la señalización transduccional en condiciones basales o de estimulación con heregulina cuando tratamos con la droga. En resumen, Iressa tiene un mecanismo de acción doble y complementario sobre los receptores de la familia HER: la inhibición directa de la actividad quinasas de tirosinas del HER1 por un lado, y el secuestro de HER2 y HER3 en dímeros inactivos HER1/HER1 (Moulder, Yakes et al. 2001), HER1/HER2 y HER1/HER3 por el otro (Figura 10). Estos datos han sido confirmados recientemente en células de NSCLC transfectadas con HER2, donde el tratamiento con Iressa disminuye el número de dímeros HER2/HER3 en condiciones basales (Hirata, Hosoi et al. 2005), demostrando que este efecto de Iressa no es

## A. SEÑALIZACIÓN POR EGF



## B. SEÑALIZACIÓN POR HEREGULINA



**Figura 10: Modelo hipotético mostrando el efecto de ZD1839 en la señalización mediante EGF y heregulina.**

**A.** El tratamiento con EGF resulta en la formación de dímeros fosforilados que contienen EGFR, y este efecto se previene mediante el pretratamiento con ZD1839. **B.** El tratamiento con ZD1839 anula completamente la formación de heterodímeros fosforilados HER2/HER3 inducidos por heregulina mediante el secuestro de HER2 y HER3 en heterodímeros inactivos (no fosforilados) EGFR/HER2 y EGFR/HER3. E=EGF, H= heregulina

dependiente de la línea celular.

En los complejos inactivos los receptores HER1, HER2 y HER3 se encuentran en sus formas no fosforiladas, que en el caso de HER3 bloquea su unión a p85 $\alpha$ , la subunidad reguladora de la PI3K (Hirata, Hosoi et al. 2005), lo que explicaría la inhibición de la señalización por Ras-Raf-Mapk, PI3K-Akt y STAT3 observada en ambos trabajos con el tratamiento con Iressa.

Las células de NSCLC usadas en el trabajo de Hirata et al. (Hirata, Hosoi et al. 2005) tienen bajos niveles de HER1 y HER2 pero niveles elevados de HER3. La sobreexpresión de HER2 en estas células, aumenta su sensibilidad a Iressa en comparación con las células parentales y estimula la señalización por Akt, seguramente mediante la formación de nuevos heterodímeros HER2/HER3. De todas las combinaciones entre los receptores

HER, los dímeros HER2/HER3 son los más potentes y su señalización regula la supervivencia y la muerte celular (Citri, Skaria et al. 2003). Como Iressa inhibe la formación de heterodímeros activos HER2/HER3 bloqueando así la señalización por HER2 y HER3, se espera entonces que estas células respondan de manera más sensible al tratamiento con Iressa. Consistentemente, en un estudio de Moasser y colaboradores. (Moasser, Basso et al. 2001), se muestra que todas las líneas celulares que respondieron a Iressa excepto una expresaban HER3.

En conjunto, estos datos sugieren que para evaluar la respuesta a Iressa es importante evaluar la presencia de otros miembros de la familia como HER2 y HER3.

El efecto de Iressa sobre la dimerización parece ser común a los inhibidores de la quinasa de tirosinas de la familia HER pertenecientes a la familia de las quinazolininas. Sin embargo, otros inhibidores de la quinasa de tirosinas de HER1 que pertenecen a otras clases de compuestos químicos como por ejemplo las dianilinoftalimidas no parecen influir en la dimerización de los receptores HER (Arteaga, Ramsey et al. 1997; Lichtner, Menrad et al. 2001). La razón por la cual las quinazolininas aumentan la capacidad de formar dímeros inactivos es desconocida, aunque hay evidencias que indican que podrían dar lugar a un cambio conformacional en el receptor. Por ejemplo, la estructura tridimensional de HER1 unido a erlotinib muestra que la presencia del inhibidor promueve el acercamiento de los dos lóbulos que forman el dominio quinasa de HER1 (Stamos, Sliwkowski et al. 2002) y se ha visto que PD152025 promueve un cambio en la afinidad de HER1 por el EGF formando complejos inactivos ligando-receptor (Lichtner, Menrad et al. 2001). En conjunto, estos datos claramente sugieren que los inhibidores de la quinasa de tirosinas de la familia de las quinazolininas promueven cambios conformacionales que podrían dar lugar a la aparición de dominios involucrados en el proceso de dimerización.

## **RESPUESTAS CLÍNICAS A IRESSA**

La reciente demostración de que un grupo de pacientes con NSCLC responden al tratamiento con los inhibidores de la quinasa de tirosinas de HER1 Iressa y erlotinib ha abierto nuevas vías de investigación (Lynch, Bell et al. 2004; Paez, Janne et al. 2004; Pao, Miller et al. 2004). Las respuestas son más frecuentes en mujeres no fumadoras, con adenocarcinomas y de etnia japonesa (Fukuoka, Yano et al. 2003). Estos pacientes tienen tumores con mutaciones somáticas en el dominio quinasa de HER1 de manera más frecuente que en otros pacientes. Estas mutaciones se encuentran en la región de unión a ATP del dominio quinasa de tirosinas. Las mutaciones encontradas en HER1 incluyen inserciones y deleciones que mantienen la pauta de lectura y mutaciones de



cambio de codón. Recientemente se ha demostrado que estas mutaciones desestabilizan la conformación inactiva del dominio quinasa de HER1 que ahora se encontrará en un estado activo de manera constitutiva (ver Figura 2) (Zhang, Gureasko et al. 2006). Esto explicaría por que las formas mutantes de HER1 dan lugar a una activación más potente y prolongada del receptor en comparación de lo visto en células transfectadas con el receptor normal (Lynch, Bell et al. 2004). Dado que Iressa se une al estado activo del dominio quinasa de HER1, estas formas mutantes se convertirían en dianas constitutivas de la droga explicando la necesidad de concentraciones más bajas de Iressa para inhibir el receptor (Lynch, Bell et al. 2004; Paez, Janne et al. 2004). En conjunto los datos publicados hasta la fecha indican que estas células se vuelven “adictas” o dependientes al HER1 mutado, que a su vez es más sensible al tratamiento con Iressa, explicando la alta efectividad del tratamiento con Iressa en pacientes que tienen estas mutaciones.

A pesar de esto hay que decir que algunos de los pacientes que respondieron no tenían mutaciones en el dominio quinasa de HER1 y algunos pacientes con la versión mutante de HER1 no respondieron a la terapia. Estos casos podrían ser explicados por un estudio que demuestra que la presencia de amplificación génica de HER2 aumenta la sensibilidad al tratamiento con Iressa en pacientes de NSCLC con sobreactivación de HER1 (ya sea por sobreexpresión, amplificación génica o mutaciones en el dominio quinasa) (Cappuzzo, Varella-Garcia et al. 2005). Dentro de este estudio es particularmente interesante que de los siete pacientes encontrados con mutaciones en HER1 pero sin amplificación de HER2 solo uno respondió al tratamiento con Iressa, apoyando la teoría de que HER2 aumenta la sensibilidad a Iressa en pacientes positivos para HER1. Estos resultados en pacientes confirman nuestros datos que demuestran que Iressa tiene un efecto antitumoral en células con altos niveles de HER2. De todos modos, como hemos visto en experimentos con células intactas, es necesaria la presencia de HER1 para el efecto antitumoral de Iressa, ya que los pacientes de NSCLC que tienen amplificación de HER2 pero no tienen HER1, no responden a Iressa (Cappuzzo, Varella-Garcia et al. 2005).

En NSCLC, la amplificación génica de HER2 se encuentra más frecuentemente en mujeres no fumadoras, que a su vez son el grupo de pacientes que más frecuentemente tienen mutaciones en HER1 y que mejor responden a Iressa (Lynch, Bell et al. 2004; Miller, Kris et al. 2004; Paez, Janne et al. 2004; Pao, Miller et al. 2004; Cappuzzo, Hirsch et al. 2005; Shigematsu, Lin et al. 2005), pudiendo explicar en parte la alta sensibilidad de este grupo al tratamiento con Iressa .

En resumen, estos estudios apoyan el uso Iressa no solo en pacientes que sobreexpresan HER1 sino también en pacientes que sobreexpresan HER2, seleccionados mediante FISH (Cappuzzo, Varella-Garcia et al. 2005). También apoyan

el racional para explorar el uso de Iressa o otros inhibidores de la quinasa de tirosinas en combinación con anticuerpos anti-HER2 que tienen mecanismos de acción diferentes a los inhibidores de quinasa de tirosinas y que por lo tanto se pueden complementar. En cáncer de mama, actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos combinando Iressa y Herceptin ( un anticuerpo dirigido al ectodominio de HER2) (Moulder and Arteaga 2003), apoyados por evidencias preclínicas de los potentes efectos antitumorales de esta combinación (Normanno, Campiglio et al. 2002).

Por otro lado, el hallazgo de que Iressa, un inhibidor específico *in vitro* de la tirosin quinasa del HER1, puede inhibir indirectamente la actividad de otros receptores de la familia HER en células intactas nos plantea otra cuestión. Además de Iressa, hay otros inhibidores de la quinasa de tirosinas del HER1 que se encuentran actualmente en desarrollo clínico. Algunos de estos agentes, como Lapatinib, un inhibidor dual de HER1 y HER2 (Rusnak, Affleck et al. 2001; Rusnak, Lackey et al. 2001) y el CI-1033, un inhibidor irreversible de HER1, HER2 y HER4 (Fry, Bridges et al. 1998), son potentes inhibidores *in vitro* no sólo del HER1 sino también de HER2 y HER4. Una cuestión importante que se plantea es si estos inhibidores de los receptores de la familia HER serán más eficaces que un inhibidor específico de la quinasa de tirosinas del HER1 (como Iressa) o si tendrán una eficacia similar *in vivo*.

## **HERCEPTIN Y HER2**

### **UN NUEVO MECANISMO PARA GENERAR FRAGMENTOS CARBOXILO-TERMINALES DEL RECEPTOR HER2**

El análisis de biopsias de tumores primarios de mama muestra que, a parte de la forma entera del receptor, un 25% de los tumores tienen unas formas de menor peso molecular (entre 90 y 100 KDa) que contendrían todo el dominio citoplasmático de HER2 a las que hemos llamado CTFs ( "Carboxi-Terminal Fragments") (Molina, Saez et al. 2002). La presencia de estas formas truncadas de HER2 correlaciona con metástasis en los ganglios linfáticos y menor supervivencia, sugiriendo que los CTFs tienen un papel importante en tumorigénesis, por lo que decidimos estudiar más en profundidad el mecanismo de formación y la función de estos CTFs. Para ello transfectamos el cDNA entero de HER2 en la línea celular CHO, y observamos que a parte de la proteína entera se generaban una formas truncadas de unos 90KDa de peso muy similares a las que nos encontramos en los tumores de pacientes. Usando inhibidores de proteasas de amplio espectro, hemos demostrado que estos CTFs no son producto del corte proteolítico de

HER2 y que se pueden sintetizar independientemente de la presencia del receptor entero. Esto nos hizo pensar en la posibilidad de que el mRNA de HER2 tuviera un inicio alternativo interno de la traducción. Se ha demostrado que entre un 3 y un 5% de los mRNAs celulares tienen iniciación interna de la traducción (Johannes, Carter et al. 1999), mediada seguramente en su mayoría por elementos IRES (Internal Ribosome Entry Site) (Johannes and Sarnow 1998; Johannes, Carter et al. 1999; Hellen and Sarnow 2001). Originalmente identificados y particularmente bien estudiados en los Picornavirus, los elementos IRES se han descrito en un número pequeño, pero creciente de mRNAs celulares de eucariotas superiores. En los IRES, el mRNA adopta una estructura tridimensional que recluta el ribosoma directamente a una posición interna del mRNA dando lugar a la traducción de manera independiente de estructuras cap. En la mayoría de los casos, los IRES están localizados dentro de la zona 5' UTR aunque excepcionalmente los podemos encontrar en medio de la secuencia codificante, como en los casos de la metaloproteasa desintegrina TACE (Fan, Turck et al. 2003), el receptor Notch2 (Lauring and Overbaugh 2000), el antagonista de Notch Hairless (Maier, Nagel et al. 2002) y el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2) (Bonnal, Schaeffer et al. 2003).

Hemos demostrado que las metioninas localizadas en las posiciones 611 y 687 (antes y después del dominio transmembrana, respectivamente) pueden ser iniciadores alternativos de la traducción *in vitro* e *in vivo*, sugiriendo la existencia de un IRES dentro de la secuencia codificante de HER2. Aparentemente, los diferentes CTFs observados en las células provienen de estas dos metioninas, lo que sugiere que las diferentes bandas que se forman a partir de una única metionina son debidas a modificaciones post-traduccionales. Una de estas modificaciones, es como cabía esperar, fosforilación, tal como se puede comprobar en el western blot con anticuerpos anti-fosfotirosina, pero no podemos excluir otro tipo de modificaciones.

### **LOS CTFs NO SON GENERADOS EXCLUSIVAMENTE POR SHEDDING DE ECTODOMINIOS**

Hemos demostrado por fraccionamiento subcelular que en los tumores, las bandas de CTFs de mayor peso molecular están en la fracción de membrana y las de menor peso molecular son solubles y están localizadas en el citoplasma y núcleo de la célula.

Se ha especulado mucho acerca del mecanismo responsable de la producción de los CTFs presentes en los tumores de pacientes con cáncer de mama, y durante algún tiempo se pensó que estos CTFs presentes en los tumores eran un producto del shedding del receptor HER2 entero, que daba como resultado un fragmento que contenía los dominio citoplasmático y transmembrana del receptor anclados a membrana,

(Codony-Servat, Albanell et al. 1999; Molina, Codony-Servat et al. 2001) y la liberación del dominio extracelular del receptor al suero. Sin embargo, la baja eficiencia del shedding de HER2 que afecta a un porcentaje pequeño de las moléculas expresadas en las líneas celulares analizadas (aproximadamente el 5%, ver (Codony-Servat, Albanell et al. 1999), y hasta un 20% de las moléculas, cuando las células son tratadas con potentes e inespecíficos activadores de metaloproteasas (Molina, Codony-Servat et al. 2001)) no explicaría la presencia de altos niveles de CTFs en algunos tumores. Además hasta la fecha, no se ha encontrado ninguna correlación entre la presencia de los CTFs en el tumor primario y la detección del ECD en el suero, que por otro lado, como he comentado en la introducción, se ha demostrado que puede provenir de otros mecanismos. Estos datos indican que el shedding de HER2 solo podría explicar la presencia de los CTFs de mayor peso molecular unidos a membrana.

Sin embargo, estos CTFs unidos a membrana también podrían generarse por traducción alternativa a partir de la metionina 611, que produce una proteína que contiene el dominio transmembrana, que podría funcionar como una señal hidrofóbica que localizaría parcialmente a estos CTFs en la membrana plasmática. En conclusión, nuestros resultados indican que el shedding de ectodominios puede ser el responsable de los CTFs de mayor peso molecular y abren la posibilidad de que el inicio de la traducción pueda contribuir también a su generación.

Por otro lado, la traducción alternativa a partir de la metionina 687 en las líneas celulares transfectadas da lugar a unas proteínas solubles muy parecidas si no idénticas a los CTFs de menor peso molecular presentes en los tumores. En conjunto, estos datos muestran que en células, y muy posiblemente *in vivo*, la iniciación alternativa de la traducción es un mecanismo relevante para la formación de CTFs (Figura 11).

### **USO ALTERNATIVO DE DIFERENTES CODONES DE INICIACIÓN**

La pregunta que deriva directamente de estos resultados es por qué en algunas células transfectadas se usa la metionina 611 y la metionina 687 en vez de la metionina 1. Esta cuestión es importante para explicar la gran variabilidad en los niveles de CTFs expresados en las muestras de tumores (Molina, Saez et al. 2002). Se ha demostrado que la mayoría de los IRES funcionan preferencialmente cuando la traducción cap dependiente está impedida fisiológicamente como ocurre durante la mitosis, quiescencia, diferenciación o estrés debido a diferentes factores (irradiación ultravioleta, cambios de temperatura, limitación de nutrientes, estrés oxidativo, hipoxia o exposición a varias drogas o toxinas) (Bonneau and Sonenberg 1987; Sachs 2000). El mecanismo molecular

que redirige a los ribosomas desde la estructura cap hacia las secuencias IRES en estas condiciones es desconocido hasta la fecha, pero se sabe que es altamente dependiente del tipo celular y del estado de la célula. También se ha demostrado que, además de los factores de iniciación de la traducción canónicos, también están involucradas proteínas trans-activadoras específicas (ITAFs) capaces de dirigir selectivamente el ribosoma a un grupo particular de mRNAs celulares (revisado en (Stoneley and Willis 2004)).

La caracterización de las condiciones o los factores necesarios para la regulación de un IRES hipotético dentro de HER2 nos ayudaría a entender la variabilidad de la expresión de estas especies de HER2 dentro de las células y los tumores.

Por último, el hecho de que la traducción cap dependiente este impedida en situaciones particularmente presentes en procesos tumorales como hipoxia, estrés y mitosis entre otros, junto con el hecho de que muchos oncogenes, factores de crecimiento y proteínas relacionadas con crecimiento celular, proliferación, apoptosis y angiogénesis contienen un elemento IRES (revisado en (Hellen and Sarnow 2001)) hace pensar que quizás la traducción dependiente de IRES de ciertos mRNAs (entre ellos los CTFs) pueda contribuir a la supervivencia de las células cancerosas dándoles una ventaja proliferativa (Pain 1996; Holcik 2004).

## **LOS CTFs PROMUEVEN LA FORMACIÓN DE TUMORES RESISTENTES A HERCEPTIN. IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS**

Aunque se describió hace tiempo que los CTFs en tumores primarios de mama correlacionan con metástasis en los ganglios y peor pronóstico (Molina, Saez et al. 2002; Saez, Molina et al. 2006), sugiriendo un papel de los CTFs en tumorigénesis, hasta ahora ha sido difícil estudiar su posible papel en el desarrollo de tumores. La identificación del mecanismo de generación nos permite directamente contestar a este punto. La transfección de células con la construcción con la delección que elimina la metionina inicial nos permite la expresión específica de los CTFs, y hemos demostrado que pueden dar lugar al desarrollo de tumores en ratones atímicos donde hemos inducido xenógrafos con células que sobreexpresan los CTFs.

Los tumores inducidos con células que sobreexpresan CTFs, a diferencia de los dependientes del receptor entero, no responden al tratamiento con Herceptin, sugiriendo que los CTFs pueden tener un papel en la resistencia al tratamiento con Herceptin. Teniendo en cuenta que un 60% de los pacientes con sobreexpresión de HER2 también expresan los CTFs (Molina, Saez et al. 2002), estos resultados pueden tener implicaciones terapéuticas muy importantes. Según los criterios de selección actuales

(amplificación génica detectada por FISH y tinción 3+ por IHQ con anticuerpos contra el dominio citoplasmático del receptor) los dos pacientes presentados en este artículo ( uno de ellos también sobreexpresa los CTFs) serian candidatos al tratamiento con Herceptin. Nuestros resultados sugieren que los pacientes seleccionados que co-expresaran CTFs podrían desarrollar resistencia a la droga. Consistentemente, resultados preliminares de un estudio retrospectivo que estamos llevando a cabo en el laboratorio muestran una clara correlación entre la presencia de CTFs en los tumores primarios y el desarrollo de resistencia al tratamiento con Herceptin (Scaltriti et al, manuscrito en preparación). En estos pacientes, hemos hecho una doble IMF con anticuerpos dirigidos contra el dominio extracelular y citoplasmático de HER2 sobre biopsias parafinadas con la finalidad de poder distinguir entre la forma entera del receptor y los CTFs. En un futuro se podría usar esta técnica como método rutinario para determinar con más exactitud que pacientes tendrían que ser tratados con Herceptin.

Nuestros resultados también indican que tal como hemos demostrado con tumores inducidos en ratones atímicos, los pacientes con sobreexpresión de CTFs podrían beneficiarse del tratamiento con inhibidores de la quinasa de tirosinas de HER2 como por ejemplo Lapatinib. De hecho, un estudio fase I con Lapatinib, ha mostrado actividad clínica en pacientes de cáncer de mama con sobreexpresión de HER2 que fueron resistentes al tratamiento con Herceptin (Spector, Xia et al. 2005).

### **PRESENCIA DE RECEPTORES TRUNCADOS EN FAMILIA HER**

La aparición de formas truncadas del receptor donde se pierde parte del dominio extracelular, no es exclusivo de HER2, fenómenos parecidos se observan también en otros miembros de la familia HER.

La mutación más frecuentemente encontrada en el receptor HER1 es la variante EGFRvIII que contiene una delección del dominio de unión a ligando. Esta forma que parece estar localizada en la membrana plasmática (Wikstrand, McLendon et al. 1997), es constitutivamente activa y es muy importante para el mantenimiento y la progresión tumoral, lo que la ha convertido en una atractiva potencial diana terapéutica en gliomas (Luwor, Johns et al. 2001; Mishima, Johns et al. 2001)).

Por el otro lado, el corte proteolítico secuencial de HER4 da lugar a la liberación intracelular de su cola citoplasmática, que se ha encontrado que tiene una señal de localización nuclear funcional que la transporta al núcleo (Williams, Allison et al. 2004). Nuestros resultados muestran un nuevo mecanismo para generar fragmentos carboxilo-terminales de HER2 solubles (CTFs) con capacidad para acumularse en el núcleo: inicio alternativo de la traducción (Figura 11).

Ya se había observado anteriormente que el uso de codones alternativos de iniciación de la traducción podía ser usado para controlar la localización subcelular de diferentes isoformas de una proteína. De esta manera el mismo mensajero es capaz de generar varias proteínas con una localización subcelular específica dependiendo de la presencia o ausencia de una señal de localización nuclear (como es el caso del FGF-2) o un péptido señal en la parte amino-terminal de la proteína entera (como ocurre con el receptor Notch2)( revisado en (Touriol, Bornes et al. 2003)).

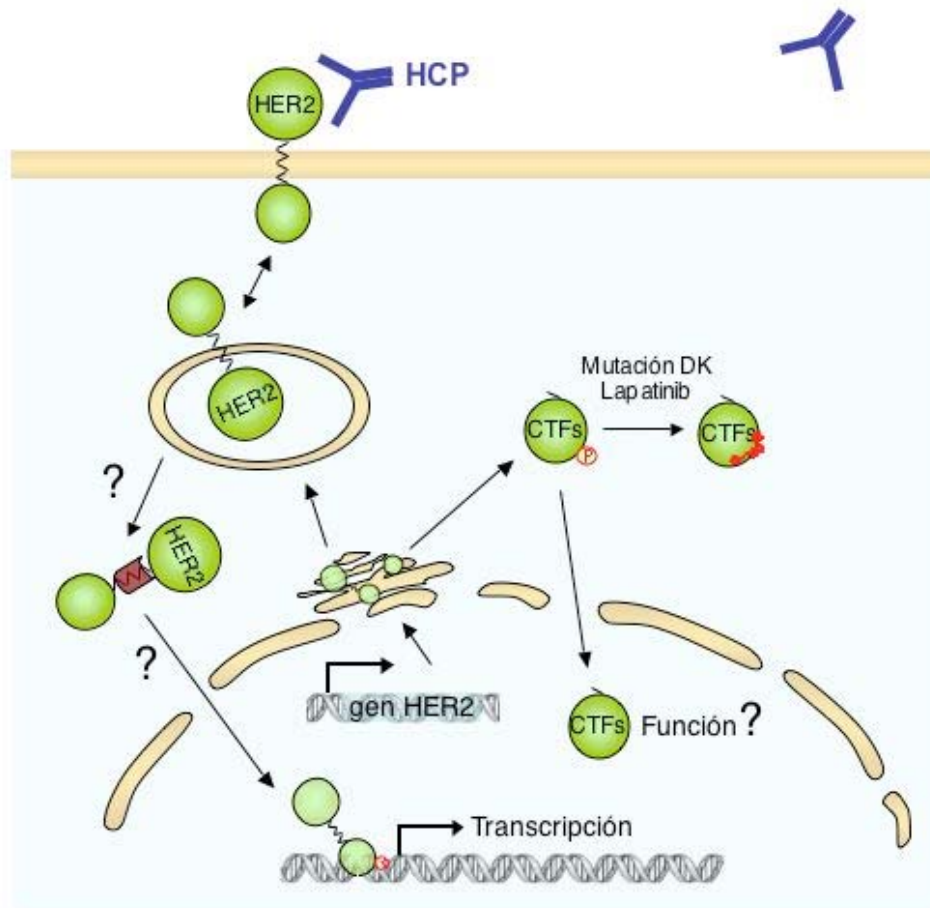
Un artículo reciente indica que la región juxtamembrana intracelular rica en aminoácidos básicos (aa 676-KRRQQKIRKYTMRR-689) es necesaria para la acumulación nuclear del HER2 entero (Chen, Chen et al. 2005; Giri, Ali-Seyed et al. 2005). Esta región no se encuentra en los CTFs más abundantes, que empiezan en la metionina 687. Entonces, el mecanismo de localización nuclear de los CTFs podría estar mediado por una señal de localización nuclear todavía no descrita aunque no descartamos que haya implicado otro mecanismo. En cualquier caso, la translocación nuclear de los CTFs, es dependiente de su actividad quinasa ya que hemos demostrado que la mutación puntual que inhibe la actividad quinasa del receptor bloquea su localización nuclear (Figura 11).

Además, de manera similar a la cola citoplasmática de HER4, los CTFs se pueden fosforilar y tienen actividad quinasa indicando que se trata de proteínas activas (Figura11).

En conjunto, estos datos sugieren que el dominio extracelular de los receptores HER actuaría como un inhibidor de la función quinasa del receptor y que en procesos tumorales, las células encontrarían diferentes mecanismos para eliminar el dominio extracelular y mantener estos receptores continuamente activados. Además en el caso de HER4 y de los HER2 CTFs estos fragmentos citoplasmáticos son solubles y se pueden transportar al núcleo. Esto es muy importante porque cada vez está más claro que, además de la vía de señalización canónica, los receptores HER pueden funcionar de una manera más directa actuando como transductores de señal que son transportados al núcleo celular donde probablemente modulen la expresión génica (revisado en (Carpenter 2003)).

A parte de estos fragmentos citoplasmáticos también se ha descrito que HER1, HER2 y HER3 enteros pueden localizarse en el núcleo, donde HER1 y HER2 pueden regular la transcripción de genes. Ya hace algún tiempo que se describió que HER2 podía localizarse en el núcleo en su forma entera por el grupo de Hung. Este HER2 entero nuclear en células correspondería más o menos a un 5% del receptor total. Aunque se ha visto que el HER2 entero puede interactuar con la importina  $\alpha$ 1 y los componentes del poro nuclear que mediarían su entrada al núcleo, hay un gran debate entorno a como un

receptor integral de membrana puede liberarse de la membrana citoplasmática y llegar al núcleo y de hecho todavía se desconoce el mecanismo responsable (Wang, Lien et al. 2004; Giri, Ali-Seyed et al. 2005). De esta manera, contrariamente a los CTFs que son totalmente solubles y que podrían difundir fácilmente hacia el núcleo, solo una pequeña proporción del receptor entero se transloca al núcleo, detectándose de manera muy puntual, apoyando la incapacidad de un receptor integral de membrana de viajar al núcleo.



**Figura 11: Modelo hipotético mostrando los diferentes productos del gen HER2.**

El gen HER2 puede dar lugar al receptor entero de 185 KDa que está situado en la membrana plasmática. Se ha descrito que el receptor entero puede translocarse al núcleo por un mecanismo todavía desconocido. Por traducción alternativa del gen HER2 también podemos obtener los CTFs, que contienen todo el dominio citoplasmático de HER2, incluido su dominio quinasa de tirosinas. Los CTFs son proteínas solubles localizadas en el citoplasma y núcleo celular que tienen actividad quinasa y están fosforilados. Los CTFs no responden al tratamiento con Herceptin, pero son sensibles los inhibidores del dominio quinasa de HER2, que inhiben su fosforilación. El dominio quinasa de los CTFs también está involucrado en su transporte al núcleo. La función de los CTFs en el núcleo está en estudio. DK: dominio quinasa.



## PODER PRONÓSTICO DE LOS RECEPTORES HER NUCLEARES

Como he comentado en la introducción diferentes grupos han llegado a resultados contradictorios en torno al valor pronóstico de HER1 (Klijn, Berns et al. 1992), lo que ha generado un amplio debate en torno a los niveles totales de HER1 como indicador de pronóstico en pacientes de cáncer de mama (Lo, Xia et al. 2005). De la misma manera, algunos estudios han puesto en duda el valor pronóstico de HER2 al encontrar resultados contradictorios dependiendo de la técnica usada para detectar el receptor (Gullick 1990; Ravidin and Chamness 1995; Henderson and Patek 1998; Ross and Fletcher 1998; Mirza, Mirza et al. 2002).

A su vez, el potencial oncogénico y el significado clínico de HER4 se entiende poco (Junttila, Sundvall et al. 2000; Gullick 2003) . Hay artículos que muestran una alta expresión de HER4 en diferentes tipos de cáncer mientras que otros autores muestran que la expresión de HER4 está disminuida o se ha perdido en algunas muestras tumorales (revisado en (Maatta, Sundvall et al. 2006)). Además hay artículos contradictorios acerca del significado de HER4 para el comportamiento clínico (Gullick 2003).

Estas discrepancias se pueden explicar por muchas razones. En general, se han usado técnicas muy heterogéneas para determinar la sobreactivación de los receptores HER en cáncer. Estas técnicas que no comparten un criterio común para discriminar entre muestras positivas y negativas y son incapaces de detectar el estado de activación de la proteína o de distinguir entre la forma entera unida a membrana o las formas nucleares o truncadas del receptor. Esto sumado a que cada vez está más establecida la presencia de diversas formas activas de los receptores HER en tumores ha llevado a la realización de estudios recientes donde se ha estudiado la relación entre las formas entera y truncadas de los receptores así como la localización subcelular de las mismas y el comportamiento de la enfermedad.

### HER1:

En un grupo de 130 carcinomas de mama, se ha encontrado una correlación inversa entre HER1 nuclear, pero no el HER1 no-nuclear, y la supervivencia en estos pacientes (Lo, Xia et al. 2005) Esta observación es consistente con el hecho de que niveles totales de HER1 no son un buen indicador de pronóstico en pacientes de cáncer de mama y también sugiere un nuevo valor pronostico del HER1 nuclear en estos pacientes. Este mismo grupo también ha observado una correlación inversa entre el HER1 nuclear y la supervivencia en pacientes con carcinoma oral de células escamosas (Lo, Xia et al. 2005). Curiosamente en este estudio han usado cinco anticuerpos diferentes para

detectar HER1 y solo los que estaban dirigidos contra el dominio intracelular de la proteína (dos de ellos) han sido capaces de detectar señal nuclear. Estos datos sugieren que quizás la tinción nuclear corresponda a una forma truncada N-terminal de HER1 que no han identificado. Otro grupo, en un estudio con 95 individuos con carcinomas orofaríngeos de células escamosas, ha encontrado que tanto los niveles de HER1 total como nuclear predicen peor pronóstico clínico medido como recurrencia local y peor supervivencia sin enfermedad (Psyrris, Yu et al. 2005). A pesar del pequeño tamaño de estos grupos, estos estudios apoyan un estudio más extensivo en un futuro para examinar el valor pronóstico de HER1 nuclear en una población mayor con varios tipos de cáncer.

#### HER2:

Recientemente se ha demostrado que la presencia de CTFs detectados por WB en el tumor primario de pacientes con cáncer de mama correlaciona con metástasis en los ganglios linfáticos (Molina, Saez et al. 2002). En este mismo estudio encontraron que esta correlación no se daba con el receptor HER2 entero sugiriendo que los CTFs pueden tener un papel diferente al receptor entero en la producción de metástasis. Estudios posteriores han demostrado que estos CTFs también correlacionan con menor supervivencia y es un factor pronóstico más fuerte que la sobreexpresión del receptor entero (Saez, Molina et al. 2006). Teniendo en cuenta que hemos demostrado que los CTFs formados a partir de traducción alternativa son en su mayoría solubles y se pueden detectar en el citoplasma y núcleo de las muestras tumorales cabría esperar una correlación entre el marcaje citosólico/nuclear y peor pronóstico en estos pacientes.

#### HER4:

Parte de la controversia acerca del potencial oncogénico de HER4 se puede atribuir a la existencia de diferentes isoformas que ocurren de manera natural y que difieren entre ellas en estructura y función (Elenius, Corfas et al. 1997; Junttila, Sundvall et al. 2000; Kainulainen, Sundvall et al. 2000). Estas isoformas están generadas por splicing alternativo (Junttila, Laato et al. 2003) y se caracterizan por variaciones en el dominio juxtamembrana extracelular y los dominios citoplasmáticos.

Se ha demostrado que las diferentes isoformas tienen diferente potencial oncogénico, siendo la que puede sufrir shedding la más oncogénica y la única sobreexpresada en pacientes con cáncer de mama (Maatta, Sundvall et al. 2006). Esta isoforma da lugar a la liberación del dominio intracelular de HER4 que se transloca al núcleo induciendo una mayor proliferación *in vitro*. El análisis por IHQ de muestras de mama sugieren que la localización nuclear del epítipo carboxilo-terminal de HER4 se correlaciona con un

fenotipo más invasivo (Srinivasan, Gillett et al. 2000) y peor supervivencia (Junttila, Sundvall et al. 2005) comparado con pacientes que tienen el HER4 localizado en membrana. Estos datos indican que el corte de HER4 en cáncer de mama puede ser importante para la tumorigénesis.

Todos estos datos juntos sugieren que mientras el receptor entero localizado en membrana no correlaciona con un peor pronóstico su parte truncada o nuclear sí. Esto nos sugiere que quizás estas proteínas nucleares tengan unas funciones que son diferentes a las del receptor situado en la membrana e importantes para la tumorigénesis y el comportamiento clínico. Apoyando esta teoría cada vez esta más claro que estos receptores nucleares (enteros o no) pueden unirse a DNA y activar la transcripción de diferentes genes que en su mayoría están muy relacionados con cáncer (Lin, Makino et al. 2001; Wang, Lien et al. 2004; Lo, Hsu et al. 2005; Hanada, Lo et al. 2006). En vista de los artículos recientes mostrando que el dominio citoplasmático de HER2 induce una potente transactivación de la transcripción (Xie and Hung 1994) , y dado que los CTFs se localizan parcialmente en el núcleo celular, un escenario posible podría ser la modificación de la transcripción de ciertos genes por los CTFs que, a la vez, llevarían al crecimiento tumoral.

A pesar de esto, el papel patológico de estas proteínas nucleares todavía es muy desconocido. Por ejemplo, todavía se tiene que determinar si juegan un papel importante en la formación, progresión, crecimiento metastático y/o respuestas terapéuticas en tumores humanos. Aún así los estudios realizados indican que en un futuro será muy importante tener en cuenta la presencia de las diferentes formas truncadas y/o nucleares para estudios sobre comportamiento clínico.

## **PERSPECTIVAS**

El estudio de las vías de transducción de señal alteradas en cáncer, ha dado lugar al descubrimiento de numerosas dianas moleculares. Entre ellas el uso de drogas dirigidas a la familia HER ha representado un gran avance y ha introducido cambios drásticos en el tratamiento del cáncer en la última década.

A pesar de esto, la inhibición de la señalización mediada por la familia HER ha resultado ser más complicada de lo esperado inicialmente (revisado en (Baselga and Arteaga 2005)). De nuestros resultados se extrae que la señalización por la familia HER tiene un alto nivel de complejidad y se tienen que tener en cuenta, a parte de la expresión de la proteína diana, otros factores como son la expresión de otros miembros de la familia, la

expresión de formas truncadas o mutantes de la proteína o la localización subcelular de esta para obtener resultados plenamente satisfactorios. Esta complejidad no está limitada a la familia HER ya que en la mayoría de las células tumorales se encuentran desreguladas múltiples vías de señalización para asegurar que las funciones críticas para la supervivencia del tumor se mantienen, generando una gran redundancia en la señalización. Esto sumado a que las lesiones moleculares responsables de la tumorigenicidad varían entre pacientes con un mismo tipo de tumor y entre los diferentes tipos de cáncer ha llevado a entender el cáncer como un conjunto de enfermedades muy heterogéneas.

Estas consideraciones dejan entrever que el uso de un solo inhibidor no va a conseguir bloquear completamente la señalización involucrada en la progresión tumoral de un único paciente o un único tipo de tumor. De hecho, a pesar de la emoción inicial que generó la terapia dirigida, la eficacia clínica de estos compuestos no está siendo tan alta como se esperaba. Esto pone en evidencia que los métodos usados en la actualidad para seleccionar la terapia que se administrará a cada paciente son insuficientes y se necesita desarrollar y llevar a cabo nuevas estrategias para afrontar la inherente complejidad de los procesos tumorales.

La introducción de chips génicos ha dado lugar a un gran avance en este campo. El análisis de los perfiles génicos de múltiples muestras tumorales ha resultado en la identificación de diferentes firmas génicas que aparecen de manera repetitiva. Cada una de estas firmas refleja un patrón característico de vías de señalización desreguladas. Estos patrones correlacionan con un peor comportamiento de la enfermedad y predicen la sensibilidad a drogas terapéuticas dirigidas a componentes de esa vía (Bild, Yao et al. 2006). Pero esta técnica tiene algunas limitaciones ya que un gen puede dar una proteína que puede sufrir diferentes tipos de modificaciones post-traduccionales importantes para su función. Entonces, no es sorprendente que no haya una absoluta correlación entre los niveles de expresión de mRNA y la correspondiente actividad de la proteína (Gygi, Rochon et al. 1999). El uso de chips proteómicos nos puede dar información referente a diferentes modificaciones post-traduccionales como fosforilación, corte proteolítico, localización subcelular o ubiquitinización entre otros (Espina, Geho et al. 2005; Jensen 2006). Esta técnica se basa en el uso de diferentes anticuerpos específicos sobre un conjunto ordenado de hasta cientos de centros de tejido que provienen de bloques parafinados de múltiples individuos. De esta manera los chips proteómicos permiten analizar un elevado número de muestras usando pequeñas muestras de tejido (Kononen, Bubendorf et al. 1998).

Combinando esta tecnología con datos morfológicos y genómicos, se puede crear un mapa completo del estado funcional de un paciente particular. Estas técnicas entonces

pueden convertirse en prometedoras herramientas para el diagnóstico y el pronóstico. Y esto es aún más pertinente cuando hablamos de terapia: la información obtenida de vías de señalización al completo pueden ser usadas para seleccionar diferentes dianas dentro de una cascada de señalización.

Poner a punto esta tecnología va a representar un gran esfuerzo que requerirá muchos años de colaboración dentro de la comunidad científica. Estamos entrando en una nueva era donde cada paciente recibirá una terapia individualizada basada en las vías de señalización cruciales que conducen su tumor; donde un enfoque combinado en el que incorporan datos genómicos y proteómicos de una manera sistemática serán esenciales para conseguir este objetivo. Estos avances marcan un salto desde la terapia específica de tumor a la terapia específica de paciente, que reconocerá la complicada red de interacciones presente en cáncer.



*CONCLUSIONES*

---





**ARTÍCULO 1.**

1. Iressa, un inhibidor específico de la quinasa de tirosinas del HER1, tiene un marcado efecto antiproliferativo en células de cáncer de mama que tienen bajos niveles de HER1 pero que sobreexpresan HER2.
2. Iressa inhibe la transducción de señal activada por EGF en células que sobreexpresan HER2. Iressa también previene la activación inducida por heregulina, un ligando que no se une al HER1.
3. Iressa tiene un mecanismo doble y complementario de acción sobre los receptores de la familia HER : inhibición directa de la quinasa de tirosinas del HER1 por un lado, y el secuestro de HER2 y HER3 en dímeros inactivos HER1/HER2 y HER1/HER3 por el otro.

**ARTÍCULO 2.**

1. Los CTFs se generan mediante inicio alternativo de la traducción a partir de la metionina 611 y la metionina 687 situadas delante y detrás del dominio transmembrana de HER2 respectivamente.
2. Los CTFs son proteínas solubles que se localizan en el citoplasma y el núcleo tanto de células en cultivo como en biopsias de pacientes con cáncer de mama.
3. Los CTFs están fosforilados y tienen actividad quinasa importante para su localización subcelular.
4. La inyección subcutánea de células T47D que sobreexpresan establemente los CTFs en ratones atímicos inducen el crecimiento de tumores.
5. El tratamiento con Herceptin, un anticuerpo dirigido contra el ectodominio de HER2 no tiene ningún efecto en el crecimiento de los tumores que sobreexpresan CTFs, pero son sensibles al tratamiento con inhibidores de la quinasa de tirosinas de HER1.



*ABREVIATURAS*

---



<b>cDNA:</b>	Ácido desoxiribonucleico complementario
<b>ECD:</b>	Dominio extracelular
<b>EGF:</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EGFR:</b>	Receptor del EGF
<b>FGF-2:</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos-2
<b>FISH:</b>	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
<b>HB-EGF:</b>	Factor de crecimiento de unión a la haptarina
<b>HSSCN:</b>	Carcinoma escamoso de cabeza y cuello
<b>HRG:</b>	Heregulina
<b>ICD:</b>	Dominio intracelular
<b>IHQ:</b>	Inmunohistoquímica
<b>IMF:</b>	Inmunofluorescencia
<b>IRES:</b>	Sitio interno de entrada del ribosoma
<b>KDa:</b>	Kilo Daltons
<b>KO:</b>	“Knock out”
<b>NSCLC:</b>	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
<b>MAPK:</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos
<b>mRNA:</b>	RNA mensajero
<b>pb:</b>	Pares de bases
<b>PI3k:</b>	Fosfatidilinositol-3-quinasa
<b>RNA:</b>	Ácido ribonucleico
<b>STAT:</b>	Transductor de señal y activador de proteínas de transcripción
<b>TGF-<math>\alpha</math>:</b>	Factor de crecimiento transformante $\alpha$



## *BIBLIOGRAFÍA*

---





- Alaoui-Jamali, M. A.,** D. J. Song, et al. (2003). "Regulation of multiple tumor microenvironment markers by overexpression of single or paired combinations of ErbB receptors." *Cancer Res* 63(13): 3764-74.
- Alroy, I.,** L. Soussan, et al. (1999). "Neu differentiation factor stimulates phosphorylation and activation of the Sp1 transcription factor." *Mol Cell Biol* 19(3): 1961-72.
- Aroian, R. V.,** M. Koga, et al. (1990). "The *let-23* gene necessary for *Caenorhabditis elegans* vulval induction encodes a tyrosine kinase of the EGF receptor subfamily." *Nature* 348(6303): 693-9.
- Arribas, J.** and A. Borroto (2002). "Protein ectodomain shedding." *Chem Rev* 102(12): 4627-38.
- Arteaga, C. L.,** T. T. Ramsey, et al. (1997). "Unliganded epidermal growth factor receptor dimerization induced by direct interaction of quinazolines with the ATP binding site." *J Biol Chem* 272(37): 23247-54.
- Azios, N. G.,** F. J. Romero, et al. (2001). "Expression of *herstatin*, an autoinhibitor of HER-2/neu, inhibits transactivation of HER-3 by HER-2 and blocks EGF activation of the EGF receptor." *Oncogene* 20(37): 5199-209.
- Bacus, S. S.,** D. Chin, et al. (1996). "Type 1 receptor tyrosine kinases are differentially phosphorylated in mammary carcinoma and differentially associated with steroid receptors." *Am J Pathol* 148(2): 549-58.
- Barker, A. J.,** K. H. Gibson, et al. (2001). "Studies leading to the identification of ZD1839 (IRESSA): an orally active, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer." *Bioorg Med Chem Lett* 11(14): 1911-4.
- Bartlett, J. M.,** S. P. Langdon, et al. (1996). "The prognostic value of epidermal growth factor receptor mRNA expression in primary ovarian cancer." *Br J Cancer* 73(3): 301-6.
- Baselga, J.** (2001). "Is circulating HER-2 more than just a tumor marker?" *Clin Cancer Res* 7(9): 2605-7.
- Baselga, J.** (2002). "Targeting the epidermal growth factor receptor with tyrosine kinase inhibitors: small molecules, big hopes." *J Clin Oncol* 20(9): 2217-9.
- Baselga, J.,** J. Albanell, et al. (2001). "Mechanism of action of trastuzumab and scientific update." *Semin Oncol* 28(5 Suppl 16): 4-11.
- Baselga, J.** and C. L. Arteaga (2005). "Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer." *J Clin Oncol* 23(11): 2445-59.
- Batra, S. K.,** S. Castelino-Prabhu, et al. (1995). "Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene." *Cell Growth Differ* 6(10): 1251-9.
- Bei, R.,** G. Pompa, et al. (2001). "Co-localization of multiple ErbB receptors in stratified epithelium of oral squamous cell carcinoma." *J Pathol* 195(3): 343-8.
- Bieche, I.,** P. Onody, et al. (2003). "Prognostic value of ERBB family mRNA expression in breast carcinomas." *Int J Cancer* 106(5): 758-65.
- Bild, A. H.,** G. Yao, et al. (2006). "Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies." *Nature* 439(7074): 353-7.
- Biswas, D. K.,** A. P. Cruz, et al. (2000). "Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(15): 8542-7.
- Bonnal, S.,** C. Schaeffer, et al. (2003). "A single internal ribosome entry site containing a G quartet RNA structure drives fibroblast growth factor 2 gene expression at four alternative translation initiation codons." *J Biol Chem* 278(41): 39330-6.
- Bonneau, A. M.** and N. Sonenberg (1987). "Involvement of the 24-kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis." *J Biol Chem* 262(23): 11134-9.
- Brabender, J.,** K. D. Danenberg, et al. (2001). "Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer is correlated with survival." *Clin Cancer Res* 7(7): 1850-5.
- Brandt, R.,** R. Eisenbrandt, et al. (2000). "Mammary gland specific hEGF receptor transgene expression induces neoplasia and inhibits differentiation." *Oncogene* 19(17): 2129-37.
- Brandt-Rauf, P. W.** (1995). "The *c-erbB* transmembrane growth factor receptors as serum biomarkers in human cancer studies." *Mutat Res* 333(1-2): 203-8.
- Bryant, D. M.** and J. L. Stow (2005). "Nuclear translocation of cell-surface receptors: lessons from fibroblast growth factor." *Traffic* 6(10): 947-54.
- Burgess, A. W.,** H. S. Cho, et al. (2003). "An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors." *Mol Cell* 12(3): 541-52.
- Campiglio, M.,** A. Locatelli, et al. (2004). "Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in breast cancer cells by the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ('Iressa') is independent of EGFR expression level." *J Cell Physiol* 198(2): 259-68.
- Cao, H.,** Z. M. Lei, et al. (1995). "Functional nuclear epidermal growth factor receptors in human choriocarcinoma JEG-3 cells and normal human placenta." *Endocrinology* 136(7): 3163-72.
- Cappuzzo, F.,** F. R. Hirsch, et al. (2005). "Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer." *J Natl Cancer Inst* 97(9): 643-55.

- Cappuzzo, F.,** M. Varella-Garcia, et al. (2005). "Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positive non-small-cell lung cancer patients." *J Clin Oncol* 23(22): 5007-18.
- Carey, K. D.,** D. L. Dugger, et al. (2005). "ErbB2/Her2 ectodomain shedding is regulated by a membrane-associated metalloprotease." *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 46: 3695.
- Carney, W. P.,** R. Neumann, et al. (2003). "Potential clinical utility of serum HER-2/neu oncoprotein concentrations in patients with breast cancer." *Clin Chem* 49(10): 1579-98.
- Carpenter, G.** (2003). "Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases." *Curr Opin Cell Biol* 15(2): 143-8.
- Carter, P.,** L. Presta, et al. (1992). "Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10): 4285-9.
- Chen, Q. Q.,** X. Y. Chen, et al. (2005). "Identification of novel nuclear localization signal within the ErbB-2 protein." *Cell Res* 15(7): 504-10.
- Cho, H. S.** and D. J. Leahy (2002). "Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether." *Science* 297(5585): 1330-3.
- Cho, H. S.,** K. Mason, et al. (2003). "Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab." *Nature* 421(6924): 756-60.
- Christianson, T. A.,** J. K. Doherty, et al. (1998). "NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer." *Cancer Res* 58(22): 5123-9.
- Ciardiello, F.,** R. Caputo, et al. (2000). "Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor." *Clin Cancer Res* 6(5): 2053-63.
- Citri, A.,** K. B. Skaria, et al. (2003). "The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3." *Exp Cell Res* 284(1): 54-65.
- Codony-Servat, J.,** J. Albanell, et al. (1999). "Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells." *Cancer Res* 59(6): 1196-201.
- Cohen, B. D.,** P. A. Kiener, et al. (1996). "The relationship between human epidermal growth-like factor receptor expression and cellular transformation in NIH3T3 cells." *J Biol Chem* 271(48): 30897-903.
- Cohen, M. H.,** G. A. Williams, et al. (2003). "FDA drug approval summary: gefitinib (ZD1839) (Iressa) tablets." *Oncologist* 8(4): 303-6.
- Connolly, D. C.,** S. L. Toutenhoofd, et al. (1994). "Tyrosine kinase activity may be necessary but is not sufficient for c-erbB1-mediated tissue-specific tumorigenicity." *J Virol* 68(10): 6804-10.
- Cordero, J. B.,** M. Cozzolino, et al. (2002). "1,25-Dihydroxyvitamin D down-regulates cell membrane growth- and nuclear growth-promoting signals by the epidermal growth factor receptor." *J Biol Chem* 277(41): 38965-71.
- Craven, R. J.,** H. Lightfoot, et al. (2003). "A decade of tyrosine kinases: from gene discovery to therapeutics." *Surg Oncol* 12(1): 39-49.
- Crone, S. A.,** Y. Y. Zhao, et al. (2002). "ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy." *Nat Med* 8(5): 459-65.
- Cutry, A. F.,** A. J. Kinniburgh, et al. (1989). "Induction of c-fos and c-myc proto-oncogene expression by epidermal growth factor and transforming growth factor alpha is calcium-independent." *J Biol Chem* 264(33): 19700-5.
- Dankort, D.,** N. Jeyabalan, et al. (2001). "Multiple ErbB-2/Neu Phosphorylation Sites Mediate Transformation through Distinct Effector Proteins." *J Biol Chem* 276(42): 38921-8.
- Davis, C. G.** (1990). "The many faces of epidermal growth factor repeats." *New Biol* 2(5): 410-9.
- Di Fiore, P. P.,** J. H. Pierce, et al. (1987). "Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells." *Cell* 51(6): 1063-70.
- Dittmann, K.,** C. Mayer, et al. (2005). "Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase." *J Biol Chem* 280(35): 31182-9.
- Doherty, J. K.,** C. Bond, et al. (1999). "The HER-2/neu receptor tyrosine kinase gene encodes a secreted autoinhibitor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(19): 10869-74.
- Ekstrand, A. J.,** N. Sugawa, et al. (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 U S A* 89(10): 4309-13.
- Elenius, K.,** G. Corfas, et al. (1997). "A novel juxtamembrane domain isoform of HER4/ErbB4. Isoform-specific tissue distribution and differential processing in response to phorbol ester." *J Biol Chem* 272(42): 26761-8.
- Erickson, S. L.,** K. S. O'Shea, et al. (1997). "ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice." *Development* 124(24): 4999-5011.
- Espina, V.,** D. Geho, et al. (2005). "Pathology of the future: molecular profiling for targeted therapy." *Cancer Invest* 23(1): 36-46.
- Fan, H.,** C. W. Turck, et al. (2003). "Characterization of growth factor-induced serine phosphorylation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme and of an alternatively

- translated polypeptide." *J Biol Chem* 278(20): 18617-27.
- Ferguson, K. M.**, M. B. Berger, et al. (2003). "EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization." *Mol Cell* 11(2): 507-17.
- Ferguson, K. M.**, P. J. Darling, et al. (2000). "Extracellular domains drive homo- but not hetero-dimerization of erbB receptors." *Embo J* 19(17): 4632-43.
- Fowler, K. J.**, F. Walker, et al. (1995). "A mutation in the epidermal growth factor receptor in waved-2 mice has a profound effect on receptor biochemistry that results in impaired lactation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(5): 1465-9.
- Franklin, M. C.**, K. D. Carey, et al. (2004). "Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex." *Cancer Cell* 5(4): 317-28.
- Freeman, M.** (1998). "Complexity of EGF receptor signalling revealed in *Drosophila*." *Curr Opin Genet Dev* 8(4): 407-11.
- Fry, D. W.**, A. J. Bridges, et al. (1998). "Specific, irreversible inactivation of the epidermal growth factor receptor and erbB2, by a new class of tyrosine kinase inhibitor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(20): 12022-7.
- Fukuoka, M.**, S. Yano, et al. (2003). "Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]." *J Clin Oncol* 21(12): 2237-46.
- Furger, C.**, R. J. Fiddes, et al. (1998). "Granulosa cell tumors express erbB4 and are sensitive to the cytotoxic action of heregulin-beta2/PE40." *Cancer Res* 58(9): 1773-8.
- García de Palazzo, I. E.**, G. P. Adams, et al. (1993). "Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas." *Cancer Res* 53(14): 3217-20.
- Garrett, T. P.**, N. M. McKern, et al. (2003). "The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors." *Mol Cell* 11(2): 495-505.
- Garrett, T. P.**, N. M. McKern, et al. (2002). "Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha." *Cell* 110(6): 763-73.
- Gassmann, M.**, F. Casagrande, et al. (1995). "Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor." *Nature* 378(6555): 390-4.
- Gazit, A.**, P. Yaish, et al. (1989). "Tyrophostins I: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors." *J Med Chem* 32(10): 2344-52.
- Gilbertson, R. J.**, L. Bentley, et al. (2002). "ERBB receptor signaling promotes ependymoma cell proliferation and represents a potential novel therapeutic target for this disease." *Clin Cancer Res* 8(10): 3054-64.
- Gilbertson, R. J.**, R. H. Perry, et al. (1997). "Prognostic significance of HER2 and HER4 coexpression in childhood medulloblastoma." *Cancer Res* 57(15): 3272-80.
- Giri, D. K.**, M. Ali-Seyed, et al. (2005). "Endosomal transport of ErbB-2: mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor." *Mol Cell Biol* 25(24): 11005-18.
- Graber, H. U.**, H. Friess, et al. (1999). "ErbB-4 mRNA expression is decreased in non-metastatic pancreatic cancer." *Int J Cancer* 84(1): 24-7.
- Gullick, W. J.** (1990). "The role of the epidermal growth factor receptor and the c-erbB-2 protein in breast cancer." *Int J Cancer Suppl* 5: 55-61.
- Gullick, W. J.** (2003). "c-erbB-4/HER4: friend or foe?" *J Pathol* 200(3): 279-81.
- Guy, C. T.**, M. A. Webster, et al. (1992). "Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(22): 10578-82.
- Guy, P. M.**, J. V. Platko, et al. (1994). "Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(17): 8132-6.
- Gygi, S. P.**, Y. Rochon, et al. (1999). "Correlation between protein and mRNA abundance in yeast." *Mol Cell Biol* 19(3): 1720-30.
- Hanada, N.**, H. W. Lo, et al. (2006). "Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor." *Mol Carcinog* 45(1): 10-7.
- Haugen, D. R.**, L. A. Akslen, et al. (1996). "Expression of c-erbB-3 and c-erbB-4 proteins in papillary thyroid carcinomas." *Cancer Res* 56(6): 1184-8.
- Hellen, C. U.** and P. Sarnow (2001). "Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules." *Genes Dev* 15(13): 1593-612.
- Henderson, I. C.** and A. J. Patek (1998). "The relationship between prognostic and predictive factors in the management of breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* 52(1-3): 261-88.
- Herbst, R. S.**, M. Fukuoka, et al. (2004). "Gefitinib--a novel targeted approach to treating cancer." *Nat Rev Cancer* 4(12): 956-65.
- Herbst, R. S.**, M. Fukuoka, et al. (2004). "Timeline: Gefitinib - a novel targeted approach to treating cancer." *Nat Rev Cancer* 4(12): 956-65.
- Hirata, A.**, F. Hosoi, et al. (2005). "HER2 overexpression increases sensitivity to gefitinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, through inhibition of HER2/HER3 heterodimer formation in lung cancer cells." *Cancer Res* 65(10): 4253-60.

- Hirata, A.,** S. Ogawa, et al. (2002). "ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase." *Cancer Res* 62(9): 2554-60.
- Holbro, T.,** G. Civenni, et al. (2003). "The ErbB receptors and their role in cancer progression." *Exp Cell Res* 284(1): 99-110.
- Holbro, T.** and N. E. Hynes (2004). "ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 195-217.
- Holcik, M.** (2004). "Targeting translation for treatment of cancer--a novel role for IRES?" *Curr Cancer Drug Targets* 4(3): 299-311.
- Holt, S. J.,** P. Alexander, et al. (1994). "Epidermal growth factor induced tyrosine phosphorylation of nuclear proteins associated with translocation of epidermal growth factor receptor into the nucleus." *Biochem Pharmacol* 47(1): 117-26.
- Honegger, A. M.,** D. Szapary, et al. (1987). "A mutant epidermal growth factor receptor with defective protein tyrosine kinase is unable to stimulate proto-oncogene expression and DNA synthesis." *Mol Cell Biol* 7(12): 4568-71.
- Hsieh, E. T.,** F. A. Shepherd, et al. (2000). "Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-alpha is independent of ras mutations in lung adenocarcinoma." *Lung Cancer* 29(2): 151-7.
- Huang, H. S.,** M. Nagane, et al. (1997). "The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling." *J Biol Chem* 272(5): 2927-35.
- Hudelist, G.,** W. Kostler, et al. (2004). "Predicting the clinical course of breast cancer patients undergoing trastuzumab-based therapy: an outlook." *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 26(3): 201-10.
- Hudziak, R. M.,** G. D. Lewis, et al. (1989). "p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor." *Mol Cell Biol* 9(3): 1165-72.
- Hughes, D. P.,** D. G. Thomas, et al. (2004). "Cell surface expression of epidermal growth factor receptor and Her-2 with nuclear expression of Her-4 in primary osteosarcoma." *Cancer Res* 64(6): 2047-53.
- Humphrey, P. A.,** A. J. Wong, et al. (1990). "Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(11): 4207-11.
- Hynes, N. E.** and H. A. Lane (2005). "ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors." *Nat Rev Cancer* 5(5): 341-54.
- Jackson, J. G.,** J. I. Kreisberg, et al. (2000). "Phosphorylation and nuclear exclusion of the forkhead transcription factor FKHR after epidermal growth factor treatment in human breast cancer cells." *Oncogene* 19(40): 4574-81.
- Jans, D. A.** and G. Hassan (1998). "Nuclear targeting by growth factors, cytokines, and their receptors: a role in signaling?" *Bioessays* 20(5): 400-11.
- Jensen, O. N.** (2006). "Interpreting the protein language using proteomics." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(6): 391-403.
- Jhabvala-Romero, F.,** A. Evans, et al. (2003). "Herstatin inhibits heregulin-mediated breast cancer cell growth and overcomes tamoxifen resistance in breast cancer cells that overexpress HER-2." *Oncogene* 22(50): 8178-86.
- Johannes, G.,** M. S. Carter, et al. (1999). "Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23): 13118-23.
- Johannes, G.** and P. Sarnow (1998). "Cap-independent polysomal association of natural mRNAs encoding c-myc, BiP, and eIF4G conferred by internal ribosome entry sites." *Rna* 4(12): 1500-13.
- Jones, F. E.** and D. F. Stern (1999). "Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation." *Oncogene* 18(23): 3481-90.
- Jorissen, R. N.,** F. Walker, et al. (2003). "Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling." *Exp Cell Res* 284(1): 31-53.
- Junttila, T. T.,** M. Laato, et al. (2003). "Identification of patients with transitional cell carcinoma of the bladder overexpressing ErbB2, ErbB3, or specific ErbB4 isoforms: real-time reverse transcription-PCR analysis in estimation of ErbB receptor status from cancer patients." *Clin Cancer Res* 9(14): 5346-57.
- Junttila, T. T.,** M. Sundvall, et al. (2005). "Cleavable ErbB4 isoform in estrogen receptor-regulated growth of breast cancer cells." *Cancer Res* 65(4): 1384-93.
- Junttila, T. T.,** M. Sundvall, et al. (2000). "ErbB4 and its isoforms: selective regulation of growth factor responses by naturally occurring receptor variants." *Trends Cardiovasc Med* 10(7): 304-10.
- Justman, Q. A.** and G. M. Clinton (2002). "Herstatin, an autoinhibitor of the human epidermal growth factor receptor 2 tyrosine kinase, modulates epidermal growth factor signaling pathways resulting in growth arrest." *J Biol Chem* 277(23): 20618-24.
- Kainulainen, V.,** M. Sundvall, et al. (2000). "A natural ErbB4 isoform that does not activate phosphoinositide 3-kinase mediates proliferation

- but not survival or chemotaxis.* J Biol Chem 275(12): 8641-9.
- Kamio, T., K. Shigematsu, et al.** (1990). "Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptors in human adrenocortical carcinoma." Hum Pathol 21(3): 277-82.
- Khorana, A. A., C. K. Ryan, et al.** (2003). "Vascular endothelial growth factor, CD68, and epidermal growth factor receptor expression and survival in patients with Stage II and Stage III colon carcinoma: a role for the host response in prognosis." Cancer 97(4): 960-8.
- Klapper, L. N., S. Glathe, et al.** (1999). "The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors." Proc Natl Acad Sci U S A 96(9): 4995-5000.
- Klijn, J. G., P. M. Berns, et al.** (1992). "The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients." Endocr Rev 13(1): 3-17.
- Knowlden, J. M., J. M. Gee, et al.** (1998). "c-erbB3 and c-erbB4 expression is a feature of the endocrine responsive phenotype in clinical breast cancer." Oncogene 17(15): 1949-57.
- Kononen, J., L. Bubendorf, et al.** (1998). "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens." Nat Med 4(7): 844-7.
- Kopp, R., E. Rothbauer, et al.** (2003). "Clinical implications of the EGF receptor/ligand system for tumor progression and survival in gastrointestinal carcinomas: evidence for new therapeutic options." Recent Results Cancer Res 162: 115-32.
- Kraus, M. H., W. Issing, et al.** (1989). "Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors." Proc Natl Acad Sci U S A 86(23): 9193-7.
- Landau, M., S. J. Fleishman, et al.** (2004). "A putative mechanism for downregulation of the catalytic activity of the EGF receptor via direct contact between its kinase and C-terminal domains." Structure 12(12): 2265-75.
- Lauring, A. S. and J. Overbaugh** (2000). "Evidence that an IRES within the Notch2 coding region can direct expression of a nuclear form of the protein." Mol Cell 6(4): 939-45.
- Lee, H., R. W. Akita, et al.** (2001). "A naturally occurring secreted human ErbB3 receptor isoform inhibits heregulin-stimulated activation of ErbB2, ErbB3, and ErbB4." Cancer Res 61(11): 4467-73.
- Lee, H. J., K. M. Jung, et al.** (2002). "Presenilin-dependent gamma-secretase-like intramembrane cleavage of ErbB4." J Biol Chem 277(8): 6318-23.
- Lee, K. F., H. Simon, et al.** (1995). "Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development." Nature 378(6555): 394-8.
- Leitzel, K., Y. Teramoto, et al.** (1992). "Elevated soluble c-erbB-2 antigen levels in the serum and effusions of a proportion of breast cancer patients." J Clin Oncol 10(9): 1436-43.
- Lemoine, N. R., S. Jain, et al.** (1991). "Amplification and overexpression of the EGF receptor and c-erbB-2 proto-oncogenes in human stomach cancer." Br J Cancer 64(1): 79-83.
- Leu, M., E. Bellmunt, et al.** (2003). "ErbB2 regulates neuromuscular synapse formation and is essential for muscle spindle development." Development 130(11): 2291-301.
- Levitzki, A. and A. Gazit** (1995). "Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development." Science 267(5205): 1782-8.
- Lichtner, R. B., A. Menrad, et al.** (2001). "Signaling-inactive epidermal growth factor receptor/ligand complexes in intact carcinoma cells by quinazoline tyrosine kinase inhibitors." Cancer Res 61(15): 5790-5.
- Lin, S. Y., K. Makino, et al.** (2001). "Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor." Nat Cell Biol 3(9): 802-8.
- Lipponen, P. and M. Eskelinen** (1994). "Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis." Br J Cancer 69(6): 1120-5.
- Lipton, A., S. M. Ali, et al.** (2002). "Elevated serum Her-2/neu level predicts decreased response to hormone therapy in metastatic breast cancer." J Clin Oncol 20(6): 1467-72.
- Lipton, A., K. Leitzel, et al.** (2004). "Predicting response to herceptin therapy." Clin Cancer Res 10(5): 1559-60.
- Liu, P. C., X. Liu, et al.** (2006). "Identification of ADAM10 as a Major Source of HER2 Ectodomain Sheddase Activity in HER2 Overexpressing Breast Cancer Cells." Cancer Biol Ther 5(6).
- Liu, X., J. S. Fridman, et al.** (2006). "Selective Inhibition of ADAM Metalloproteases Blocks HER-2 Extracellular Domain (ECD) Cleavage and Potentiates the Anti-Tumor Effects of Trastuzumab." Cancer Biol Ther 5(6).
- Lo, H. W., S. C. Hsu, et al.** (2005). "Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway." Cancer Cell 7(6): 575-89.
- Lo, H. W., W. Xia, et al.** (2005). "Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer." Cancer Res 65(1): 338-48.
- Lodge, A. J., J. J. Anderson, et al.** (2003). "Type 1 growth factor receptor expression in node positive breast cancer: adverse prognostic significance of c-erbB-4." J Clin Pathol 56(4): 300-4.
- Luwor, R. B., T. G. Johns, et al.** (2001). "Monoclonal antibody 806 inhibits the growth of tumor xenografts expressing either the de2-7 or amplified epidermal growth factor receptor (EGFR)

- but not wild-type EGFR." *Cancer Res* 61(14): 5355-61.
- Lynch, T. J.**, D. W. Bell, et al. (2004). "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib." *N Engl J Med* 350(21): 2129-39.
- Lyne, J. C.**, M. F. Melhem, et al. (1997). "Tissue expression of neu differentiation factor/heregulin and its receptor complex in prostate cancer and its biologic effects on prostate cancer cells in vitro." *Cancer J Sci Am* 3(1): 21-30.
- Maatta, J. A.**, M. Sundvall, et al. (2006). "Proteolytic cleavage and phosphorylation of a tumor-associated ErbB4 isoform promote ligand-independent survival and cancer cell growth." *Mol Biol Cell* 17(1): 67-79.
- Maier, D.**, A. C. Nagel, et al. (2002). "Two isoforms of the Notch antagonist Hairless are produced by differential translation initiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24): 15480-5.
- Maihle, N. J.**, A. T. Baron, et al. (2002). "EGF/ErbB receptor family in ovarian cancer." *Cancer Treat Res* 107: 247-58.
- Marone, R.**, D. Hess, et al. (2004). "Meme mediates ErbB2-driven cell motility." *Nat Cell Biol* 6(6): 515-22.
- Marti, U.**, S. J. Burwen, et al. (1991). "Localization of epidermal growth factor receptor in hepatocyte nuclei." *Hepatology* 13(1): 15-20.
- Marti, U.**, C. Ruchti, et al. (2001). "Nuclear localization of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptors in human thyroid tissues." *Thyroid* 11(2): 137-45.
- Miettinen, P. J.**, J. E. Berger, et al. (1995). "Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor." *Nature* 376(6538): 337-41.
- Miller, V. A.**, M. G. Kris, et al. (2004). "Bronchioloalveolar pathologic subtype and smoking history predict sensitivity to gefitinib in advanced non-small-cell lung cancer." *J Clin Oncol* 22(6): 1103-9.
- Mirza, A. N.**, N. Q. Mirza, et al. (2002). "Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years." *Ann Surg* 235(1): 10-26.
- Mishima, K.**, T. G. Johns, et al. (2001). "Growth suppression of intracranial xenografted glioblastomas overexpressing mutant epidermal growth factor receptors by systemic administration of monoclonal antibody (mAb) 806, a novel monoclonal antibody directed to the receptor." *Cancer Res* 61(14): 5349-54.
- Moasser, M. M.**, A. Basso, et al. (2001). "The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ("Iressa") inhibits HER2-driven signaling and suppresses the growth of HER2-overexpressing tumor cells." *Cancer Res* 61(19): 7184-8.
- Molina, M. A.**, J. Codony-Servat, et al. (2001). "Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells." *Cancer Res* 61(12): 4744-9.
- Molina, M. A.**, R. Saez, et al. (2002). "NH(2)-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer." *Clin Cancer Res* 8(2): 347-53.
- Moscattello, D. K.**, M. Holgado-Madruga, et al. (1998). "Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a naturally occurring mutant epidermal growth factor receptor." *J Biol Chem* 273(1): 200-6.
- Moscattello, D. K.**, M. Holgado-Madruga, et al. (1995). "Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors." *Cancer Res* 55(23): 5536-9.
- Moulder, S. L.** and C. L. Arteaga (2003). "A Phase I/II Trial of trastuzumab and gefitinib in patients with Metastatic Breast Cancer that overexpresses HER2/neu (ErbB-2)." *Clin Breast Cancer* 4(2): 142-5.
- Moulder, S. L.**, F. M. Yakes, et al. (2001). "Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo." *Cancer Res* 61(24): 8887-95.
- Nagane, M.**, F. Coufal, et al. (1996). "A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis." *Cancer Res* 56(21): 5079-86.
- Nahta, R.**, D. Yu, et al. (2006). "Mechanisms of Disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer." *Nat Clin Pract Oncol* 3(5): 269-280.
- Neve, R. M.**, H. Sutterluty, et al. (2000). "Effects of oncogenic ErbB2 on G1 cell cycle regulators in breast tumour cells." *Oncogene* 19(13): 1647-56.
- Ni, C. Y.**, M. P. Murphy, et al. (2001). "gamma - Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase." *Science* 294(5549): 2179-81.
- Ni, C. Y.**, H. Yuan, et al. (2003). "Role of the ErbB-4 carboxyl terminus in gamma-secretase cleavage." *J Biol Chem* 278(7): 4561-5.
- Nishikawa, R.**, X. D. Ji, et al. (1994). "A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(16): 7727-31.
- Normanno, N.**, C. Bianco, et al. (2003). "Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment." *Endocr Relat Cancer* 10(1): 1-21.
- Normanno, N.**, M. Campiglio, et al. (2002). "Cooperative inhibitory effect of ZD1839 (Iressa) in combination with trastuzumab (Herceptin) on

- human breast cancer cell growth." *Ann Oncol* 13(1): 65-72.
- O'Hagan, R. C.** and J. A. Hassell (1998). "The PEA3 Ets transcription factor is a downstream target of the HER2/Neu receptor tyrosine kinase." *Oncogene* 16(3): 301-10.
- Offterdinger, M.**, C. Schofer, et al. (2002). "c-erbB-3: a nuclear protein in mammary epithelial cells." *J Cell Biol* 157(6): 929-39.
- Ogiso, H.**, R. Ishitani, et al. (2002). "Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains." *Cell* 110(6): 775-87.
- Olayioye, M. A.**, D. Graus-Porta, et al. (1998). "ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner." *Mol Cell Biol* 18(9): 5042-51.
- Olayioye, M. A.**, R. M. Neve, et al. (2000). "The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer." *Embo J* 19(13): 3159-67.
- Ono, M.**, A. Hirata, et al. (2004). "Sensitivity to gefitinib (Iressa, ZD1839) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with dependence on the epidermal growth factor (EGF) receptor/extracellular signal-regulated kinase 1/2 and EGF receptor/Akt pathway for proliferation." *Mol Cancer Ther* 3(4): 465-72.
- Paez, J. G.**, P. A. Janne, et al. (2004). "EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy." *Science* 304(5676): 1497-500.
- Paik, S.** and E. T. Liu (2000). "HER2 as a predictor of therapeutic response in breast cancer." *Breast Dis* 11: 91-102.
- Pain, V. M.** (1996). "Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells." *Eur J Biochem* 236(3): 747-71.
- Pao, W.**, V. Miller, et al. (2004). "EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(36): 13306-11.
- Pawlowski, V.**, F. Revillion, et al. (2000). "Prognostic value of the type I growth factor receptors in a large series of human primary breast cancers quantified with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay." *Clin Cancer Res* 6(11): 4217-25.
- Pedersen, M. W.**, M. Meltorn, et al. (2001). "The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy." *Ann Oncol* 12(6): 745-60.
- Peles, E.**, S. S. Bacus, et al. (1992). "Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand: a 44 kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells." *Cell* 69(1): 205-16.
- Penuel, E.**, R. W. Akita, et al. (2002). "Identification of a region within the ErbB2/HER2 intracellular domain that is necessary for ligand-independent association." *J Biol Chem* 277(32): 28468-73.
- Plowman, G. D.**, J. M. Culouscou, et al. (1993). "Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(5): 1746-50.
- Psyrrri, A.**, Z. Yu, et al. (2005). "Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis." *Clin Cancer Res* 11(16): 5856-62.
- Pupa, S. M.**, S. Menard, et al. (1993). "The extracellular domain of the c-erbB-2 oncoprotein is released from tumor cells by proteolytic cleavage." *Oncogene* 8(11): 2917-23.
- Qian, X.**, D. M. O'Rourke, et al. (1999). "Domain-specific interactions between the p185(neu) and epidermal growth factor receptor kinases determine differential signaling outcomes." *J Biol Chem* 274(2): 574-83.
- Quantin, B.** and R. Breathnach (1988). "Epidermal growth factor stimulates transcription of the c-jun proto-oncogene in rat fibroblasts." *Nature* 334(6182): 538-9.
- Rakowicz-Szulczynska, E. M.**, D. Otwiaska, et al. (1989). "Epidermal growth factor (EGF) and monoclonal antibody to cell surface EGF receptor bind to the same chromatin receptor." *Arch Biochem Biophys* 268(2): 456-64.
- Ravdin, P. M.** and G. C. Chamness (1995). "The c-erbB-2 proto-oncogene as a prognostic and predictive marker in breast cancer: a paradigm for the development of other macromolecular markers—a review." *Gene* 159(1): 19-27.
- Reilly, J. F.** and P. A. Maher (2001). "Importin beta-mediated nuclear import of fibroblast growth factor receptor: role in cell proliferation." *J Cell Biol* 152(6): 1307-12.
- Resnick, M. B.**, J. Routhier, et al. (2004). "Epidermal growth factor receptor, c-MET, beta-catenin, and p53 expression as prognostic indicators in stage II colon cancer: a tissue microarray study." *Clin Cancer Res* 10(9): 3069-75.
- Riese, D. J.**, 2nd and D. F. Stern (1998). "Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network." *Bioessays* 20(1): 41-8.
- Riethmacher, D.**, V. Brinkmann, et al. (1995). "A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(3): 855-9.
- Rio, C.**, J. D. Buxbaum, et al. (2000). "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4." *J Biol Chem* 275(14): 10379-87.
- Ross, J. S.** and J. A. Fletcher (1998). "The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy." *Oncologist* 3(4): 237-252.

- Ross, J. S.** and J. A. Fletcher (1998). "The *HER-2/neu* oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy." *Stem Cells* 16(6): 413-28.
- Rubin Grandis, J., M. F. Melhem, et al.** (1998). "Levels of TGF- $\alpha$  and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival." *J Natl Cancer Inst* 90(11): 824-32.
- Rubin Grandis, J., M. F. Melhem, et al.** (1996). "Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor- $\alpha$  and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck." *Cancer* 78(6): 1284-92.
- Rusch, V., D. Klimstra, et al.** (1997). "Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor  $\alpha$  is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression." *Clin Cancer Res* 3(4): 515-22.
- Rusnak, D. W., K. Affleck, et al.** (2001). "The characterization of novel, dual ErbB-2/EGFR, tyrosine kinase inhibitors: potential therapy for cancer." *Cancer Res* 61(19): 7196-203.
- Rusnak, D. W., K. Lackey, et al.** (2001). "The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo." *Mol Cancer Ther* 1(2): 85-94.
- Rutherford, P. A., D. Veale, et al.** (1992). "Mesangiocapillary glomerulonephritis as the presenting feature of cryptogenic organizing pneumonia." *Nephrol Dial Transplant* 7(10): 1043-6.
- Sachs, A. B.** (2000). "Cell cycle-dependent translation initiation: IRES elements prevail." *Cell* 101(3): 243-5.
- Saez, R., M. A. Molina, et al.** (2006). "p95HER-2 predicts worse outcome in patients with HER-2-positive breast cancer." *Clin Cancer Res* 12(2): 424-31.
- Salomon, D. S., R. Brandt, et al.** (1995). "Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies." *Crit Rev Oncol Hematol* 19(3): 183-232.
- Sartor, C. I., H. Zhou, et al.** (2001). "Her4 mediates ligand-dependent antiproliferative and differentiation responses in human breast cancer cells." *Mol Cell Biol* 21(13): 4265-75.
- Sauter, G., H. Moch, et al.** (1993). "Heterogeneity of *erbB-2* gene amplification in bladder cancer." *Cancer Res* 53(10 Suppl): 2199-203.
- Schechter, A. L., M. C. Hung, et al.** (1985). "The *neu* gene: an *erbB*-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor." *Science* 229(4717): 976-8.
- Schlessinger, J.** (2002). "Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor." *Cell* 110(6): 669-72.
- Schlessinger, J.** (2004). "Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors." *Science* 306(5701): 1506-7.
- Scott, G. K., R. Robles, et al.** (1993). "A truncated intracellular HER2/neu receptor produced by alternative RNA processing affects growth of human carcinoma cells." *Mol Cell Biol* 13(4): 2247-57.
- Shamieh, L. S., A. J. Evans, et al.** (2004). "Receptor binding specificities of Herstatin and its intron 8-encoded domain." *FEBS Lett* 568(1-3): 163-6.
- Shigematsu, H., L. Lin, et al.** (2005). "Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers." *J Natl Cancer Inst* 97(5): 339-46.
- Sibilia, M., J. P. Steinbach, et al.** (1998). "A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor." *Embo J* 17(3): 719-31.
- Sibilia, M. and E. F. Wagner** (1995). "Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor." *Science* 269(5221): 234-8.
- Slamon, D. J., G. M. Clark, et al.** (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the *HER-2/neu* oncogene." *Science* 235(4785): 177-82.
- Slamon, D. J., W. Godolphin, et al.** (1989). "Studies of the *HER-2/neu* proto-oncogene in human breast and ovarian cancer." *Science* 244(4905): 707-12.
- Sliwkowski, M. X., J. A. Lofgren, et al.** (1999). "Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin)." *Semin Oncol* 26(4 Suppl 12): 60-70.
- Spector, N. L., W. Xia, et al.** (2005). "Study of the biologic effects of lapatinib, a reversible inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, on tumor growth and survival pathways in patients with advanced malignancies." *J Clin Oncol* 23(11): 2502-12.
- Srinivasan, R., E. Benton, et al.** (1999). "Expression of the *c-erbB-3/HER-3* and *c-erbB-4/HER-4* growth factor receptors and their ligands, neuregulin-1  $\alpha$ , neuregulin-1  $\beta$ , and betacellulin, in normal endometrium and endometrial cancer." *Clin Cancer Res* 5(10): 2877-83.
- Srinivasan, R., C. E. Gillett, et al.** (2000). "Nuclear expression of the *c-erbB-4/HER-4* growth factor receptor in invasive breast cancers." *Cancer Res* 60(6): 1483-7.
- Srinivasan, R., R. Poulosom, et al.** (1998). "Expression of the *c-erbB-4/HER4* protein and mRNA in normal human fetal and adult tissues and in a survey of nine solid tumour types." *J Pathol* 185(3): 236-45.
- Stamos, J., M. X. Sliwkowski, et al.** (2002). "Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor." *J Biol Chem* 277(48): 46265-72.



- Stenman, G.**, J. Sandros, et al. (1991). "Expression of the ERBB2 protein in benign and malignant salivary gland tumors." *Genes Chromosomes Cancer* 3(2): 128-35.
- Stoneley, M.** and A. E. Willis (2004). "Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression." *Oncogene* 23(18): 3200-7.
- Sugawa, N.**, A. J. Ekstrand, et al. (1990). "Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(21): 8602-6.
- Suo, Z.**, B. Risberg, et al. (2002). "EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival." *J Pathol* 196(1): 17-25.
- Sweeney, C.**, C. Lai, et al. (2000). "Ligand discrimination in signaling through an ErbB4 receptor homodimer." *J Biol Chem* 275(26): 19803-7.
- Tang, C. K.**, X. Z. Concepcion, et al. (1999). "Ribozyme-mediated down-regulation of ErbB-4 in estrogen receptor-positive breast cancer cells inhibits proliferation both in vitro and in vivo." *Cancer Res* 59(20): 5315-22.
- Tang, C. K.**, X. Q. Gong, et al. (2000). "Epidermal growth factor receptor vIII enhances tumorigenicity in human breast cancer." *Cancer Res* 60(11): 3081-7.
- Tateishi, M.**, T. Ishida, et al. (1991). "Prognostic value of c-erbB-2 protein expression in human lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma." *Eur J Cancer* 27(11): 1372-5.
- Tervahauta, A.**, S. Syrjanen, et al. (1994). "Epidermal growth factor receptor, c-erbB-2 proto-oncogene and estrogen receptor expression in human papillomavirus lesions of the uterine cervix." *Int J Gynecol Pathol* 13(3): 234-40.
- Thomasson, M.**, H. Hedman, et al. (2004). "ErbB4 is downregulated in renal cell carcinoma--a quantitative RT-PCR and immunohisto-chemical analysis of the epidermal growth factor receptor family." *Acta Oncol* 43(5): 453-9.
- Threadgill, D. W.**, A. A. Dlugosz, et al. (1995). "Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype." *Science* 269(5221): 230-4.
- Touriol, C.**, S. Bornes, et al. (2003). "Generation of protein isoform diversity by alternative initiation of translation at non-AUG codons." *Biol Cell* 95(3-4): 169-78.
- Traxler, P.** (2003). "Tyrosine kinases as targets in cancer therapy - successes and failures." *Expert Opin Ther Targets* 7(2): 215-34.
- Tzahar, E.**, H. Waterman, et al. (1996). "A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor." *Mol Cell Biol* 16(10): 5276-87.
- Ullrich, A.**, L. Coussens, et al. (1984). "Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells." *Nature* 309(5967): 418-25.
- Umekita, Y.**, Y. Ohi, et al. (2000). "Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-alpha predicts worse prognosis in breast-cancer patients." *Int J Cancer* 89(6): 484-7.
- Vecchi, M.**, J. Baulida, et al. (1996). "Selective cleavage of the heregulin receptor ErbB-4 by protein kinase C activation." *J Biol Chem* 271(31): 18989-95.
- Vecchi, M.** and G. Carpenter (1997). "Constitutive proteolysis of the ErbB-4 receptor tyrosine kinase by a unique, sequential mechanism." *J Cell Biol* 139(4): 995-1003.
- Vidal, G. A.**, A. Naresh, et al. (2005). "Presenilin-dependent gamma-secretase processing regulates multiple ERBB4/HER4 activities." *J Biol Chem* 280(20): 19777-83.
- Volm, M.**, R. Koomagi, et al. (2002). "Expression profile of genes in non-small cell lung carcinomas from long-term surviving patients." *Clin Cancer Res* 8(6): 1843-8.
- Wakeling, A. E.**, A. J. Barker, et al. (1996). "Specific inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by 4-anilinoquinazolines." *Breast Cancer Res Treat* 38(1): 67-73.
- Wakeling, A. E.**, S. P. Guy, et al. (2002). "ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy." *Cancer Res* 62(20): 5749-54.
- Wang, S. C.**, H. C. Lien, et al. (2004). "Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2." *Cancer Cell* 6(3): 251-61.
- Ward, W. H.**, P. N. Cook, et al. (1994). "Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Investigation of catalytic mechanism, structure-based searching and discovery of a potent inhibitor." *Biochem Pharmacol* 48(4): 659-66.
- Warri, A. M.**, J. J. Isola, et al. (1996). "Anti-estrogen stimulation of ERBB2 ectodomain shedding from BT-474 human breast cancer cells with ERBB2 gene amplification." *Eur J Cancer* 32A(1): 134-40.
- Watanabe, K.**, O. Tachibana, et al. (1996). "Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas." *Brain Pathol* 6(3): 217-23; discussion 23-4.
- Wells, A.** and U. Marti (2002). "Signalling shortcuts: cell-surface receptors in the nucleus?" *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9): 697-702.
- Wikstrand, C. J.**, R. E. McLendon, et al. (1997). "Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII." *Cancer Res* 57(18): 4130-40.

- Wikstrand, C. J., C. J. Reist, et al.** (1998). "The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target." J Neurovirol 4(2): 148-58.
- Williams, C. C., J. G. Allison, et al.** (2004). "The ERBB4/HER4 receptor tyrosine kinase regulates gene expression by functioning as a STAT5A nuclear chaperone." J Cell Biol 167(3): 469-78.
- Witton, C. J., J. R. Reeves, et al.** (2003). "Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer." J Pathol 200(3): 290-7.
- Wong, A. J., J. M. Ruppert, et al.** (1992). "Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas." Proc Natl Acad Sci U S A 89(7): 2965-9.
- Xia, W., L. H. Liu, et al.** (2004). "Truncated ErbB2 receptor (p95ErbB2) is regulated by heregulin through heterodimer formation with ErbB3 yet remains sensitive to the dual EGFR/ErbB2 kinase inhibitor GW572016." Oncogene 23(3): 646-53.
- Xie, W., A. J. Paterson, et al.** (1997). "Targeted expression of a dominant negative epidermal growth factor receptor in the mammary gland of transgenic mice inhibits pubertal mammary duct development." Mol Endocrinol 11(12): 1766-81.
- Xie, Y. and M. C. Hung** (1994). "Nuclear localization of p185neu tyrosine kinase and its association with transcriptional transactivation." Biochem Biophys Res Commun 203(3): 1589-98.
- Yaffe, M. B.** (2002). "Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol 3(3): 177-86.
- Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski** (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol 2(2): 127-37.
- Yu, H. and R. Jove** (2004). "The STATs of cancer--new molecular targets come of age." Nat Rev Cancer 4(2): 97-105.
- Yuan, C. X., A. L. Lasut, et al.** (2003). "Purification of Her-2 extracellular domain and identification of its cleavage site." Protein Expr Purif 29(2): 217-22.
- Zhang, M., D. Ding, et al.** (2002). "Expression of heregulin and ErbB/Her receptors in adult chinchilla cochlear and vestibular sensory epithelium." Hear Res 169(1-2): 56-68.
- Zhang, X., J. Gureasko, et al.** (2006). "An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor." Cell 125(6): 1137-49.
- Zhou, B. P., M. C. Hu, et al.** (2000). "HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway." J Biol Chem 275(11): 8027-31.
- Zhou, W. and G. Carpenter** (2000). "Heregulin-dependent trafficking and cleavage of ErbB-4." J Biol Chem 275(44): 34737-43.

*ANEXO*

---

