



# El receptor del factor de crecimiento epidérmico

Paloma L. Palomo-Jiménez <sup>1</sup>.

Antonio Villalobo <sup>2</sup>.

Maria José Ruano Ramos <sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Universidad Autónoma de Madrid

<sup>2</sup>antonio.villalobo@iib.uam.es

<sup>3</sup>mjrmano@iib.uam.es

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

## RESUMEN

Los receptores ErbB forman parte de una amplia superfamilia de receptores que están localizados en la membrana plasmática y poseen actividad tirosina quinasa intrínseca. El receptor del factor de crecimiento epidérmico (ErbB1/HER1/EGFR) y los receptores análogos ErbB2/HER2/Neu, ErbB3/HER3 y ErbB4/HER4 forman parte de este grupo. Estos receptores comparten una extensa familia de ligandos y naturaleza polipeptídica. Una vez que los ligandos se unen a los receptores, éstos forman homodímeros o heterodímeros que se activan y autofosforilan. Los residuos de tirosina fosforilados en estos receptores sirven como centros de reclutamiento y anclaje de proteínas adaptadoras y transductoras que pueden también ser fosforiladas, siendo así capaces de iniciar múltiples rutas de señalización al interior celular que darán lugar, entre otros procesos, a la transcripción de diferentes genes implicados en proliferación, diferenciación y supervivencia celular, prevención o inducción de apoptosis y motilidad celular. En numerosos tumores humanos se han encontrado diferentes mutaciones y formas truncadas aberrantes de los receptores ErbB, así como amplificaciones génicas que resultan en la sobreexpresión de los mismos, lo que está asociado al aumento de la proliferación

celular y en general a una peor prognosis de la enfermedad. En esta revisión se describen brevemente algunos de los mecanismos de señalización y regulación del receptor del factor de crecimiento epidérmico, así como la implicación de este receptor en la proliferación de ciertas células cancerosas.

## INTRODUCCIÓN

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por *epidermal growth factor receptor*; también denominado ErbB1/HER1) pertenece a la superfamilia de receptores localizados en la membrana plasmática que presentan actividad tirosina quinasa intrínseca. En humanos, el gen que codifica el EGFR (*c-erbB1*) se encuentra en el brazo corto (región p13-p12) del cromosoma 7 (Tsui and Farrall, 1991). Este gen está compuesto por 28 exones que ocupan un segmento de 75 kb, apareciendo de forma aberrante o amplificado en muchos tumores malignos, como por ejemplo en gliomas y glioblastomas (Wong *et al.*, 1992; Ekstrand *et al.*, 1994), en diversos carcinomas (Merlino *et al.*, 1984; Ullrich *et al.*, 1984; Nishikawa *et al.*, 1994; Kim and Muller, 1999) y algunos sarcomas (Yamamoto *et al.*, 1983; Pelley *et al.*, 1989). Este gen codifica a una proteína precursora de 1210 aminoácidos que posee una corta secuencia líder hidrofóbica en su extremo N-terminal que es usada para su inserción en la membrana, siendo posteriormente eliminada por procesamiento proteolítico (Ullrich *et al.*, 1984). El receptor maduro es una glicoproteína integral de membrana de 170 kDa que está constituida por un dominio extracelular amino terminal, un único dominio transmembranal y un dominio citoplásmico carboxilo terminal en el que se localiza el sitio catalítico responsable de la actividad tirosina quinasa (Carpenter and Cohen, 1979; Carpenter, 1987; Hernández-Sotomayor and Carpenter, 1992; Wells, 1999).

Algo más de la mitad de la cadena polipeptídica del EGFR forma su dominio extracelular. Este dominio, que contiene múltiples residuos *N*-glicosilados ricos en manosa, presenta dos zonas en las que existen un gran número de residuos de cisteína, entre las que se encuentra el sitio de unión del ligando (Carpenter and Zendejui, 1986; Todderud and Carpenter, 1988; Lax *et al.*, 1988, 1989). Este sitio es específicamente reconocido por una familia de factores de crecimiento que poseen módulos estructurales semejantes al del factor de crecimiento epidérmico (EGF), su ligando prototipo. Las cadenas glicosílicas del receptor parecen estar implicadas en el correcto plegamiento del mismo y en su transporte a la superficie celular (Soderquist and Carpenter, 1984; Slieker and Lane, 1985; Lane *et al.*, 1985).

El dominio transmembranal, como otros segmentos proteicos helicoidales que atraviesan membranas biológicas, es rico en aminoácidos hidrofóbicos. Este dominio juega un papel fundamental en la transmisión de información a través de la membrana plasmática, ya que comunica el sitio de unión del ligando extracelular con el sitio catalítico tirosina quinasa intracelular (Yarden and Schlessinger, 1987; Schlessinger, 1988).

En el dominio citoplásmico del EGFR se encuentra localizado el sitio catalítico responsable de su actividad tirosina quinasa. Este sitio está altamente conservado entre los receptores tirosina quinasa y las diferentes tirosinas quinasas citoplásmicas que no son receptores (Hanks *et al.*, 1988). En este dominio se encuentra un residuo de lisina (Lys721), que está implicado en la unión del ATP al receptor (Russo *et al.*, 1985), y cinco residuos de tirosina (Tyr992, Tyr1068, Tyr1086, Tyr1148 y Tyr1173) en su extremo más distal, que son susceptibles de ser transfosforilados después de producirse la dimerización del receptor (Downward *et al.*, 1984; Margolis *et al.*, 1989; Walton *et al.*, 1990). Los residuos de fosfotirosina así generados sirven como sitios de reclutamiento y

anclaje de proteínas que contienen dominios SH2 (por *Src* *homology domain* 2) (Heldi, 1991; Koch *et al.*, 1991; Margolis, 1992) o dominios PTB (por *phospho-tyrosine-binding domains*) (van der Geer and Pawson, 1995) que inician múltiples vías de señalización intracelular (ver Fig. 1).

Adicionalmente, se ha demostrado que la tirosina quinasa citoplásmica Src fosforila al EGFR en varios residuos de tirosina diferentes (Tyr820, Tyr845, Tyr891 y Tyr1101) (Sato *et al.*, 1995; Stover *et al.*, 1995; Biscardi *et al.*, 1999; Tice *et al.*, 1999). Estos residuos de fosfotirosina podrían ser también reconocidos por proteínas adaptadoras y transductoras que poseen dominios SH2 o dominios PTB, lo que explicaría el aumento de la señal mitogénica mediada por EGF en células que sobreexpresan Src (Stover *et al.*, 1995; Tice *et al.*, 1999). La región citoplásmica del EGFR posee además diferentes residuos de serina y treonina con función reguladora que son susceptibles de ser fosforilados por proteínas quinasas exógenas, lo que suele producir la inhibición de la actividad tirosina quinasa del receptor, como veremos más adelante.

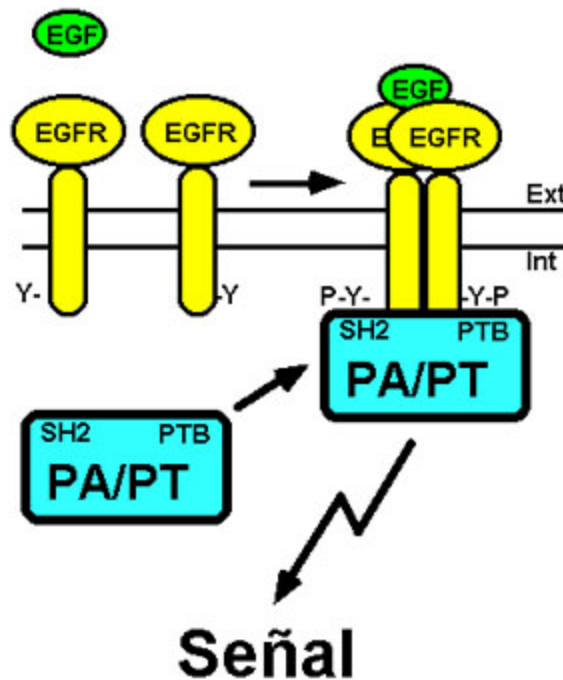


Figura 1. Activación del EGFR. La unión del ligando (*EGF*) a su receptor (*EGFR*) produce la dimerización de éste, la activación de su tirosina quinasa y la transfosforilación de residuos de tirosina (-Y-P). Proteínas adaptadoras (*PA*) o proteínas transductoras (*PT*) se unen a los residuos de fosfotirosina del receptor activado mediante sus dominios SH2 o PTB, transmitiendo señales al interior celular. Para más detalles ver texto.

---

#### Agradecimiento

La investigación realizada en el laboratorio de A.V. está financiada por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF99-0052), la Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid (08.5/0019/1997), la Agencia Española de Cooperación Internacional (99CN0011) y el Ministerio de Educación y Cultura (Programa de Cooperación Científica con Iberoamérica). Los autores presentan sus disculpas a los colegas cuyos trabajos originales no han sido citados por limitación de espacio.

## LA FAMILIA DE RECEPTORES ERBB Y SUS LIGANDOS

El EGFR es filogenéticamente muy antiguo, ya que existen homólogos de este receptor en diversos invertebrados, como por ejemplo el receptor Let-23 en el gusano nematodo *Caenorhabditis elegans* (Sternberg *et al.*, 1995), el receptor Der en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Casci and Freeman, 1999) e incluso se ha descrito un homólogo de este receptor en protozoos parásitos del género *Trypanosoma* (Hide *et al.*, 1989), aunque la existencia de este último está por confirmar (Borst and Fairlamb, 1998). Además, se han descrito en invertebrados varios ligandos de estos receptores (Muskavitch and Hoffman, 1990; Hill and Sternberg, 1992).

En vertebrados, la familia de receptores ErbB, de la que forma parte el paradigmático EGFR, está constituida además por otros tres receptores análogos identificados hasta la fecha, el ErbB2/HER2/Neu (que tiene una masa molecular de 185 kDa), el ErbB3/HER3 y el ErbB4/HER4 (ambos de 180 kDa) (Alroy and Yarden, 1997; Riese and Stern, 1998). El dominio extracelular de estos receptores está bastante conservado, como ocurre con el dominio proteína quinasa, salvo en el caso de ErbB3 que no posee actividad catalítica, aunque es capaz de unir ATP y transmitir señales mitogénicas mediante su heterodimerización con otros miembros de esta familia de receptores (Soltoff *et al.*, 1994; Guy *et al.*, 1994; Pinkas-Kramarski *et al.*, 1996).

Existe un gran número de ligandos para los receptores ErbB que poseen el llamado módulo semejante a EGF. Así, aparte del propio EGF, tenemos el factor de crecimiento transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ , por *transforming growth factor- $\alpha$* ), la anfirregulina (AR), el factor de crecimiento semejante a EGF que une heparina (HB-EGF, por *heparin-binding EGF-like growth factor*), la b-celulina (BTC) y la epirregulina (EPR) (Carpenter and Cohen, 1979, 1990; Massagué, 1990; Massagué and Pandiella, 1993; Groenen *et al.*, 1994; Toyoda *et al.*, 1995; Boonstra *et al.*, 1995). Adicionalmente, han sido descritas dos nuevas familias de ligandos de diversos receptores ErbB; estas son las neurregulinas-1 (NRGs-1), también llamadas factores de diferenciación Neu (NDFs, por *Neu differentiation factors*) o herregulinas, y las llamadas neurregulinas-2 (NRGs-2) (Chang *et al.*, 1997; Carraway *et al.*, 1997; Alroy and Yarden, 1997).

Los diversos ligandos de la familia de receptores ErbB poseen diferentes afinidades de unión a los receptores y cada uno de ellos presenta un patrón de expresión distinto, tanto durante el desarrollo embrionario como en los diversos tejidos del adulto, lo cual contribuye en parte a explicar la pleiotropía funcional de estos receptores. Además, las diversas combinaciones posibles de homodímeros y heterodímeros que forman estos receptores, generan una gran diversificación en la transmisión de señales. Esto es debido en parte a la aparición de baterías diferentes de residuos de tirosina transfosforiladas en los receptores, ya que éstas son específicamente reconocidas por proteínas adaptadoras o transductoras con dominios SH2 y/o dominios PTB diferentes (ver Alroy and Yarden, 1997).

Dentro de la familia de ligandos de los receptores ErbB se distinguen tres grupos funcionales en cuanto a sus capacidades de unir y activar a uno u otro receptor. En el primer grupo estarían incluidos el EGF, el TGF- $\alpha$  y la AR, los cuales son capaces de unir y activar a homodímeros del EGFR y a heterodímeros de éste con otros receptores de esta familia. En un segundo grupo incluiríamos a las NRGs-1 y las NRGs-2, las cuales se unen a homodímeros de ErbB3 o de ErbB4 y a heterodímeros de éstos con otros receptores de esta familia. En el tercer grupo estarían la BTC, la EPR y el HB-EGF, que pueden activar tanto a homodímeros de EGFR o de ErbB4, como a

heterodímeros de cada uno de ellos con otros miembros de la familia. El ErbB2/Neu es, sin embargo, un receptor huérfano que carece de ligando directo conocido, aunque es activado por EGF, TGF- $\alpha$ , BTC o NRGs cuando se heterodimeriza con el EGFR o ErbB4 (Alroy and Yarden, 1997; Riese and Stern, 1998).

Una de las características de los ligandos de los receptores ErbB es que son sintetizados como precursores de alto peso molecular que se anclan en la membrana plasmática exponiendo sus módulos semejante a EGF al medio extracelular. Estos precursores son posteriormente procesados proteolíticamente dando lugar a sus formas maduras solubles que son liberadas al medio, siendo así capaces de unirse a receptores de la propia célula que lo sintetiza o de células próximas, dando lugar a activaciones autocrina y paracrina, respectivamente. Sin embargo, es importante resaltar que los precursores unidos a la membrana plasmática pueden ser también funcionales, ya que en ciertos casos son capaces de unirse a receptores ErbB de células adyacentes, por lo que estarían implicados en señalización yuxtacrina (Massagué, 1990; Massagué and Pandiella, 1993) (ver *Fig. 2*).

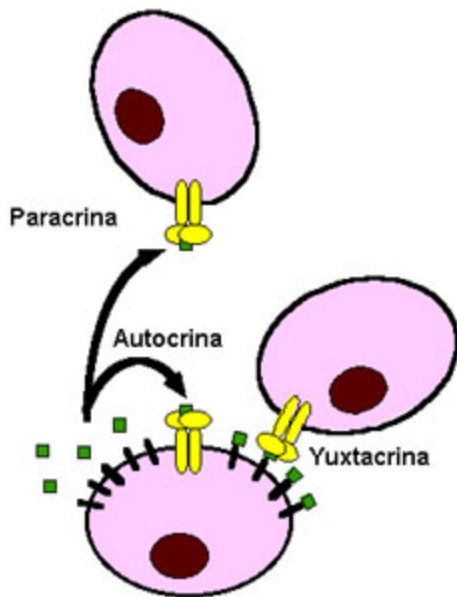


Figura 2. Diferentes modos de acción de los ligandos de receptores ErbB. Los precursores de los ligandos anclados a la membrana plasmática (*cuadrados con segmentos*) son procesados proteolíticamente generando ligandos maduros (*cuadrados*). Los ligandos maduros son capaces de interaccionar con receptores ErbB (*dímeros en forma de T*) localizados en la misma célula (*activación autocrina*) o en células próximas (*activación paracrina*), mientras que los precursores unidos a la membrana plasmática pueden interaccionar con receptores localizados en células adyacentes (*activación yuxtacrina*). Para más detalles ver texto.

El EGF fue el primer factor de crecimiento que se describió hace ya casi cuatro décadas. Éste es un polipéptido no glicosilado de 53 aminoácidos que puede aislarse en grandes cantidades de glándulas salivares submaxilares hipertróficas del ratón. El EGF se encuentra también en muchos fluidos biológicos, especialmente en la leche y en la orina de hembras gestantes (ver Carpenter and Cohen, 1979, 1990; Boonstra *et al.*, 1995). En humanos, el gen que lo codifica se encuentra localizado en el cromosoma 4. Este gen está constituido por 24 exones separados por grandes regiones no codificantes, siendo su transcrito primario de aproximadamente 110 kb. Este



transcrito es procesado posteriormente dando lugar a un ARNm de 4,8 kb que es traslocado fuera del núcleo y codifica a un precursor de más de 1200 aminoácidos, el preproEGF. El precursor contiene una región hidrofóbica que le permite atravesar la membrana plasmática y nueve módulos extracelulares semejantes a EGF. El procesamiento proteolítico secuencial de este precursor da lugar a la formación del EGF maduro (Gray *et al.*, 1983; Rall *et al.*, 1985; Bell *et al.*, 1986; Massagué and Pandiella, 1993; Boonstra *et al.*, 1995). La cadena polipeptídica del EGF mantiene su estructura terciaria fundamentalmente mediante tres enlaces disulfuro. Estos enlaces, que son esenciales para su actividad biológica, se encuentran conservados en otros polipéptidos de esta familia de factores de crecimiento (Taylor *et al.*, 1972; Boonstra *et al.*, 1995).

El TGF- $\alpha$  es un potente factor mitogénico, e importante ligando del EGFR, que está constituido por una cadena polipeptídica de 50 aminoácidos y se genera por procesamiento proteolítico de un precursor anclado a la membrana plasmática de 160 aminoácidos. Este factor de crecimiento parece tener un papel predominante tanto en embriogénesis como en angiogénesis, sobreexpresándose además en muchos tumores de origen ectodérmico (Massagué, 1990; Massagué and Pandiella, 1993).

Otros ligandos fisiológicos del EGFR como la AR y el HB-EGF, así como el factor de crecimiento derivado del virus de la vacinia (VGF, por *vaccinia virus growth factor*), codificado por este virus y que se expresa en células infectadas por el mismo, también se sintetizan como precursores anclados a la membrana plasmática que contienen módulos extracelulares semejante a EGF. Estos precursores son también procesados proteolíticamente para dar sus formas solubles (Massagué and Pandiella, 1993).

Las NRGs-1 se expresan predominantemente en órganos parenquimales y en el sistema nervioso central y periférico del embrión. Las diferentes isoformas de NRGs-1 son productos del procesamiento alternativo de un solo gen y son también sintetizadas como precursores transmembranales que son posteriormente proteolizados generando sus formas maduras. Estos precursores presentan en el dominio extracelular un módulo semejante a EGF y otros dominios que varían en las diversas isoformas (Peles and Yarden, 1993; Carraway and Burden, 1995; Alroy and Yarden, 1997). El gen de la NRG-2 da lugar, por procesamiento alternativo del módulo semejante a EGF, a dos isoformas: la NRG-2a y la NRG-2b. Se ha demostrado que las NRGs-2 se expresan de forma mayoritaria en el cerebelo, siendo su patrón de expresión diferente al de las NRGs-1. Además, las familias de las NRGs-1 y NRGs-2 median respuestas fisiológicas distintas en las células donde actúan (Carraway *et al.*, 1997), siendo la NRG-2b particularmente activa en aquellas células que expresan ErbB3 y/o ErbB4 (Chang *et al.*, 1997).

## RUTAS DE SEÑALIZACIÓN MEDIADAS POR EL EGFR

El EGFR es capaz de transmitir una gran variedad de señales que pueden generar respuestas celulares tan dispares como pueden ser mitogénesis, supervivencia celular, diferenciación, prevención o inducción de apoptosis e incluso migración celular. Esta variedad de respuestas ante un mismo estímulo puede depender del tipo celular y más genéricamente de las diversas condiciones fisiológicas a las cuales estén sometidas las células. Así, en cultivos celulares estas respuestas pueden depender de la densidad celular de los cultivos, del tipo de matriz extracelular a la que estén adheridas las células o de la presencia en el medio de otros factores de crecimiento u hormonas.

Cuando el ligando extracelular se une al EGFR se produce la dimerización de éste, lo que da lugar a la activación de su tirosina quinasa y la transfosforilación de los residuos de tirosina de su extremo C-terminal (Schlessinger, 1988; Ullrich and Schlessinger, 1990; Weiss and Schlessinger, 1998). Como se comentó anteriormente, los residuos de fosfotirosina del receptor activado son reconocidos por proteínas que poseen dominios SH2 (Heldi, 1991; Koch *et al.*, 1991; Margolis, 1992) o dominios PTB (van der Geer and Pawson, 1995). Estas proteínas pueden ser de dos tipos: proteínas adaptadoras que pueden reclutar a otras proteínas transductoras, o bien factores o enzimas directamente transductores/as que tras unirse al receptor son fosforilados por éste, pasando de un estado inactivo a otro activo. Por lo tanto, mediante estos reclutamientos y/o fosforilaciones se producen cambios conformacionales y/o cambios en la localización intracelular de estas proteínas señalizadoras, siendo así capaces éstas de transmitir sus mensajes a otros componentes de las diversas rutas intracelulares de transducción de señales (ver Fig. 1).

Dentro del amplio grupo de proteínas adaptadoras, mencionaremos como ejemplos a tres de gran importancia: la proteína Grb2 (por *growth factor receptor-bound protein 2*), envuelta en la activación de la proteína G monomérica Ras y la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, por *mitogen-activated protein kinases*); la proteína Grb7 (por *growth factor receptor-bound protein 7*); y la proteína Shc (por *SH2 domain-containing protein*), que actúa como un sistema auxiliar de señalización alternativo pudiendo sustituir a elementos funcionales del propio receptor.

La ruta de señalización mejor conocida en diversos organismos e iniciada por el EGFR activado es la vía de las MAPKs (Cobb, 1999). Ésta se inicia por la proteína adaptadora Grb2 que posee un dominio SH2, con el que interacciona con los residuos de fosfotirosina del receptor, y dos dominios SH3 (por *Src homology domain 3*), con los que interacciona con factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs, por *guanine nucleotide exchange factors*) tales como Sos1/2 (por *Son of sevenless 1 y 2*). Así, tras la formación del complejo Grb2/Sos, éste se trasloca a la membrana plasmática estimulando el intercambio de nucleótidos en Ras, transformando Ras-GDP (forma inactiva) en Ras-GTP (forma activa) (Lowenstein *et al.*, 1992; Rozakis-Adcock *et al.*, 1993) (ver Fig. 3). El Ras activo es capaz de interaccionar y activar a las serina/treonina quinasas Raf-1, A-Raf y B-Raf (o más genéricamente denominadas MAPKKKs, por *mitogen-activated protein kinase kinase kinases*) (Wood *et al.*, 1992). Estas últimas a su vez fosforilan a las tirosina/treonina quinasas duales MEK1/2 (del acrónimo *MAP/ERK kinases 1 y 2*, también denominadas MAPKKs, por *mitogen-activated protein kinase kinases*), y éstas finalmente fosforilan a las serina/treonina quinasas ERK1/2 (por *extracellular-regulated kinases 1 y 2*, también denominadas MAPKs). Una vez que las ERK1/2 son activadas, éstas pueden fosforilar a diferentes proteínas dianas localizadas en la membrana plasmática y en el citoplasma, dando lugar a la activación de otras vías de señalización o traslocarse al núcleo y fosforilar diversos factores de transcripción como son, entre otros, c-Myc, c-Jun, c-Fos, Elk-1 y p62TCF, produciendo así la activación o la represión transcripcional de determinados genes (Davis, 1993) (ver Fig. 4). La activación de la vía Ras/MAPK parece ser imprescindible para la proliferación celular mediada por EGF, pero no parece ser esencial para la supervivencia celular, ya que este proceso está mediado por vías independientes de Ras (Walker *et al.*, 1998). Por otro lado, líneas celulares que expresan EGFR mutados que carecen de actividad tirosina quinasa, aunque presentan ciertas alteraciones en la transmisión de señales, sí median la activación de la vía de las MAPKs, lo que implica que mecanismos alternativos son operativos en dichas células (Campos-González and Glenney, 1992).

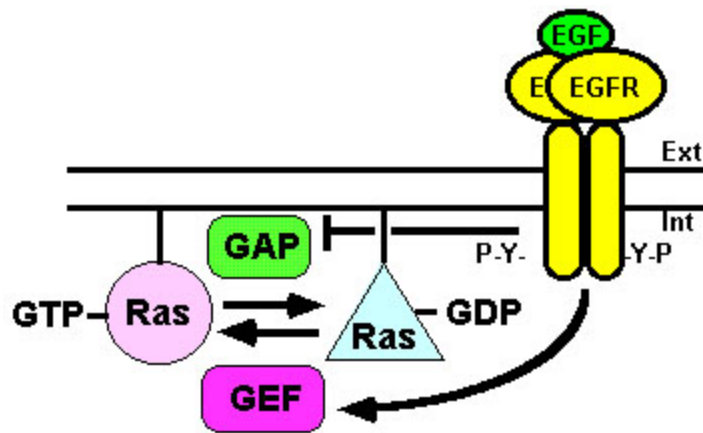


Figura 3. Regulación del ciclo de Ras por el EGFR. El EGFR regula el ciclo de la proteína Ras facilitando la formación de su forma activa (*Ras-GTP*, círculo) mediante la activación del factor intercambiador de nucleótidos de guanina (*GEF*) y secuestrando la forma fosforilada de la proteína activadora de la GTPasa de Ras (*GAP*) que la transformaría en su forma inactiva (*Ras-GDP*, triángulo). Para más detalles ver texto.

La proteína Grb7 contiene un dominio SH2 y pertenece a una nueva familia de proteínas adaptadoras de diversos receptores tirosina quinasa. Esta proteína se asocia a los residuos de fosfotirosina del EGFR activado y reconoce además las fosfotirosinas de los receptores homólogos ErbB2/Neu, ErbB3 y ErbB4, y las de la proteína adaptadora Shc fosforilada. Aunque las funciones de Grb7 aún no son muy bien conocidas, es indudable que juega un papel muy importante en la transducción de señales mediadas por los receptores ErbB. Así, es frecuente observar la sobreexpresión de esta proteína adaptadora junto con la de algunos de estos receptores, particularmente de ErbB2/Neu, en células de cáncer de mama (Margolis *et al.*, 1992; Stein *et al.*, 1994; Fiddes *et al.*, 1998; Daly, 1998).

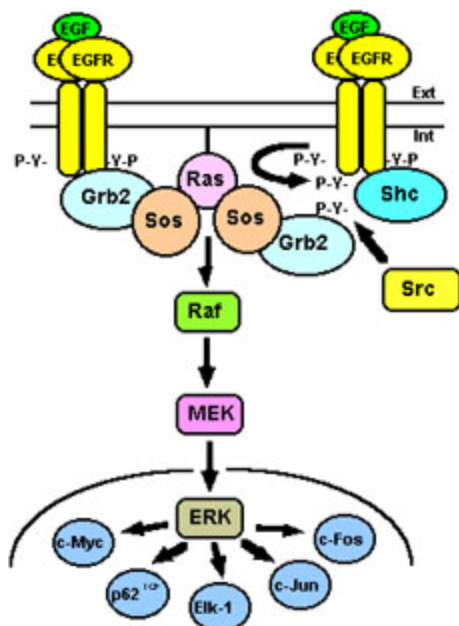


Figura 4. Activación alternativa de la vía de la MAPK. La activación de la vía Ras/MAPK se inicia por el complejo Grb2/Sos que es reclutado por el EGFR transfosforilado (*izquierda*) o por la proteína adaptadora Shc fosforilada previamente, bien por el propio EGFR o por la tirosina quinasa Src (*derecha*). El resultado final es la fosforilación de múltiples factores de transcripción



en el núcleo. Para más detalles ver texto.

---

La proteína adaptadora Shc juega un papel muy importante en la transducción de señales mediadas por el EGFR. Por un lado, esta proteína es reclutada, mediante su único dominio SH2, por los residuos de fosfotirosina del receptor activado, y por otro, también puede ser fosforilada por el receptor u otras tirosinas quinasas auxiliares, como por ejemplo Src, generando así residuos de tirosina fosforilados en la misma (Pelicci *et al.*, 1992; Ruff-Jamison *et al.*, 1993). Los residuos de tirosina fosforilados en Shc pueden a su vez servir como puntos de anclaje de proteínas adaptadoras, como el propio complejo Grb2/Sos, que activaría a Ras y posteriormente a la vía de las MAPKs (ver *Fig. 4*). Por lo tanto, células que expresan EGFR mutados que carecen de las tirosinas de su extremo C-terminal susceptibles de ser transfosforiladas, son capaces sin embargo de señalizar a través de éstos, debido a que los residuos de fosfotirosina de Shc actúan como sustitutos de los propios residuos de fosfotirosina del receptor (Li *et al.*, 1994).

En el grupo de factores o enzimas transductores/as de la señal del EGFR mencionaremos a las proteínas inactivadoras de Ras denominadas GAPs (por *GTPase-activating proteins*), la fosfolipasa Cg (PLCg, por *phospholipase Cg*), la fosfolipasa A2 (PLA2, por *phospholipase A2*) y la fosfatidilinositol-3 quinasa de clase I (PI3K, por *phosphatidylinositol-3 kinase*).

La regulación del ciclo de intercambio de nucleótidos en Ras mediado por el EGFR, en el que participan las proteínas GEFs mencionadas anteriormente, que transforman el Ras-GDP (inactivo) en Ras-GTP (activo), se completa con la acción de las proteínas GAPs. Éstas incrementan la actividad GTPasa intrínseca de Ras, transformando de nuevo el Ras-GTP (activo) en Ras-GDP (inactivo) (ver *Fig. 3*). La proteína p120-GAP contiene dos dominios SH2 con los que interacciona con los residuos de fosfotirosina del EGFR activado, lo que induce la fosforilación de esta proteína moduladora (Anderson *et al.*, 1990; Liu and Pawson, 1991). Sin embargo, esta fosforilación no altera su acción sobre la actividad GTPasa intrínseca de Ras. No obstante, la p120-GAP fosforilada se asocia firmemente al EGFR, a su homólogo ErbB2/Neu o a otras proteínas (Serth *et al.*, 1992; Auricchio *et al.*, 1994), por lo que esta fosforilación tiene el efecto de disminuir la disponibilidad de p120-GAP para inactivar a Ras. Por lo tanto, este mecanismo de secuestro cooperaría con la activación de Ras ejercida por las proteínas GEFs activadas a su vez por el EGFR (ver *Fig. 3*).

La PLCg tras interaccionar con las fosfotirosinas del EGFR activado a través de sus dos dominios SH2 es fosforilada por el receptor. Este proceso da lugar a la activación de esta enzima, la cual cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2, por *phosphatidyl 4,5-bisphosphate*) generando inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3, por *inositol 1,4,5-trisphosphate*) y 1,2-diacilglicerol (DAG) (Margolis *et al.*, 1989; Nishibe *et al.*, 1990; Rhee and Choi, 1992; Toker, 1998). Tanto el IP3 como el DAG son potentes segundos mensajeros que están implicados en la activación de ciertas isoformas de la proteína quinasa C (PKC, por *protein kinase C*), bien directamente como lo hace el DAG, o bien aumentando transitoriamente la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico como lo hace el IP3, ya que éste es un efector de canales de calcio localizados en la membrana del retículo endo/sarcoplásmico (Hughes *et al.*, 1991; Mikoshiba, 1993; Villalobo *et al.*, 2000) (ver *Fig. 5*). Aunque receptores mutados que han perdido sus tirosinas transfosforilables son capaces de fosforilar a la PLCg, sin embargo, no son capaces de producir la activación de la enzima *in vivo*, lo cual sugiere que para transmitir la señal es necesario, además de la fosforilación de ésta, interacciones proteína-proteína (Vega *et al.*, 1992). La activación de la PLCg por el receptor atenúa la señal

mitogénica, ya que el DAG activa a la PKC y ésta retroinhibe la actividad tirosina quinasa del receptor como veremos más adelante. Por otro lado, la motilidad celular inducida por el EGF parece ser un proceso mutuamente excluyente con la proliferación celular (Chen *et al.*, 1996).

Otra fosfolipasa que resulta fosforilada tras la activación del EGFR es la PLA<sub>2</sub>. En este caso, sin embargo, esta fosforilación es indirecta ya que tiene lugar en residuos de serina, pudiendo estar mediada por la PKC. Esta fosfolipasa también participa en la generación de la señal del calcio tras la estimulación de las células por EGF, ya que hidroliza ciertos fosfolípidos (FL) de la membrana plasmática liberando ácido araquidónico (AA), que es transformado, a través de la vía de la 5-lipoxigenasa, en leucotrieno C<sub>4</sub> (LC<sub>4</sub>). Este último es un potente efector que abre canales de Ca<sup>2+</sup> presentes en la membrana plasmática, contribuyendo así al aumento transitorio de la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico mediado por el receptor (Peppelenbosch *et al.*, 1992; Schalkwijk *et al.*, 1995; Villalobo *et al.*, 2000) (ver Fig. 5).

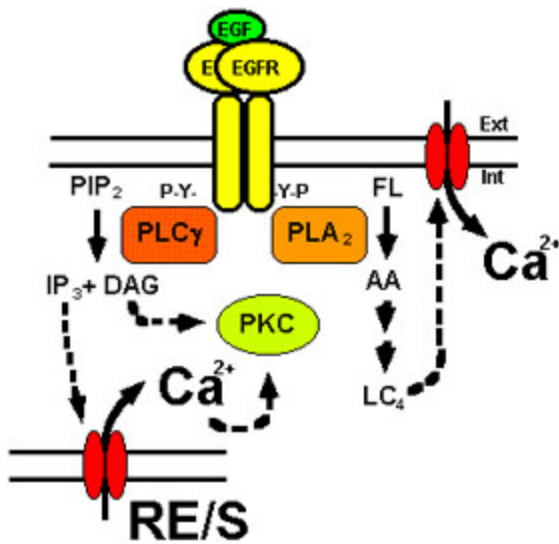


Figura 5. La señal del Ca<sup>2+</sup> generada por el EGFR. La activación del EGFR genera un incremento transitorio en la concentración de Ca<sup>2+</sup> libre en el citosol debido a la apertura de canales de Ca<sup>2+</sup> localizados en el retículo endo/sarcoplásmico (RE/S) y en la membrana plasmática. Los mediadores de dicho proceso son diversos mensajeros de naturaleza lipídica (IP<sub>3</sub> y LC<sub>4</sub>) sintetizados tras la activación de la PLC $\gamma$  y la PLA<sub>2</sub>. Las concentraciones basales de Ca<sup>2+</sup> se recuperan posteriormente mediante su exclusión del citosol por diversos sistemas de transporte (*no mostrados*). La acción ejercida por los mensajeros está representada por flechas discontinuas. Para más detalles ver texto.

Aunque la subunidad adaptadora/reguladora p85 de la PI3K de clase I contiene dominios SH2, existe controversia sobre si estos dominios son capaces o no de reconocer los residuos de fosfotirosina del EGFR activado, aunque sí parece reconocer los residuos de fosfotirosina presentes en ErbB3 (Hu *et al.*, 1992; Soltoff *et al.*, 1994). Así, sin excluir que la PI3K pueda interactuar directamente con el EGFR, es posible que esta interacción se realice con una proteína adaptadora asociada a éste o bien con heterodímeros EGFR/ErbB3 (Earp *et al.*, 1995), ya que el ErbB3 carece de actividad tirosina quinasa intrínseca, como hemos visto anteriormente, y por lo tanto sus homodímeros no son capaces de transfosforilarse (Guy *et al.*, 1994). Una vez que la subunidad p85 de la enzima interacciona con el receptor, su subunidad catalítica p110 es

activada y así es capaz de catalizar la fosforilación de la posición 3'-OH del PIP<sub>2</sub>, dando como producto de esta reacción fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP<sub>3</sub>, por *phosphatidyl inositol 3,4,5-trisphosphate*) (Hu *et al.*, 1992). PIP<sub>3</sub> es un potente efector que se une a proteínas que contienen dominios PH (por *pleckstrin homology domains*), como es el caso de la serina/treonina quinasa PKB/Akt (PKB, por *protein kinase B*; y Akt, por ser homóloga de la oncoproteína v-Akt). La PKB/Akt activada fosforila a multitud de proteínas sustratos generando, entre otras, señales de supervivencia celular (Vanhaesebroeck and Waterfield, 1999). La activación de la vía PI3K-PKB/Akt también puede ocurrir por la interacción directa de Ras con la subunidad catalítica de la PI3K (Vojtek and Der, 1998), lo que previene la aparición de apoptosis (Downward, 1998). Esta vía también disminuye los niveles de expresión de la proteína supresora de la proliferación celular p53, sin que varíen los de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL o los de la proteína pro-apoptótica Bax (Sabbatini and McCormick, 1999). Adicionalmente, la ruta de la PI3K-PKB/Akt induce la fosforilación de la procaspasa 9, lo que previene la formación de su forma madura activa que es fundamental en la muerte celular por apoptosis (Cardone *et al.*, 1998) (ver Fig. 6).

Además de activar la vía ERK/MAPK, el EGFR es capaz de activar otras vías de MAPKs alternativas, como es el caso de la vía de la proteína quinasa que fosforila al factor de transcripción c-Jun (JNK, por *c-Jun N-terminal kinase*; también denominada SAPK, por *stress-activated protein kinase*). La activación de la ruta de la JNK/SAPK iniciada por el EGFR es mediada por Ras y por la PI3K (Minden *et al.*, 1995; Coso *et al.*, 1995; Logan *et al.*, 1997) (ver Fig. 6). Una vez que el EGFR es activado, la proteína adaptadora Shc es fosforilada por éste, lo que permite la unión del complejo Grb2/Sos a la misma, produciéndose por tanto otra forma alternativa de activar a Ras. La interacción del EGFR con Shc parece ser imprescindible para la activación de la JNK/SAPK, mientras que no parece serlo en el caso de la activación de la vía de la ERK/MAPK, en la que el EGFR interaccionaría directamente con Grb2 (Hashimoto *et al.*, 1999).

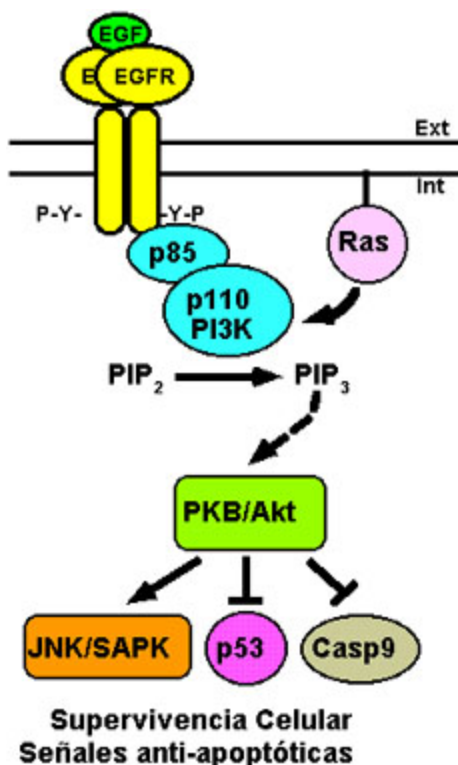


Figura 6. Vías de señalización del EGFR por el sistema PI3K-PKB/Akt. La activación de la PI3K por el EGFR y por Ras da lugar a la formación de PIP<sub>3</sub> que se une a la quinasa PKB/Akt activándola.

Esta vía estimula a la JNK/SAPK, inhibe la expresión de p53 y previene la liberación de la forma activa de la caspasa 9 (*Casp9*), lo que da lugar a la generación de señales de supervivencia celular y prevención de apoptosis. Para más detalles ver texto.

---

Como hemos mencionado anteriormente, en general la activación del EGFR lleva a las células a un estado de proliferación o de supervivencia celular. En determinadas ocasiones, sin embargo, la activación del EGFR puede inducir en ciertas células tumorales una parada de la proliferación celular y la inducción de apoptosis. Estos efectos parecen estar mediados por las proteínas reguladoras de la transcripción denominadas STATs (por *signal transducers and activators of transcription*) que aumentan la expresión del inhibidor del ciclo celular p21WAF1/CIP1, quedando así bloqueado el mismo, y de la caspasa 1, proteasa implicada en apoptosis (Chin *et al.*, 1996, 1997) (ver Fig. 7).

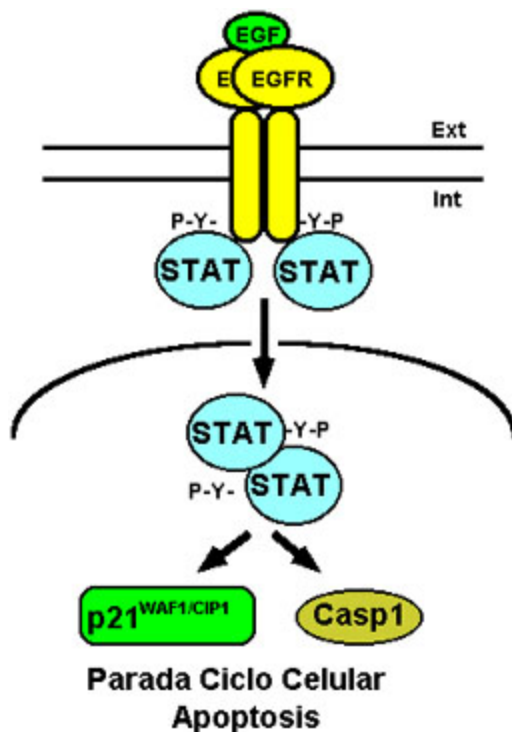


Figura 7. Inducción de apoptosis mediada por el EGFR. La fosforilación de STAT por el EGFR da lugar a la formación de dímeros fosforilados que se traslocan al núcleo e incrementan la expresión del inhibidor del ciclo celular p21WAF1/CIP1 y de la caspasa 1 (*Casp1*). Para más detalles ver texto.

## REGULACIÓN DEL EGFR

Una vez que las diversas señales han sido transmitidas por el EGFR activado, actúan diversos mecanismos capaces de inactivar al receptor con objeto de evitar la estimulación mitogénica continuada de la célula. Así, existen sistemas rápidos y lentos de inactivación del receptor. Los primeros pueden actuar en minutos, tales como fosforilaciones del receptor por proteínas

quinasas reguladoras o la interacción con el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina; y los últimos actúan en horas, como es la internalización del receptor y su degradación proteolítica.

Entre las proteínas quinasas capaces de regular al EGFR inhibiéndolo, citaremos a la PKC (Hunter *et al.*, 1984), la proteína quinasa II dependiente de calmodulina (CaMPK-II, por *calmodulin-dependent protein kinase II*) (Countaway *et al.*, 1990), la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK, por *mitogen-activated protein kinase*) (Northwood *et al.*, 1991; Takishima *et al.*, 1991), la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA, por *protein kinase A*) (Barbier *et al.*, 1999) y la proteína quinasa dependiente de ciclina p34cdc2 (Kuppuswamy *et al.*, 1993). Por otro lado, distintas fosfoproteína fosfatasas, como las fosfatasas 1 y 2A, parecen estar implicadas en la defosforilación del EGFR, puesto que cuando éstas son inhibidas se produce una hiperfosforilación del mismo (Hernández-Sotomayor *et al.*, 1991). Más recientemente, se ha demostrado que la tirosina quinasa TCPTP (por *T-cell protein-tyrosine kinase*) está implicada en la defosforilación de los residuos de fosfotirosina del EGFR y la posterior disminución de la señalización mediada por éste (Tiganis *et al.*, 1999).

Tras la activación del EGFR por sus ligandos, uno de los primeros eventos observados en diversos tipos celulares es el aumento transitorio de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  libre citosólico, proceso que está mediado por la PLC $\gamma$  y la PLA $_2$ , como hemos visto anteriormente (Villalobo *et al.*, 2000). Dentro de los mecanismos de desactivación del EGFR, describiremos con más detalle los procesos dependientes de la señal del calcio generada por el receptor, como son las fosforilaciones mediadas por la PKC y la CaMPK-II; y la acción directa del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina sobre el receptor.

La PKC presenta al menos 12 isoformas diferentes que se expresan de forma desigual en los diversos tejidos, están localizadas en diferentes compartimentos intracelulares y poseen modos de acción y especificidad de sustrato diferentes (Hug and Sarre, 1993; Dekker and Parker, 1994). Así, el aumento de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico activa a diversas isoformas de la PKC que fosforilan al EGFR en su Thr654 localizada en la región citosólica yuxtamembranal, inhibiendo su actividad tirosina quinasa y la internalización del mismo (Hunter *et al.*, 1984; Davis, 1988; Lund *et al.*, 1990; Countaway *et al.*, 1990; Morrison *et al.*, 1996) (ver Fig. 8). Sin embargo, la fosforilación de la Thr654 no parece ser responsable de la pérdida de la afinidad del receptor por el EGF (Davis, 1988). Por otro lado, se ha sugerido que la baja estequiometría de fosforilación de la Thr654 podría indicar que ésta no es suficiente para mediar la inhibición del receptor por la PKC (Friedman *et al.*, 1989; Countaway *et al.*, 1990). Se ha propuesto que el efecto inhibitorio de la PKC podría además estar mediado por la MAPK, que es capaz de fosforilar al receptor en su Thr669 inhibiéndolo (Northwood *et al.*, 1991; Takishima *et al.*, 1991; Morrison *et al.*, 1993, 1996). Para estudiar estos efectos se han generado EGFR mutados en los que se han sustituido la Thr654 y la Thr669 por sendos restos de ácido glutámico, con objeto de que la carga negativa de éste mimetice los efectos del fosfato de estos restos fosforilados. Estos estudios han demostrado que la introducción de una carga negativa en la región citosólica yuxtamembranal del receptor no parece ser suficiente para producir la inhibición del mismo (Morrison *et al.*, 1993). No obstante, aunque en diferentes líneas celulares se ha observado que la PKC es capaz de inhibir al EGFR por un mecanismo dependiente de la vía de la MAPK, esta inhibición no parece ser debida solamente a la fosforilación del receptor mediada por la PKC o por la MAPK, ya que existen evidencias de que la PKC podría activar, a través de la MAPK, a una proteína fosfatasa capaz de defosforilar al receptor produciendo la inactivación del mismo (Morrison *et al.*, 1996) (ver Fig. 8).



La CaMPK-II también interviene muy significativamente en la inhibición del EGFR mediada por el incremento de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  libre citosólico. Esta quinasa es capaz de fosforilar al EGFR en sus residuos Ser1046 y Ser1047, lo que induce la inhibición de la actividad tirosina quinasa del receptor y su internalización (Countaway *et al.*, 1992; Theroux *et al.*, 1992). Adicionalmente, se han descrito otros sitios de fosforilación del receptor por la CaMPK-II como son la Ser744, la Ser1142 y la Ser1057, lo cual produce también la inhibición de la actividad tirosina quinasa del mismo (Feinmesser *et al.*, 1999) (ver *Fig. 8*). Por otro lado, el receptor ErbB2/Neu también está regulado por esta quinasa (Feinmesser *et al.*, 1999). Los sitios de fosforilación de estos receptores por la CaMPK-II poseen funciones reguladoras muy importantes, ya que las células que expresan receptores mutados que carecen de estos sitios de fosforilación se transforman incrementando su potencial oncogénico (Countaway *et al.*, 1992; Feinmesser *et al.*, 1999).

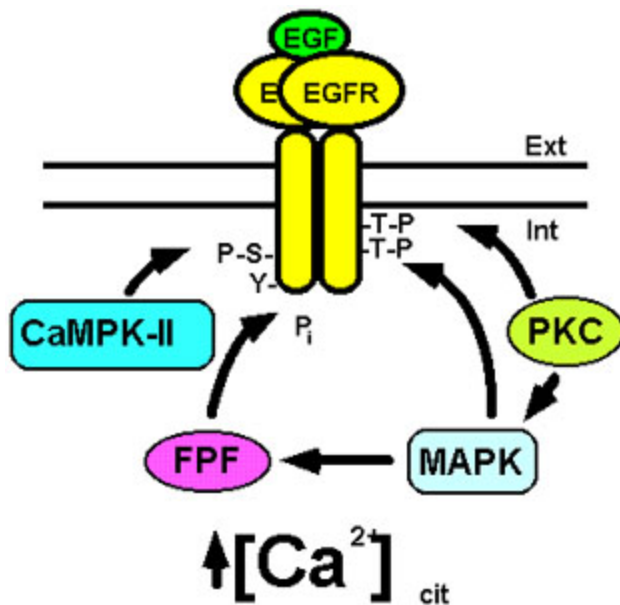


Figura 8. Retroinhibición del EGFR por la señal del  $\text{Ca}^{2+}$ . El aumento transitorio de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico da lugar a la activación de la PKC y la CaMPK-II que fosforilan al EGFR en residuos de treonina (-T-P) y serina (-S-P), respectivamente. La MAPK también fosforila residuos de treonina en el receptor. Estas fosforilaciones inhiben la actividad tirosina quinasa del mismo. Adicionalmente, la MAPK activa, mediante una vía dependiente de PKC, a una fosfoproteína fosfatasa (FPF) que desfosforila los restos de tirosina (Y) fosforilados del EGFR desactivándolo. Para más detalles ver texto.

La señal del  $\text{Ca}^{2+}$  generada por el EGFR produce además la formación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina. Este complejo ejerce una acción reguladora directa sobre el EGFR, independientemente de la acción mediada por la CaMPK-II, que también actúa sobre el receptor como hemos visto anteriormente. Así, nuestro grupo ha demostrado que el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina es capaz de unirse directamente al EGFR e inhibir su actividad tirosina quinasa (San José *et al.*, 1992; Benguría and Villalobo, 1993; Benguría *et al.*, 1995; Villalobo *et al.*, 2000). Este proceso parece ocurrir por la interacción del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina con un sitio de unión de la misma localizado en la región citosólica yuxtamembranal del receptor que está muy conservado filogenéticamente desde las aves hasta el hombre (San José *et al.*, 1992; Martín-

Nieto and Villalobo, 1998). En este sitio se encuentra la Thr654, que, como hemos visto anteriormente, es fosforilada por la PKC, siendo la unión de la calmodulina y la fosforilación de este residuo procesos mutuamente excluyentes (Martín-Nieto and Villalobo, 1998; Villalobo *et al.*, 2000) (ver Fig. 9). Aunque ambas señales inducen la inhibición de la actividad tirosina quinasa del receptor, estos procesos podrían tener significados fisiológicos diferentes. Por un lado, la fosforilación del EGFR por la PKC parece constituir una señal de inhibición de la internalización del receptor mediada por la unión del ligando (Lund *et al.*, 1990). Por el contrario, nosotros hemos propuesto que la unión del complejo Ca<sup>2+</sup>/calmodulina al receptor podría constituir una señal de internalización de éste (Martín-Nieto and Villalobo, 1998; Villalobo *et al.*, 2000).

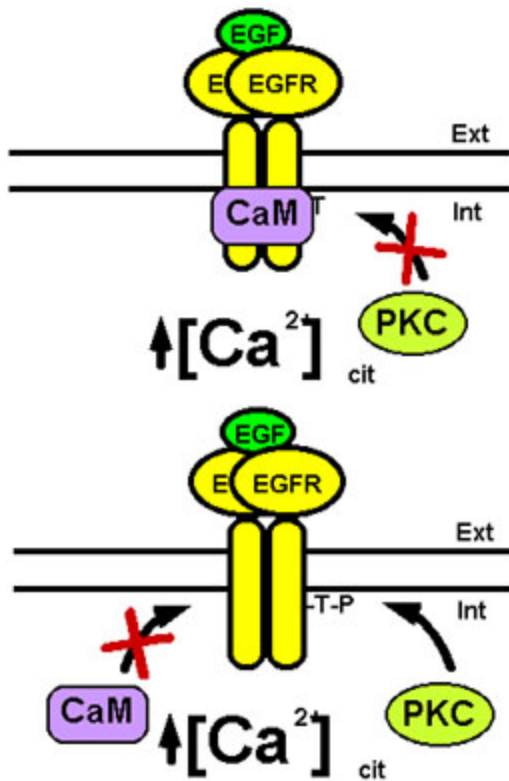


Figura 9. Regulación mutuamente excluyente del EGFR por la calmodulina y la PKC. (*Panel superior*) El incremento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico induce la formación del complejo Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (CaM) que se une al EGFR inhibiendo su actividad tirosina quinasa. Este proceso previene la fosforilación del receptor por la PKC. (*Panel inferior*) La fosforilación del EGFR por la PKC previene la unión del complejo Ca<sup>2+</sup>/calmodulina al receptor. Para más detalles ver texto.

La relación entre la calmodulina y el EGFR parece ser más compleja de lo explicado hasta ahora, ya que también hemos demostrado que este receptor es capaz de fosforilar a la calmodulina en su Tyr99 con una estequiometría cercana a 1 (mol/mol), en ausencia de Ca<sup>2+</sup> y en presencia de un cofactor básico (San José *et al.*, 1992; Benguría and Villalobo, 1993; Benguría *et al.*, 1994, 1995; De Frutos *et al.*, 1997; Benaim *et al.*, 1998; Palomo-Jiménez *et al.*, 1999; Villalobo *et al.*, 2000). Esta fosforilación podría constituir un sistema de regulación de la calmodulina, modulando así distintos sistemas enzimáticos o estructurales dependientes de ésta. En este contexto, nuestro grupo también ha demostrado que la calmodulina fosforilada por el EGFR, y libre de calmodulina no fosforilada, pierde la capacidad de activar a la fosfodiesterasa de nucleótidos

cíclicos de corazón bovino (Palomo-Jiménez *et al.*, 1999) (ver *Fig. 10*). Sin embargo, parece ser que esta regulación no es universal, ya que otros autores han demostrado que preparaciones similares de fosfo(Tyr)calmodulina activan a la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de cerebro bovino como lo hace la calmodulina no fosforilada (Corti *et al.*, 1999). Esta aparente discrepancia puede ser debida a que en el corazón y en el cerebro bovino existan diferentes isoformas de esta enzima, o a pequeñas diferencias en el estado de fosforilación de la calmodulina (Villalobo *et al.*, 2000). Por otro lado, la fosfo(Tyr)calmodulina parece ejercer una acción potenciadora de la actividad tirosina quinasa del EGFR en presencia, pero no en ausencia, de EGF. Esto ha sido propuesto en base a experimentos en los que se permitió en una primera fase la acumulación de calmodulina fosforilada por el receptor, y posteriormente se ensayó en una segunda fase la fosforilación de otro sustrato del mismo, observándose un pronunciado incremento de la fosforilación del segundo sustrato cuando se comparaba con controles en los que no se había acumulado calmodulina fosforilada (Villalobo *et al.*, 2000) (ver *Fig. 10*).

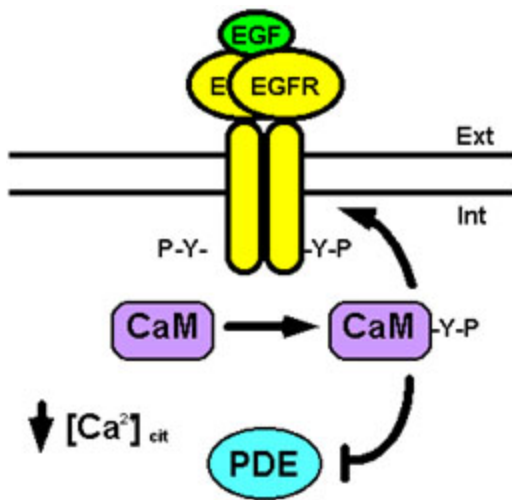


Figura 10. Fosforilación de la calmodulina por el EGFR y mecanismos reguladores. Cuando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico es baja, al comienzo del proceso de estimulación mitogénica, el EGFR fosforila a la calmodulina (CaM) generándose de esta forma fosfo(Tyr)calmodulina (CaM-Y-P). Ésta por un lado estimula más aún la actividad tirosina quinasa del EGFR, y por otro pierde la capacidad de estimular a ciertas fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDE). Para más detalles ver texto.

Con objeto de documentar la acción reguladora sobre el receptor de un sistema de naturaleza diferente al de los mencionados hasta ahora, indicaremos que el EGFR parece estar también bajo el control regulador del óxido nítrico, agente gaseoso fisiológico de vida efímera que es sintetizado a partir de L-arginina por la óxido nítrico sintetasa, enzima que también es regulada por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina. El óxido nítrico regula múltiples funciones celulares y sistémicas incluida la proliferación celular. Así, hemos puesto en evidencia que dicho gas es capaz de reaccionar covalentemente con grupos -SH del receptor y que dicho proceso (denominado S-nitrosilación) da lugar, de una forma reversible, a la inhibición de la transfosforilación del receptor y de la fosforilación de sustratos exógenos, lo que podría contribuir a la inhibición de la proliferación celular inducida por EGF en condiciones de estrés nitrosativo (Estrada *et al.*, 1997) (ver *Fig. 11*).

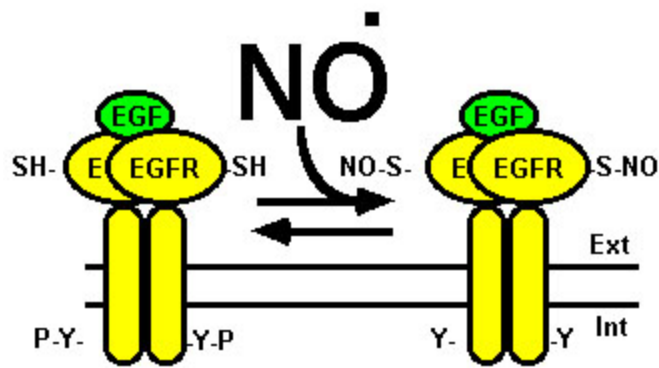


Figura 11. Regulación del EGFR por óxido nítrico. El óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ) S-nitrosila al EGFR inhibiendo su actividad tirosina quinasa. Proceso que es revertido por agentes reductores. La localización de los grupos  $-\text{SH}$  susceptibles de ser S-nitrosilados se desconoce. En este esquema se representan arbitrariamente en el dominio extracelular. Para más detalles ver texto.

## TRANSACTIVACIÓN DE RECEPTORES ERBB POR OTRAS FAMILIAS DE RECEPTORES

Una de las características de las vías de transducción de señales de la célula, es que éstas están interconectadas y forman complejos entramados que juegan un papel muy importante en la plasticidad de la respuesta celular. Así, la redundancia y cooperatividad de estas vías son elementos evolutivos utilizados por la célula para asegurar su supervivencia, disminuyendo la posibilidad de daños irreparables en vías esenciales de señalización. Además, estas interconexiones generan respuestas celulares más complejas y adaptables a las diversas condiciones fisiológicas. Así, no es de extrañar que recientemente se hayan puesto en evidencia conexiones mutuas entre señales provenientes de receptores ErbB y receptores pertenecientes a otras familias no relacionadas. En esta sección mencionaremos algunas de estas comunicaciones cruzadas.

De gran interés es el hecho de que el EGFR pueda interaccionar con otros receptores que poseen actividad tirosina quinasa intrínseca pero que no pertenecen a la familia de receptores ErbB. Así, se ha demostrado que el EGFR fosforila al PDGFR-b (por *platelet-derived growth factor receptor-b*), lo que resulta en el reclutamiento de la PI3K por este último y la activación de esta vía de señalización en ausencia del ligando del PDGFR (Habib *et al.*, 1998) (ver Fig. 12).

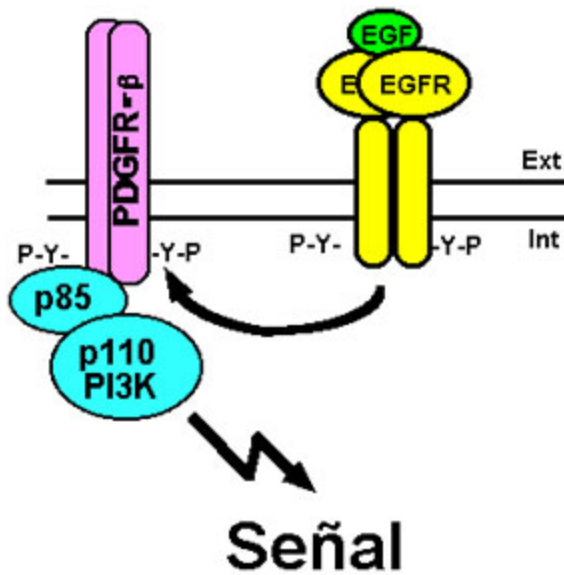


Figura 12. Transactivación del receptor de PDGF por el EGFR. El EGFR fosforila al PDGFR-β y éste es capaz de reclutar a la PI3K, generando así señales en ausencia del ligando PDGF. Para más detalles ver texto.

Dentro del amplio grupo de receptores para las diversas citoquinas, se han detectado algunos que parecen estar implicados en la transactivación del EGFR y otros receptores ErbB. Entre los receptores que transactivan el EGFR tenemos el receptor de TNF (por *tumor necrosis factor*) (Donato *et al.*, 1989, 1992), y el receptor de la hormona de crecimiento, proceso mediado por la tirosina quinasa Jak2 (por *Janus kinase 2*) (Yamauchi *et al.*, 1997) (ver Fig. 13). Por otro lado, el TNF-α y el TNF-β inducen un aumento de la expresión del EGFR y una disminución en la expresión del receptor ErbB2/Neu (Kalthoff *et al.*, 1993). Además, la subunidad b del receptor del factor de crecimiento de granulocitos y macrófagos y estimulador de la formación de colonias (GM-CSF, por *granulocyte/macrophage-colony stimulating factor*) parece interaccionar con el EGFR (García-Manero *et al.*, 1998), mientras que el receptor de la interleuquina-6 transactiva al heterodímero ErbB2/ErbB3, pero no al EGFR (Qiu *et al.*, 1998).

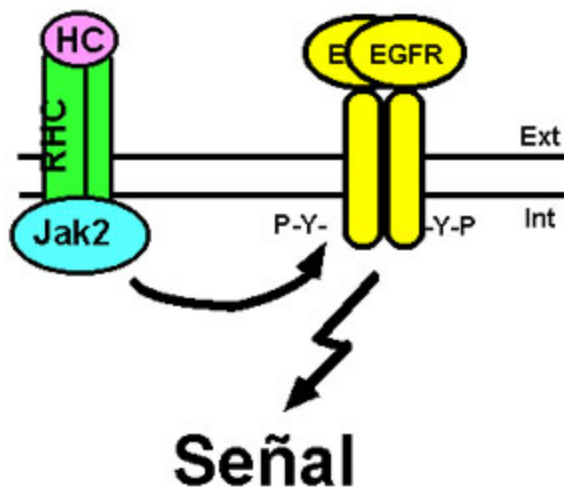


Figura 13. Transactivación del EGFR por el receptor de la hormona del crecimiento. La activación del receptor de la hormona del crecimiento (RHC) por su ligando (HC) induce la transactivación



del EGFR en ausencia de EGF por un mecanismo en el que está envuelta la tirosina quinasa Jak2. Para más detalles ver texto.

---

Uno de los hallazgos más interesantes en este campo ha sido la demostración de que el EGFR puede ser también transactivado por diferentes miembros de la numerosísima familia de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs, por *G protein-coupled receptors*), como son los receptores de ácido lisofosfatídico, de adrenalina, de acetilcolina, de endotelina 1, de trombina y de ATP extracelular (Daub *et al.*, 1996, 1997; Tsai *et al.*, 1997; Luttrell *et al.*, 1997; Soltoff, 1998). Así, en fibroblastos de rata, se ha observado tras la estimulación de las células con ácido lisofosfatídico, endotelina 1 o trombina, una rápida fosforilación del EGFR y del receptor ErbB2/Neu, así como la activación de la vía de las MAPKs. Esta activación y la síntesis de ADN se suprimen en gran medida cuando las células son tratadas con inhibidores específicos del EGFR, lo cual sugiere que éste está implicado en la activación de la vía de la MAPK mediada por agonistas de los GPCRs (Daub *et al.*, 1996). En ciertos casos, estos procesos están mediados por el dímero formado por la subunidad bg (Gbg) de las proteínas G heterotriméricas, que es liberado tras la activación de los GPCRs. Gbg activa a Src y esta tirosina quinasa fosforila al EGFR quién induce el reclutamiento de la proteína adaptadora Shc, la cual a su vez se une al complejo Grb2/Sos activando así la vía Ras/MAPK (Luttrell *et al.*, 1997) (ver Fig. 14). La transactivación del EGFR por GPCRs ha sido también observada en otros tipos celulares como son queratinocitos, astrocitos y células COS-7. En estas últimas, la inhibición de la PI3K no afecta a la fosforilación del EGFR mediada por el GPCR, pero sí se inhibe la estimulación de la vía de la MAPK (Daub *et al.*, 1997). Otros autores han descrito la dimerización y activación del EGFR inducida por el receptor m1 muscarínico de la acetilcolina en un proceso independiente de EGF en el que interviene la PKC (Tsai *et al.*, 1997). Las vías que conectan los GPCRs con el EGFR no están aún bien definidas, y es posible que sean más complejas de lo esperado, ya que en la región citosólica yuxtamembranal del EGFR existe una secuencia de reconocimiento e interacción con la subunidad  $\alpha$  de la proteína Gs (Sun *et al.*, 1997).

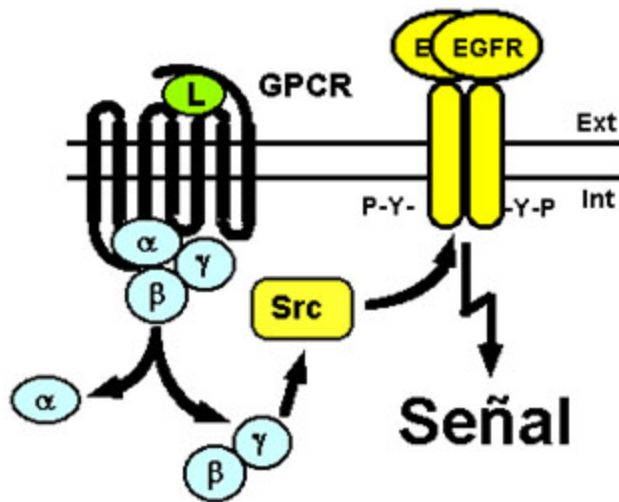


Figura 14. Transactivación del EGFR por receptores acoplados a proteínas G. La activación del GPCR por su ligando (L) induce la transactivación del EGFR en ausencia de EGF por un mecanismo en el que está implicada la tirosina quinasa Src que es activada por el dímero bg de la proteína G heterotrimérica que se libera en el proceso. Para más detalles ver texto.

## INTERNALIZACIÓN DE EGFR

Además de los mecanismos que regulan de forma rápida la actividad tirosina quinasa del EGFR, mencionados anteriormente, existen otros mecanismos de desensibilización lenta del receptor que implican la internalización y la degradación proteolítica del mismo. Así, una vez que el receptor ha transmitido las correspondientes señales, el complejo ligando-receptor es internalizado hacia los endosomas primarios, principalmente mediante su inclusión en vesículas recubiertas de clatrina, aunque parecen existir otras vías independientes de éstas. El destino último del receptor internalizado puede ser su degradación proteolítica en lisosomas o su retorno a la membrana plasmática (Trowbridge *et al.*, 1993; Mellman, 1996; Waterman *et al.*, 1998; Sorkina *et al.*, 1999) (ver Fig. 15). Esto depende en parte del tipo de ligando unido al receptor. De esta forma, los receptores ErbB activados por EGF son dirigidos en su mayoría a la degradación lisosomal, mientras que los receptores activados por NDF o TGF- $\alpha$  son reciclados de vuelta a la superficie celular (Waterman *et al.*, 1998).

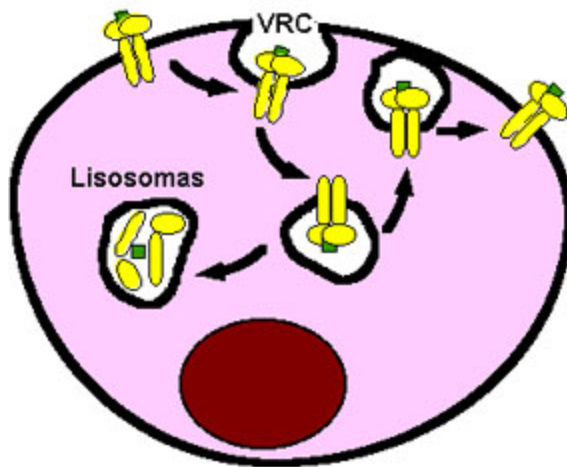


Figura 15. Procesamiento y reciclaje del EGFR. El EGFR (dímeros en forma de T) es internalizado por endocitosis en vesículas recubiertas de clatrina (VRC). El destino del receptor puede ser su degradación proteolítica en los lisosomas o su reciclaje y vuelta a la membrana plasmática. Para más detalles ver texto.

La internalización del EGFR mediada por vesículas recubiertas de clatrina es un proceso complejo en el que intervienen las proteínas adaptadoras AP-1 y AP-2 (por *adaptor proteins 1 y 2*) y la proteína Eps15 (por *epidermal growth factor pathway substrate 15*) que juega un papel estabilizador en dicho proceso (Sorkina *et al.*, 1999; Torrisi *et al.*, 1999). Además, durante la internalización del EGFR se produce la ubiquitinación del mismo (Galcheva-Gargova *et al.*, 1995). En este proceso parece estar implicada la proteína c-Cbl que es fosforilada en residuos de tirosina tras la activación del receptor y aparece en los endosomas en los que se internaliza el mismo (Levkowitz *et al.*, 1998; Ettenberg *et al.*, 1999; Waterman *et al.*, 1999). La unión de la proteína c-Cbl a la región carboxilo terminal del receptor depende de la actividad tirosina quinasa de éste. Además, se ha demostrado que la internalización y degradación del EGFR se ve afectada cuando se producen mutaciones en las tirosinas transfosforilables, lo cual demuestra la importancia de estos residuos en el procesamiento del receptor (Emlet *et al.*, 1997). También se ha descrito un dominio específico en la región citosólica del receptor implicado en su

internalización, y la importancia de la presencia de cargas negativas cercanas a la Tyr992 del receptor en este proceso (Holbrook *et al.*, 1999).

La internalización del EGFR aminora la señal mitogénica, jugando así un papel relevante en la prevención de la proliferación celular incontrolada. De hecho, en las células en las que existen mutaciones en los genes que codifican las proteínas implicadas en la internalización de los receptores ErbB se observa un aumento de la proliferación celular y su transformación en fenotipos malignos.

## IMPLICACIÓN DE RECEPTORES ERBB EN CARCINOGENESIS

La implicación del EGFR en la proliferación incontrolada de ciertas células tumorales se dedujo a partir de tres hechos fundamentales. Por un lado, el oncogén *v-erbB* de origen vírico codifica una proteína truncada homóloga del EGFR que presenta una actividad tirosina quinasa hiperactiva (ver Carpenter, 1987); por otro lado, la sobreexpresión del EGFR en fibroblastos induce la aparición de un fenotipo transformado dependiente de la presencia del ligando (Di Fiore *et al.*, 1987); y finalmente, es frecuente observar la sobreexpresión del EGFR, con o sin la amplificación de su gen, en varios tipos de tumores humanos y líneas celulares tumorales (Merlino *et al.*, 1984; Ullrich *et al.*, 1984; Ekstrand *et al.*, 1994; Nishikawa *et al.*, 1994). La presencia de un número excesivamente alto de copias de EGFR en la célula provoca un aumento de la sensibilidad a sus ligandos que, incluso a concentraciones muy bajas, son capaces de estimular las células e inducir proliferación celular. Por otro lado, el proceso de internalización de los receptores en estas circunstancias es más lento porque se excede la capacidad de endocitosis de la célula, por lo que éstas no pueden reprimir adecuadamente la transmisión de las señales mitogénicas que se generan de una forma continuada (Cadena and Gill, 1992) (ver *Fig. 16*).

También es frecuente en una gran variedad de tumores la coexpresión aumentada de los receptores homólogos ErbB2/Neu y ErbB3, así como mutaciones del receptor ErbB2/Neu que dan lugar a la formación de puentes disulfuro anómalos entre receptores contiguos y a la consecuente dimerización constitutiva de los mismos (Kim and Muller, 1999). La sobreexpresión del EGFR y el receptor ErbB2/Neu es muy frecuente en adenocarcinomas y contribuye al desarrollo y mantenimiento del fenotipo celular maligno. En clínica, la coexistencia de ambos receptores se relaciona con un peor pronóstico de la evolución de la enfermedad (Kalthoff *et al.*, 1993). La presencia de un gran número de receptores ErbB2 suele ir además asociada a una pérdida de la función de los receptores de estrógenos, lo que explicaría la baja respuesta a las terapias basadas en el uso de antagonistas de estrógenos en estos pacientes (Kim and Muller, 1999).

Además de la sobreexpresión del EGFR en muchos tumores, en otros es frecuente observar la coexistencia del receptor normal con receptores aberrantes truncados. En la mayoría de las ocasiones, los tumores presentan deleciones de exones que codifican parte del dominio extracelular del receptor (ver *Fig. 16*). Así, el EGFRvI es un receptor mutado similar al producto del oncogén *v-erbB1*, que está constitutivamente activado (Haley *et al.*, 1989; Wong *et al.*, 1992). Por otro lado, el receptor mutado EGFRvII tiene una deleción de 83 aminoácidos de su región extracelular. Este receptor mantiene la capacidad de unir el ligando pero presenta un aumento de su actividad tirosina quinasa (Humphrey *et al.*, 1991). Por el contrario, el receptor mutado EGFRvIII tiene una masa molecular de 140 kDa ya que carece de la parte del dominio extracelular

codificada por los exones 2-7 y no posee un sitio de unión del ligando completo. Esta mutación también provoca un cambio conformacional en el receptor que estimula la actividad tirosina quinasa y aumenta la capacidad tumorigénica de las células que lo expresan (Ekstrand *et al.*, 1994; Nishikawa *et al.*, 1994). Menos frecuentes son las mutaciones que dan lugar a receptores truncados en su extremo C-terminal, lo que puede afectar al dominio tirosina quinasa. Estos receptores truncados se han descrito en algunos sarcomas (Yamamoto *et al.*, 1983; Pelley *et al.*, 1989) y en células de carcinoma epidermoide (Ullrich *et al.*, 1984) (ver Fig. 16).

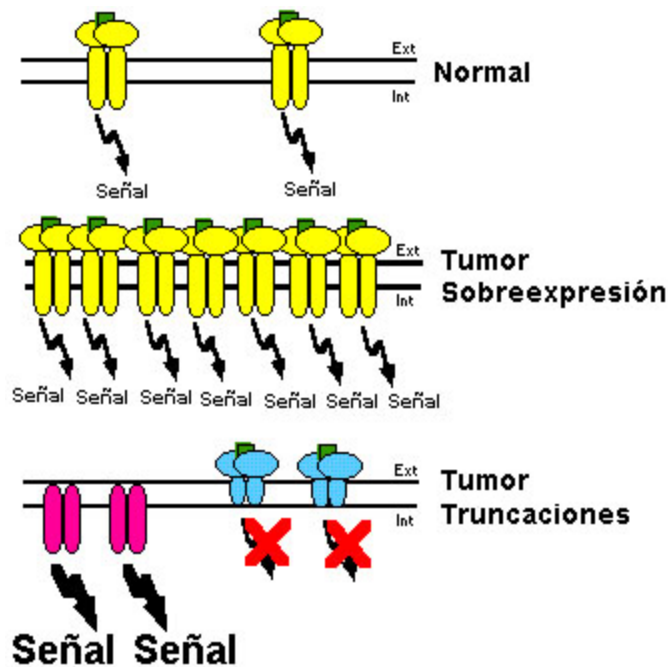


Figura 16. Alteraciones del EGFR en células tumorales. En células normales (*panel superior*) se expresa un número moderado (por ejemplo 53-103 copias por célula) del EGFR (*dímeros en forma de T*) que señalizan adecuadamente. En ciertas células tumorales el EGFR puede sobreexpresarse (por ejemplo 4003 receptores por célula) generando un alto nivel de señalización (*panel central*). Otros tumores expresan formas truncadas aberrantes del EGFR que carecen del dominio extracelular, presentando una actividad tirosina quinasa hiperactiva que señala en ausencia del control ejercido por el ligando (*panel inferior, izquierda*), o formas truncadas que carecen del dominio intracelular y no tienen actividad tirosina quinasa y por lo tanto no señalizan directamente, aunque son capaces de unir el ligando (*panel inferior, derecha*).

Otras formas anómalas del EGFR poseen duplicaciones de algunos dominios funcionales. Así, en células de glioma humano se ha descrito la presencia de un EGFR aberrante de 190-200 kDa que presenta dos copias del dominio responsable de la actividad catalítica tirosina quinasa (dominio TK, por *tyrosine kinase domain*) y del dominio denominado CAIN (por *Ca<sup>2+</sup>/internalization domain*), que está implicado en la generación de la señal del calcio y la internalización del receptor. Esta mutación es consecuencia de la duplicación de los exones 18-26 en el transcrito del EGFR. Ambos dominios tirosina quinasa son funcionales, pero el dominio denominado TK-1 no puede ser regulado adecuadamente porque se encuentra alejado por un segmento de 367 aminoácidos de su dominio regulador, y el dominio denominado TK-2 presenta una mutación puntual que también altera su actividad tirosina quinasa (Fenstermaker *et al.*, 1998).

La identificación y caracterización de mutaciones en los receptores ErbB y el estudio de los mecanismos de señalización y regulación de estos receptores es de interés no sólo para el conocimiento de los sistemas de activación y control de la proliferación celular mediada por mitógenos, sino para comprender ciertos mecanismos responsables de la transformación oncogénica de la célula. Por lo tanto, estos estudios pueden abrir nuevas vías para el desarrollo de métodos adecuados para el diagnóstico precoz de los tumores y la predicción de la evolución de la enfermedad, así como para el desarrollo de metodologías de terapia génica para la intervención de estos pacientes.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alroy I; Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. Federation European Biochemical Societies Letters, 1997 Jun, 410 (1): 83-6.
- Anderson D; Koch CA; Grey L; Ellis C; Moran MF; Pawson T. Binding of SH2 domains of phospholipase C $\gamma$ 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors. Science, 1990 Nov, 250 (4983): 979-82.
- Auricchio A; di Domenico M; Castoria G; Bilancio A; Migliaccio A. Epidermal growth factor induces protein tyrosine phosphorylation and association of p190 with ras-GTP-ase activating protein in Caco-2 cells. Federation European Biochemical Societies Letters, 1994 Oct, 353 (1): 16-20.
- Barbier AJ; Poppleton HM; Yigzaw Y; Mullenix JB; Wiepz GJ; Bertics PJ; Patel TB. Transmodulation of epidermal growth factor receptor function by cyclic AMP-dependent protein kinase. Journal of Biological Chemistry, 1999 May, 274 (20): 14067-73.
- Bell GI; Fong NM; Siempien MM; Wormsted MA; Caput D; Ku LL; Urdea MS; Rall LB; Sanchez-Pescador R. Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression *in vitro* and gene organization. Nucleic Acids Research, 1986 Nov, 14 (21): 8427-46.
- Benaim G; Cervino V; Villalobo A. Comparative phosphorylation of calmodulin from trypanosomatids and bovine brain by calmodulin-binding protein kinases. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C-Pharmacology Toxicology and Endocrinology, 1998 Jul, 120 (1): 57-65.
- Benguría A; Villalobo A. Calmodulin and the epidermal growth factor receptor: A reciprocal regulation? Bio-Reguladores, 1993 Dec, 2 (2): 74-85.
- Benguría A; Hernández-Perera O; Martínez-Pastor MT; Sacks DB; Villalobo A. Phosphorylation of calmodulin by the epidermal-growth-factor-receptor tyrosine kinase. European Journal of Biochemistry, 1994 Sep, 224 (3): 909-16.
- Benguría A; Martín-Nieto J; Benaim G; Villalobo A. Regulatory interaction between calmodulin and the epidermal growth factor receptor. Annals of the New York Academy of Sciences, 1995



Sep, 766: 472-6.

- 

Biscardi JS; Maa MC; Tice DA; Cox ME; Leu TH; Parsons SJ. c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *Journal of Biological Chemistry*, 1999 Mar, 19 (12): 8335-43.

- 

Boonstra J; Rijken P; Humbel B; Cremers F; Verkleij A; Van Bergen en Henegouwen P. The epidermal growth factor. *Cell Biology International*, 1995 May, 19 (5): 413-30.

- 

Borst P; Fairlamb AH. Surface receptors and transporters of *Trypanosoma brucei*. *Annual Review of Microbiology*, 1998, 52: 745-78.

- 

Cadena DL; Gill GN. Receptor tyrosine kinases. *Federation American Societies of Experimental Biology Journal*, 1992 Mar, 6 (6): 2332-7.

- 

Campos-González R; Glenney JR. Tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in cells with tyrosine kinase-negative epidermal growth factor receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 1992 Jul, 267 (21): 14535-8.

- 

Cardone MH; Roy N; Stennicke HR; Salvesen GS; Franke TF; Stanbridge E; Frisch S; Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 1998 Nov, 282 (5392): 1318-21.

- 

Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annual Review of Biochemistry*, 1987, 56: 881-914.

- 

Carpenter G; Cohen S. Epidermal growth factor. *Annual Review of Biochemistry*, 1979, 48: 193-216.

- 

Carpenter G; Cohen S. Epidermal growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 1990 May, 265 (14): 7709-12.

- 

Carpenter G; Zendejui JG. Epidermal growth factor, its receptor, and related proteins. *Experimental Cell Research*, 1986 May, 164 (1): 1-10.

- 

Carraway KL; Burden SJ. Neuregulins and their receptors. *Current Opinion in Neurobiology*, 1995 Oct, 5 (5): 606-12.

- 

Carraway KL; Weber JL; Unger MJ; Ledesma J; Yu N; Gassmann M; Lai C. Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature*, 1997 May, 387 (6632): 512-6.

- 

Casci T; Freeman M. Control of EGF receptor signalling: lessons from fruitflies. *Cancer Metastasis Review*, 1999, 18 (2): 181-201.

- 

Cobb MH. MAP kinase pathways. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1999, 71 (3-4): 479-500.

-

Corti C; LeClerc L'Hostis E; Quadroni M; Schmid H; Durussel Y; Cox J; Hatt PD; James P; Carafoli E. Tyrosine phosphorylation modulates the interaction of calmodulin with its target proteins. *European Journal of Biochemistry*, 1999 Jun, 262 (3): 790-802.

•

Coso OA; Chiariello M; Yu JC; Teramoto H; Crespo P; Xu N; Miki T; Gutkind JS. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell*, 1995 Jun, 81 (7): 1137-46

•

Countaway JL; McQuilkin P; Girones N; Davis RJ. Multisite phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. Use of site-directed mutagenesis to examine the role of serine/threonine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 1990 Feb, 265 (6): 3407-16.

•

Countaway JL; Nairn AC; Davis RJ. Mechanism of desensitization of the epidermal growth factor receptor protein-tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 1992 Jan, 267 (2): 1129-40.

•

Chang H; Riese DJ; Gilbert W; Stern DF; McMahan UJ. Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature*, 1997 May, 387 (6632): 509-12.

•

Chen P; Xie H; Wells A. Mitogenic signaling from the EGF receptor is attenuated by a phospholipase C-g/protein kinase C feedback mechanism. *Molecular Biology of the Cell*, 1996 Jun, 7 (6): 871-81.

•

Chin YE; Kitagawa M; Su WC; You ZH; Iwamoto Y; Fu XY. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science*, 1996 May, 272 (5262): 719-22.

•

Chin YE; Kitagawa M; Kuida K; Flavell RA; Fu XY. Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 1997 Sep, 17 (9): 5328-37.

•

Daly RJ. The Grb7 family of signalling proteins. *Cellular Signaling*, 1998 Oct, 10 (9): 613-8.

•

Daub H; Weiss FU; Wallasch C; Ullrich A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, 1996 Feb, 379 (6565): 557-60.

•

Daub H; Wallasch C; Lankenau A; Herrlich A; Ullrich A. Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *European Molecular Biology Organization Journal*, 1997 Dec, 16 (23): 7032-44.

•

Davis RJ. Independent mechanisms account for the regulation by protein kinase C of the epidermal growth factor receptor affinity and tyrosine-protein kinase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 1988 Jul, 263 (19): 9462-9.

•

Davis RJ. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 1993 Jul, 268 (20): 14553-6.

•

- De Frutos T; Martín-Nieto J; Villalobo A. Phosphorylation of calmodulin by permeabilized fibroblasts overexpressing the human epidermal growth factor receptor. *Biological Chemistry*, 1997 Jan, 378 (1): 31-8.
- Dekker LV; Parker PJ. Protein kinase C: a question of specificity. *Trends in Biochemical Sciences*, 1994 Feb, 19 (2): 73-7.

  - 

Di Fiore PP; Pierce JH; Fleming TP; Hazan R; Ullrich A; King CR; Schlessinger J; Aaronson SA. Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell*, 1987 Dec, 51 (6): 1063-70.

  - 

Donato NJ; Gallick GE; Steck PA; Rosenblum MG. Tumor necrosis factor modulates epidermal growth factor receptor phosphorylation and kinase activity in human tumor cells: correlation with cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 1989 Dec, 264 (34): 20474-81.

  - 

Donato NJ; Rosenblum MG; Steck PA. Tumor necrosis factor regulates tyrosine phosphorylation on epidermal growth factor receptors in A431 carcinoma cells: evidence for a distinct mechanism. *Cell Growth and Differentiation*, 1992 May, 3 (5): 259-68.

  - 

Downward J. Ras signalling and apoptosis. *Current Opinion in Genetics and Development*, 1998 Feb, 8 (1): 49-54.

  - 

Downward J; Parker P; Waterfield MD. Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nature*, 1984 Oct , 311 (5985): 483-5

  - 

Earp HS; Dawson TL; Li X; Yu H. Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research. *Breast Cancer Research and Treatment*, 1995 Jul, 35 (1): 115-32.

  - 

Ekstrand AJ; Longo N; Hamid ML; Olson JJ; Liu L; Collins VP; James CD. Functional characterization of an EGF receptor with a truncated extracellular domain expressed in glioblastomas with EGFR gene amplification. *Oncogene*, 1994 Aug, 9 (8): 2313-20.

  - 

Emlet DR; Moscatello DK; Ludlow LB; Wong AJ. Subsets of epidermal growth factor receptors during activation and endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 1997 Feb, 272 (7): 4079-86.

  - 

Estrada C; Gomez C; Martin-Nieto J; De Frutos T; Jimenez A; Villalobo A. Nitric oxide reversibly inhibits the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Biochemical Journal*, 1997 Sep, 326 (2): 369-76.

  - 

Ettenberg SA; Keane MM; Nau MM; Frankel M; Wang LM; Pierce JH; Lipkowitz S. cbl-b inhibits epidermal growth factor receptor signaling. *Oncogene*, 1999 Mar, 18 (10): 1855-66.

  - 

Feinmesser RL; Wicks SJ; Taverner CJ; Chantry A. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II phosphorylates the epidermal growth factor receptor on multiple sites in the cytoplasmic tail and

serine<sup>744</sup> within the kinase domain to regulate signal generation. *Journal of Biological Chemistry*, 1999 Jun, 274 (23): 16168-73.

•

Fenstermaker RA; Ciesielski MJ; Castiglia GJ. Tandem duplication of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and calcium internalization domains in A-172 glioma cells. *Oncogene*, 1998 Jul, 16 (26): 3435-43.

•

Fiddes RJ; Campbell DH; Janes PW; Sivertsen SP; Sasaki H; Wallasch C; Daly RJ. Analysis of Grb7 recruitment by heregulin-activated erbB receptors reveals a novel target selectivity for erbB3. *Journal of Biological Chemistry*, 1998 Mar, 273 (13): 7717-24.

•

Friedman BA; van Amsterdam J; Fujiki H; Rosner MR. Phosphorylation at threonine-654 is not required for negative regulation of the epidermal growth factor receptor by non-phorbol tumor promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989 Feb, 86 (3): 812-6.

•

Galcheva-Gargova Z; Theroux SJ; Davis RJ. The epidermal growth factor receptor is covalently linked to ubiquitin. *Oncogene*, 1995 Dec, 11 (12): 2649-55.

•

García-Manero G; Moscatello DK; Emlet DR; Wong AJ. Association of the epidermal growth factor receptor with the beta chain of the granulocyte macrophage colony stimulating factor receptor. *Blood*, 1998, 92 (Suppl 1): A836.

•

Gray A; Dull TJ; Ullrich A. Nucleotide sequence of the epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000 molecular weight protein precursor. *Nature*, 1983 Jun, 303 (5919): 722-5.

•

Groenen LC; Nice EC; Burgess AW. Structure-function relationships for the EGF/TGF- $\alpha$  family of mitogens. *Growth Factors*, 1994, 11 (4): 235-57.

•

Guy PM; Platko JV; Cantley LC; Cerione RA; Carraway KL. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994 Aug, 91 (17): 8132-6.

•

Habib AA; Högnason T; Ren J; Stefansson K; Ratan RR. (1998) The epidermal growth factor receptor associates with and recruits phosphatidylinositol 3-kinase to the platelet-derived growth factor  $\beta$  receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 1998 Mar, 273 (12): 6885-91.

•

Haley JD; Hsuan JJ; Waterfield MD. Analysis of mammalian fibroblast transformation by normal and mutated human EGF receptors. *Oncogene*, 1989 Mar, 4 (3): 273-83.

•

Hanks SK; Quinn AM; Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 1988 Jul, 241 (4861): 42-52.

•

Hashimoto A; Kurosaki M; Gotoh N; Shibuya M; Kurosaki T. Shc regulates epidermal growth factor-induced activation of the JNK signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 1999 Jul, 274 (29): 20139-43.

- Heldi CH. SH2 domains: elements that control protein interactions during signal transduction. Trends in Biochemical Sciences, 1991 Dec, 16 (12): 450-2.
- Hernández-Sotomayor SM; Carpenter G. Epidermal growth factor receptor: elements of intracellular communication. Journal of Membrane Biology, 1992 Jun, 128 (2): 81-9.
- Hernández-Sotomayor SM; Mumby M; Carpenter G. Okadaic acid-induced hyperphosphorylation of the epidermal growth factor receptor. Comparison with receptor phosphorylation and functions affected by another tumor promoter, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Journal of Biological Chemistry, 1991 Nov, 266 (31): 21281-6
- Hide G; Gray A; Harrison CM; Tait A. Identification of an epidermal growth factor receptor homologue in trypanosomes. Molecular and Biochemical Parasitology, 1989 Aug, 36 (1): 51-9.
- Hill RJ; Sternberg PW. The gene *lin-3* encodes an inductive signal for vulval development in *C. elegans*. Nature, 1992 Aug, 358 (6386): 470-6.
- Holbrook MR; O'Donnell JB; Slakey LL; Gross DJ. Epidermal growth factor receptor internalization rate is regulated by negative charges near the SH2 binding site Tyr992. Biochemistry, 1999 Jul, 38 (29): 9348-56.
- Hu P; Margolis B; Skolnik EY; Lammers R; Ullrich A; Schlessinger J. Interaction of phosphatidylinositol 3-kinase-associated p85 with epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptors. Molecular and Cellular Biology, 1992 Mar, 12 (3): 981-90.
- Hughes AR; Bird GS; Obie JF; Thastrup O; Putney JW Jr. Role of inositol (1,4,5)trisphosphate in epidermal growth factor-induced  $Ca^{2+}$  signaling in A431 cells. Molecular Pharmacology, 1991 Aug, 40 (2): 254-62.
- Hug H; Sarre TF. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? Biochemical Journal, 1993 Apr, 291 (2): 329-43.
- Humphrey PA; Gangarosa LM; Wong AJ; Archer GE; Lund-Johansen M; Bjerkvig R; Laerum OD; Friedman HS; Bigner DD. Deletion-mutant epidermal growth factor receptor in human gliomas: effects of type II mutation on receptor function. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1991 Aug, 178 (3): 1413-20.
- Hunter T; Ling N; Cooper JA. Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane. Nature, 1984 Oct, 311 (4): 480-3.
- Kalthoff H; Roeder C; Giesekeing J; Humburg I; Schmiegel W. Inverse regulation of human ERBB2 and epidermal growth factor receptors by tumor necrosis factor  $\alpha$ . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993 Oct, 90 (19): 8972-6.
-



Kim H; Muller WJ. The role of the epidermal growth factor receptor family in mammary tumorigenesis and metastasis. *Experimental Cell Research*, 1999 Nov, 253 (1): 78-87.

•

Koch CA; Anderson D; Moran MF; Ellis C; Pawson T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science*, 1991 May, 252 (5006): 668-74.

•

Kuppuswamy D; Dalton M; Pike LJ. Serine 1002 is a site of *in vivo* and *in vitro* phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 1993 Sep, 268 (25): 19134-42.

•

Lane MD; Ronnett G; Sliker LJ; Kohanski RA; Olson TL. Post-translational processing and activation of insulin and EGF proreceptors. *Biochimie*, 1985 Oct-Nov, 67 (10-11): 1069-80.

•

Lax I; Burgess WH; Bellot F; Ullrich A; Schlessinger J; Givol D. Localization of a major receptor-binding domain for epidermal growth factor by affinity labeling. *Molecular and Cellular Biology*, 1988 Apr, 8 (4): 1831-4.

•

Lax I; Bellot F; Howk R; Ullrich A; Givol D; Schlessinger J. Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. *European Molecular Biology Organization Journal*, 1989 Feb, 8 (2): 421-7.

•

Levkowitz G; Waterman H; Zamir E; Kam S; Oved S; Langdon WY; Beguinot L; Geiger B; Yarden Y. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes and Development*, 1998 Dec, 12 (23): 3663-74.

•

Li N; Schlessinger J; Margolis B. Autophosphorylation mutants of the EGF-receptor signal through auxiliary mechanisms involving SH2 domain proteins. *Oncogene*, 1994 Dec, 9 (12): 3457-65.

•

Liu XQ; Pawson T. The epidermal growth factor receptor phosphorylates GTPase-activating protein (GAP) at Tyr-460, adjacent to the GAP SH2 domains. *Molecular and Cellular Biology*, 1991 May, 11 (5): 2511-6.

•

Logan SK; Falasca M; Hu P; Schlessinger J. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates epidermal growth factor-induced activation of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 1997 Oct, 17 (10): 5784-90.

•

Lowenstein EJ; Daly RJ; Batzer AG; Li W; Margolis B; Lammers R; Ullrich A; Skolnik EY; Bar-Sagi D; Schlessinger J. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*, 1992 Aug, 70 (3): 431-42.

•

Lund KA; Lazar CS; Chen WS; Walsh BJ; Welsh JB; Herbst JJ; Walton GM; Rosenfeld MG; Gill GN; Wiley HS. Phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at threonine 654 inhibits ligand-induced internalization and down-regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 1990 Nov, 265 (33): 20517-23.

•

Luttrell LM; Della Rocca GJ; van Biesen T; Luttrell DK; Lefkowitz RJ. Gbg subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor: a scaffold for G-protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *Journal of Biological Chemistry*, 1997 Feb, 272 (7): 4637-44.

- 

Margolis; B. Proteins with SH2 domains: transducers in the tyrosine kinase signaling pathway. *Cell Growth and Differentiation*, 1992 Jan, 3 (1): 73-80.

- 

Margolis B; Rhee SG; Felder S; Mervic M; Lyall R; Levitzki A; Ullrich A; Zilberstein A; Schlessinger J. EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: a potential mechanism for EGF receptor signaling. *Cell*, 1989 Jun, 57 (7): 1101-7.

- 

Margolis B; Silvennoinen O; Comoglio F; Roonprapunt C; Skolnik E; Ullrich A; Schlessinger J. High-efficiency expression/cloning of epidermal growth factor-receptor-binding proteins with Src homology 2 domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992 Oct, 89 (19): 8894-8.

- 

Martín-Nieto J; Villalobo A. The human epidermal growth factor receptor contains a juxtamembrane calmodulin-binding site. *Biochemistry*, 1998 Jan, 37 (1): 227-36.

- 

Massagué J. Transforming growth factor- $\alpha$ . A model for membrane-anchored growth factors. *Journal of Biological Chemistry*, 1990 Dec, 265 (35): 21393-6.

- 

Massagué J; Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. *Annual Review of Biochemistry*, 1993, 62: 515-41.

- 

Mellman I. Endocytosis and molecular sorting. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1996, 12: 575-625.

- 

Merlino GT; Xu YH; Ishii S; Clark AJ; Semba K; Toyoshima K; Yamamoto T; Pastan I. Amplification and enhanced expression of the epidermal growth factor receptor gene in A431 human carcinoma cells. *Science*, 1984 Apr, 224 (4647): 417-9.

- 

Mikoshiba K. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1993 Mar, 14 (3): 86-9.

- 

Minden A; Lin A; Claret FX; Abo A; Karin M. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell*, 1995 Jun, 81 (7): 1147-57.

- 

Morrison P; Takishima K; Rosner MR. Role of threonine residues in regulation of the epidermal growth factor receptor by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 1993 Jun, 268 (21): 15536-43.

- 

Morrison P; Saltiel AR; Rosner MR. Role of mitogen-activated protein kinase in regulation of the epidermal growth factor receptor by protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, 1996 May, 271 (22): 12891-6.

- Muskavitch MA; Hoffmann FM. Homologs of vertebrate growth factors in *Drosophila melanogaster* and other invertebrates. *Current Topics in Developmental Biology*, 1990, 24: 289-328.
- Nishibe S; Wahl MI; Hernández-Sotomayor SM; Tonks NK; Rhee SG; Carpenter G. Increase of the catalytic activity of phospholipase C $\alpha$ 1 by tyrosine phosphorylation. *Science*, 1990 Nov, 250 (4985): 1253-6.
- Nishikawa R; Ji XD; Harmon RC; Lazar CS; Gill GN; Cavenee WK; Huang HJ. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994 Aug, 91 (16): 7727-31.
- Northwood IC; González FA; Wartmann M; Raden DL; Davis RJ. Isolation and characterization of two growth factor-stimulated protein kinases that phosphorylate the epidermal growth factor receptor at threonine 669. *Journal of Biological Chemistry*, 1991 Aug, 266 (23):15266-76.
- Palomo-Jiménez PI; Hernández-Hernando S; García-Nieto RM; Villalobo A. A method for the purification of phospho(Tyr)calmodulin free of nonphosphorylated calmodulin. *Protein Expression and Purification*, 1999 Aug, 16 (3): 388-95.
- Peles E; Yarden Y. Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors. *Bioessays*, 1993 Dec, 15 (12): 815-24.
- Pelicci G; Lanfrancone L; Grignani F; McGlade J; Cavallo F; Forni G; Nicoletti I; Grignani F; Pawson T; Pelicci PG. A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell*, 1992 Jul, 70 (1): 93-104.
- Pelley RJ; Maihle NJ; Boerkoel C; Shu HK; Carter TH; Moscovici C; Kung HJ. Disease tropism of c-erbB: effects of carboxyl-terminal tyrosine and internal mutations on tissue-specific transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989 Sep, 86 (18): 7164-8.
- Peppelenbosch MP; Tertoolen LG; der Hertog J; de Laat SW. Epidermal growth factor activates calcium channels by phospholipaseA2/5-lipoxygenase-mediated leukotriene C4 production. *Cell*, 1992 Apr, 69 (2): 295-303.
- Pinkas-Kramarski R; Shelly M; Glathe S; Ratzkin BJ; Yarden Y. Neu differentiation factor/neuregulin isoforms activate distinct receptor combinations. *Journal of Biological Chemistry*, 1996 Aug, 271 (32): 19029-32.
- Qiu Y; Ravi L; Kung H-J. Requirement of ErbB2 for signalling by interleukin-6 in prostate carcinoma cells. *Nature*, 1998 May, 393 (6680): 83-5.
-

Rall LB; Scott J; Bell GI; Crawford RJ; Penschow JD; Niall HD; Coghlan JP. Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. *Nature*, 1985 Jan, 313 (5999): 228-31.

•

Rhee SG; Choi KD. Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *Journal of Biological Chemistry*, 1992 Jun, 267 (18): 12393-6.

•

Riese DJ; Stern DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays*, 1998 Jan, 20 (1): 41-8.

•

Rozakis-Adcock M; Fernley R; Wade J; Pawson T; Bowtell D. The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature*, 1993 May, 363 (6424): 83-5.

•

Ruff-Jamison S; McGlade J; Pawson T; Chen K; Cohen S. Epidermal growth factor stimulates the tyrosine phosphorylation of SHC in the mouse. *Journal of Biological Chemistry*, 1993 Apr, 268 (11): 7610-2.

•

Russo MW; Lukas TJ; Cohen S; Staros JV. Identification of residues in the nucleotide binding site of the epidermal growth factor receptor/kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 1985 May, 260 (9): 5205-8.

•

Sabbatini P; McCormick F. Phosphoinositide 3-OH kinase (PI3K) and PKB/Akt delay the onset of p53-mediated, transcriptionally dependent apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 1999 Aug, 274 (34): 24263-9.

•

San José E; Benguría A; Geller P; Villalobo A. Calmodulin inhibits the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 1992 Jul, 267 (21): 15237-45.

•

Sato K; Sato A; Aoto M; Fukami Y. c-Src phosphorylates epidermal growth factor receptor on tyrosine 845. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995 Oct, 215 (3): 1078-87.

•

Schalkwijk CG; Spaargaren M; Defize LH; Verkleij AJ; van den Bosch H; Boonstra J. Epidermal growth factor (EGF) induces serine phosphorylation-dependent activation and calcium-dependent translocation of the cytosolic phospholipase A2. *European Journal of Biochemistry*, 1995 Aug, 231 (3): 593-601.

•

Schlessinger J. Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends in Biochemical Sciences*, 1988 Nov, 13 (11): 443-7.

•

Serth J; Weber W; Frech M; Wittinghofer A; Pingoud A. Binding of the H-ras p21 GTPase activating protein by the activated epidermal growth factor leads to inhibition of the p21GTPase activity *in vitro*. *Biochemistry*, 1992 Jul, 31 (28): 6361-5.

•

Slieker LJ; Lane MD. Post-translational processing of the epidermal growth factor receptor. Glycosylation-dependent acquisition of ligand-binding capacity. *Journal of Biological Chemistry*,

1985 Jan, 260 (2): 687-90.

- 

Soderquist AM; Carpenter G. Glycosylation of the epidermal growth factor receptor in A-431 cells. The contribution of carbohydrate to receptor function. *Journal of Biological Chemistry*, 1984 Oct, 259 (20): 12586-94.

- 

Soltoff SP. Related adhesion focal tyrosine kinase and the epidermal growth factor receptor mediate the stimulation of mitogen-activated protein kinase by the G-protein-coupled P2Y2 receptor: phorbol ester or  $[Ca^{2+}]_i$  elevation can substitute for receptor activation. *Journal of Biological Chemistry*, 1998 Sep, 273 (36): 23110-7.

- 

Soltoff SP; Carraway KL; Prigent SA; Gullick WG; Cantley LC. ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. *Molecular and Cellular Biology*, 1994 Jun, 14 (69): 3550-8.

- 

Sorkina T; Bild A; Tebar F; Sorkin A. Clathrin, adaptors and eps15 in endosomes containing epidermal growth factor receptors. *Journal of Cell Science*, 1999 Feb, 112 (3): 317-27.

- 

Stein D; Wu J; Fuqua SA; Roonprapunt C; Yajnik V; D'Eustachio P; Moskow JJ; Buchberg AM; Osborne CK; Margolis B. The SH2 domain protein GRB-7 is co-amplified, overexpressed and in a tight complex with HER2 in breast cancer. *European Molecular Biology Organization Journal*, 1994 Mar, 13 (6): 1331-40.

- 

Sternberg PW; Lesa G; Lee J; Katz WS; Yoon C; Clandini TR; Huang LS; Chamberlin HM; Jongeward G. LET-23-mediated signal transduction during *Caenorhabditis elegans* development. *Molecular Reproduction and Development*, 1995 Dec, 42 (4): 523-8.

- 

Stover DR; Becker M; Liebetanz J; Lydon NB. Src phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at novel sites mediates receptor interaction with Src and P85a. *Journal of Biological Chemistry*, 1995 Jun, 270 (26): 15591-7.

- 

Sun H; Chen Z; Poppleton H; Scholich K; Mullenix J; Weipz GJ; Fulgham DL; Bertics PJ; Patel TB. The juxtamembrane, cytosolic region of the epidermal growth factor receptor is involved in association with a-subunit of Gs. *Journal of Biological Chemistry*, 1997 Feb, 272 (9): 5413-20.

- 

Takishima K; Griswold-Prenner I; Ingebritsen T; Rosner MR. Epidermal growth factor (EGF) receptor T669 peptide kinase from 3T3-L1 cells is an EGF-stimulated "MAP" kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991 Mar, 88 (6): 2520-4.

- 

Taylor JM; Mitchell WM; Cohen S. Epidermal growth factor. Physical and chemical properties. *Journal of Biological Chemistry*, 1972 Sep, 247 (18): 5928-34.

- 

Theroux SJ; Taglienti-Sian C; Nair N; Countaway JL; Robinson HL; Davis RJ. Increased oncogenic potential of ErbB is associated with the loss of a COOH-terminal domain serine phosphorylation site. *Journal of Biological Chemistry*, 1992 Apr, 267 (12): 7967-70.

-

Tice DA; Biscardi JS; Nickles AL; Parsons SJ. Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999 Feb, 96 (4):1415-20.

- 

Tiganis T; Kemp BE; Tonks NK. The protein-tyrosine phosphatase TCPTP regulates epidermal growth factor receptor-mediated and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling. Journal of Biological Chemistry, 1999 Sep, 274 (39): 27768-75.

- 

Todderud G; Carpenter G. Presence of mannose phosphate on the epidermal growth factor receptor in A-431 cells. Journal of Biological Chemistry, 1988 Dec, 263 (34): 17893-6.

- 

Toker A. The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. Current Opinion in Cell Biology, 1998 Apr, 10 (2): 254-61.

- 

Torrisi MR; Lotti LV; Belleudi F; Gradini R; Saldini AE; Confalonieri S; Pelicci PG; Di Fiore PP. Eps15 is recruited to the plasma membrane upon epidermal growth factor receptor activation and localizes to components of the endocytic pathway during receptor internalization. Molecular Biology of the Cell, 1999 Feb, 10 (2): 417-34.

- 

Toyoda H; Komurasaki T; Uchida D; Takayama Y; Isobe T; Okuyama T; Hanada K. Epiregulin. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes. Journal of Biological Chemistry, 1995 Mar, 270 (13): 7495-500.

- 

Trowbridge IS; Collawn JF; Hopkins CR. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. Annual Review of Cellular Biology, 1993, 9: 129-61.

- 

Tsai W; Morielli AD; Peralta EG. The m1 muscarinic acetylcholine receptor transactivates the EGF receptor to modulate ion channel activity. European Molecular Biology Organization Journal, 1997 Aug, 16 (15): 4597-605.

- 

Tsui L-C, Farrall M. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 7. In: Human Gene Mapping 11. Cytogenetics and Cell Genetics, 1991, 58: 337-81.

- 

Ullrich A; Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. Cell, 1990 Apr, 61 (2): 203-12.

- 

Ullrich A; Coussens L; Hayflick JS; Dull TJ; Gray A; Tam AW; Lee J; Yarden Y; Libermann TA; Schlessinger J; Downward J; Mayes ELV; Whittle N; Waterfield MD; Seeburg PH. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. Nature, 1984 May-Jun, 309 (5967): 418-25.

- 

Van der Geer P; Pawson T. The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. Trends in Biochemical Sciences, 1995 Jul, 20 (7): 277-80.

- 

Vanhaesebroeck B; Waterfield MD. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. Experimental Cell Research, 1999 Nov, 253 (1): 239-54.



- Vega QC; Cochet C; Filhol O; Chang CP; Rhee SG; Gill GN. A site of tyrosine phosphorylation in the C terminus of the epidermal growth factor receptor is required to activate phospholipase C. *Molecular and Cellular Biology*, 1992 Jan, 12 (1): 128-35.
- Villalobo A; Ruano MJ; Palomo-Jiménez PI; Li H; Martín-Nieto J. The epidermal growth factor receptor and the calcium signal. *In: Calcium: Molecular Basis of Calcium Action in Biology and Medicine* (Pochet R, Donato R, Haiech J, Heizmann C, Gerke V *Eds.*), Kluwer Academic Publishers, Boston MA, 2000 (*in press*).
- Vojtek AB; Der CJ. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 1998 Aug, 273 (32): 19925-8.
- Walker F; Kato A; Gonez LJ; Hibbs ML; Pouliot N; Levitzki A; Burgess AW. Activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway by kinase-defective epidermal growth factor receptors results in cell survival but no proliferation. *Molecular and Cellular Biology*, 1998 Dec, 18 (12): 7192-204.
- Walton GM; Chen WS; Rosenfeld MG; Gill GN. Analysis of deletions of the carboxyl terminus of the epidermal growth factor receptor reveals self-phosphorylation at tyrosine 992 and enhanced *in vivo* tyrosine phosphorylation of cell substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 1990 Jan, 265 (3): 1750-4.
- Waterman H; Sabanai I; Geiger B; Yarden Y. Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. *Journal of Biological Chemistry*, 1998 May, 273 (22): 13819-27.
- Waterman H; Levkowitz G; Alroy I; Yarden Y. The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 1999 Aug, 274 (32): 22151-4.
- Weiss A; Schlessinger J. Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell*, 1998 Aug, 94 (3): 277-80.
- Wells A. EGF receptor. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 1999 Jun, 31 (6): 637-43.
- Wong AJ; Ruppert JM; Bigner SH; Grzeschik CH; Humphrey PA; Bigner DS; Vogelstein B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992 Apr, 89 (7): 2965-9.
- Wood KW; Sarnecki C; Roberts TM; Blenis J. ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. *Cell*, 1992 Mar, 68 (6): 1041-50.
- Yamamoto T; Hihara H; Nishida T; Kawai S; Toyoshima K. A new avian erythroblastosis virus, AEV-H, carries erbB gene responsible for the induction of both erythroblastosis and sarcomas. *Cell*,

1983 Aug, 34 (1): 225-32.

- 

Yamauchi T; Ueki K; Tobe K; Tamemoto H; Sekine N; Wada M; Honjo M; Takahashi M; Takahashi T; Hirai H; Tushima T; Akanuma Y; Fujita T; Komuro I; Yazaki Y; Kadowaki T. Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone. *Nature*, 1997 Nov, 390 (6655): 91-6.

- 

Yarden Y; Schlessinger J. Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation. *Biochemistry*, 1987 Mar, 26 (5): 1434-42.