

Gabriel Wcisło, Cezary Szczylik

Klinika Onkologii, Wojskowy Instytut Medyczny, Centralny Szpital Kliniczny MON w Warszawie

Szlak sygnałowy receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) i potencjalne zastosowanie kliniczne jego blokowania w raku nerki

Inhibition of molecular signaling of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its clinical potential for treating renal cell cancer

Adres do korespondencji:

Gabriel Wcisło, Cezary Szczylik
Klinika Onkologii,
Wojskowy Instytut Medyczny, CSK-MON
ul. Szaserów 128, 04-141 Warszawa
e-mail: gabrielwcislo@yahoo.pl
e-mail: cszczylik@wp.pl

STRESZCZENIE

Rak nerki stanowi około 3% wszystkich rozpoznawanych nowotworów złośliwych. W okresie ostatnich 10 lat stale obserwuje się postęp w zakresie leczenia zaawansowanego i przerzutowego raka nerki. Nowe formy terapii pojawiły się w wyniku prowadzonych prac z zakresu poznania patofizjologii raka nerki na poziomie molekularnym. Wśród potencjalnych celów molekularnych, które mogą mieć znacznie kliniczne w postaci pojawienia się nowego sposobu leczenia, jest receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR). Szlak sygnałowy EGFR jest istotnym elementem w powstawaniu i progresji wielu chorób nowotworowych. W przypadku raka nerki wiedza w zakresie znaczenia tego szlaku molekularnego jest niewielka i częściowo ma związek z niepowodzeniem leczenia chorych na tę chorobę nowotworową z zastosowaniem substancji blokujących EGFR, a które już stosuje się w codziennej praktyce lekarskiej, np. podczas leczenia raka jelita grubego, nowotworów głowy i szyi czy też raka piersi. W tym artykule autorzy omówili rolę szlaku sygnałowego EGFR w odniesieniu do komórek raka nerki oraz opisali wyniki prób klinicznych blokowania szlaku EGFR u chorych na raka nerki.

Słowa kluczowe: rak nerki, EGFR, leczenie celowane

ABSTRACT

Renal cell cancer affects circa 3% of cancer patients diagnosed with malignant disease. We have seen achievements in the treatment of renal cell cancer patients in advanced or metastatic stage for more than ten years. New therapies appeared to be a result of many experimental investigations that let us know pathophysiology of renal cell cancer at the molecular levels. Among well-defined molecular targets, EGFR (epidermal growth factor receptor) seems to have a role when its blocking could provide clinical benefits to renal cell cancer patients. Molecular signaling of EGFR is a crucial factor during development and progression in many malignant diseases. Renal cell cancer is not unveiled at the molecular levels of EGFR functions, and the same limited knowledge is the indirect result of clinical trials some EGFR inhibiting agents, already useful in medical practice of patients with colorectal cancer, head and neck malignancies or breast cancer. This paper presents a role of EGFR signaling in a renal cell cancer cell, and moreover, early results in some of more advanced clinical trials have been described as well.

Key words: renal cell cancer, EGFR, targeted therapy

Onkol. Prak. Klin. 2011; 7, 4: 197–207

Wstęp

Rak nerki stanowi około 3% wszystkich rozpoznawanych nowotworów złośliwych. Ta choroba najczęściej występuje u Amerykanów i Skandynawów. Wysoki odsetek (80–85%) rozpoznawanych guzów nerek to rak wywodzący się z kory i częściej — około 2-krotnie — rozpoznaje się go u mężczyzn niż u kobiet [1]. Historia klasyfikacji guzów nerek sięga 1883 r., kiedy Grawitz [2] wykazał nabłonkowy charakter guzów nerek pochodzących z gruczołu nadnerczowego i ten fakt utrwalono, nadając im nazwę *hypernephroma*. Jednak dopiero w badaniach przeprowadzonych z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego Oberling i wsp. [3] wykazali, że guzy nerek są pochodzenia cewkowego i mają różnorodny charakter. Autorzy nie zaproponowali jednak wstępnej klasyfikacji: przedstawili ją dopiero Thoense i wsp. [4] w 1986 r., wykorzystując kryteria morfologiczne i wyróżniając gruczolaki nerek i raki nerkowokomórkowe.

Postęp badań w zakresie poznania patologii i patofizjologii klinicznej guzów nerek wymagał ponad stu lat. W przypadku nowych sposobów leczenia ten okres oczekiwania skrócił się do około 1/3, czyli wynosił około 30 lat. Przez ten czas, licząc od końca lat 60. i na początku lat 70. do pierwszej dekady XXI w., osiągnięto zasadniczy postęp w zakresie różnych sposobów leczenia guzów nerek, a szczególnie raka nerki. Ważną rolę w powstaniu nowych form terapii raka nerki odegrały badania doświadczane wskazujące na istotne pod względem klinicznym szlaki molekularne, których czynność jest blokowana za pomocą nowych sposobów leczenia systemowego. Jednym z takich celów terapeutycznych jest szlak receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGF, *epidermal growth factor*).

Zmiany genetyczne w zakresie genów *VHL*, *MET*, *VEGFR* oraz *EGFR* odgrywają istotną rolę w patofizjologii komórek raka nerki, co potwierdzono na poziomie genowym oraz białkowym [5]. W trakcie badań molekularnych ustalono funkcjonalne zależności między różnymi szlakami biochemicznymi, na przykład pomiędzy Met-HGF/SF (*Met-hepatocyte growth factor/scatter factor*), PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*), PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10*), AKT, mTOR oraz EGFR [6–9].

Ekspresja i funkcje EGFR w raku nerki

Receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) jest białkiem zlokalizowanym na powierzchni komórek, podlegającym aktywacji w wyniku przyłączenia się specyficznych ligandów, którymi są EGF oraz czynnik wzrostu guza alfa (TGF- α , *tumor growth factor1 alpha*). W wyniku aktywacji pod wpływem ligandów forma monomeryczna EGFR tworzy

homodimery lub może tworzyć heterodimery z innymi białkami tej rodziny receptorów, na przykład z HER2, co powoduje aktywację szlaku sygnałowego EGFR bez potrzeby przyłączenia się ligandów. W wyniku dimeryzacji dochodzi do autofosforylacji kinazy tyrozynowej końca karboksylowego EGFR, co w efekcie prowadzi do aktywacji „w dół” innych białek charakteryzujących się domeną SH. Natomiast kaskada przekazywania sygnału obejmuje aktywację MAPK, AKT, czy też JNK, które są odpowiedzialne za syntezę DNA i proliferację komórek [10, 11].

Oryginalne badania kliniczno-patologiczne przeprowadzone u chorych na raka nerki wykazały prognostyczną rolę ekspresji EGFR. W jednym z pierwszych badań tego rodzaju, Uhlman i wsp. [12] przebadali ekspresję EGFR oraz TGF- α metodą immunohistochemiczną u 19 chorych na raka nerki brodawkowatego (*papillary*), 149 chorych na raka nerki typu *nonpapillary* oraz 7 chorych z mieszaną postacią guza nerki. Rak nerki typu brodawkowatego wiązał się z istotnie mniejszym odsetkiem ekspresji EGFR niż rak nerki typu *nonpapillary* (21% vs. 73%, $p < 0,001$). Stwierdzenie ekspresji EGFR w guzie pierwotnym wiązało się z pojawieniem się przerzutów odległych w płucach i w mniejszym stopniu w kościach. Moch i wsp. [13] w grupie 50 chorych wykazali, że ekspresja EGFR ma istotnie statystyczny ($p < 0,05$) związek z aktywnością proliferacyjną komórek raka nerki, wyrażoną odsetkiem ekspresji markera Ki-67 (MIB-1). Autorzy wykazali trend wskazujący na krótszy czas przeżycia u chorych na raka nerki z ekspresją EGFR ($p = 0,08$). Badacze japońscy wykazali zwiększone (19-krotnie) stężenie mRNA kodującego EGFR w porównaniu z ekspresją tego mRNA wyizolowanego z otaczających zdrowych tkanek, i nie stwierdzili mutacji w genie kodującym ten receptor [14].

Z powodu braku jednoznacznych wyników badań wskazujących na rolę ekspresji EGFR w guzach raka nerki Kallio i wsp. z Finlandii [15] przeprowadzili badanie kliniczno-patologiczne, którego celem było określenie roli prognostycznej ekspresji badanego markera z uwzględnieniem lokalizacji ekspresji, czyli w cytoplazmie lub na błonach komórkowych komórek raka nerki. Część badań wskazuje na negatywny wpływ prognostyczny ekspresji EGFR u chorych na raka nerki, natomiast pojawiły się także wyniki badań wskazujące na pozytywny wpływ prognostyczny ekspresji tego markera [16]. W badaniu fińskim wzięło udział 134 chorych na raka nerki, u których oznaczono ekspresję EGFR metodą immunohistochemiczną, dodatkowo oceniając lokalizację ekspresji w błonach komórkowych, w cytoplazmie lub brak ekspresji. Chorzy, u których stwierdzono ekspresję błonową EGFR, statystycznie żyli dłużej niż pacjenci z ekspresją cytoplazmatyczną tego markera lub bez [współczynnik ryzyka (HR, *hazard ratio*): 8,0; 95-procentowy przedział ufności (CI, *confidence interval*):

2,0–33,2; $p = 0,004$; analiza jednoczynnikowa]. Autorzy nie stwierdzili zależności między ekspresją EGFR i jego lokalizacją w odniesieniu do stopnia zaawansowania raka nerki, natomiast wykazali taką istotną zależność z klasyfikacją złośliwości biologicznej według Fuhrmana (75% w stopniu I vs. 14,3% w stopniu 4. o lokalizacji błonowej EGFR; $p = 0,001$). Natomiast w badaniu przeprowadzonym przez Merseburger i wsp. [17] w grupie 149 chorych zakwalifikowanych do wykonania nefrektomii nadmierną ekspresję błonowego EGFR stwierdzono u 47% badanych (70 chorych), u których rozpoznano raka nerki, podczas gdy u chorych ze zmianami łagodnymi odsetek ten wynosił 9% (12 pacjentów) ($p < 0,0001$). Intensywność ekspresji błonowego EGFR miała istotny wpływ na czas przeżycia całkowitego. Rokowanie w grupie chorych na raka nerki z intensywną ekspresją błonowego EGFR było złe ($p < 0,03$). Wyniki badań grupy niemieckiej potwierdzili autorzy chińscy, którzy wykazali nadmierną ekspresję błonowego EGFR w komórkach raka nerki w porównaniu z komórkami zdrowych tkanek ($p < 0,001$), natomiast ekspresję cytoplazmatyczną EGFR stwierdzano głównie w komórkach prawidłowych ($p < 0,001$) [18].

Z badań klinicznych przeprowadzonych u chorych na raka jelita grubego wiadomo, że skuteczność terapii skierowanej przeciwko EGFR zależy od statusu ekspresji typu dzikiego *KRAS* i *BRAF*. Mutacje aktywujące wymienione czynniki molekularne są odpowiedzialne za zmniejszenie odsetka odpowiedzi na zastosowane leczenia panitumumabem do około 10%. Dlatego Gattenlohner i wsp. [19] przeprowadzili badanie w grupie 121 chorych na raka nerki w zakresie zaawansowania od stopnia pT1 do pT3, u których oceniono ekspresję *KRAS* i *BRAF*. W badanej grupie chorych na raka nerki typu *nonpapillary* i *papillary* nie stwierdzono mutacji aktywujących czynniki molekularne *KRAS* i *BRAF*. Natomiast stwierdzono mutacje tych czynników molekularnych u pojedynczych chorych na guzy dróg moczowych wywodzące się z nabłonka przejściowego. Latif i wsp. [20] w grupie 27 chorych na raka nerki ocenili ekspresję *HER2*, markera molekularnego istotnego pod względem klinicznym dla chorych na raka piersi oraz raka żołądka. Badanie przeprowadzono metodą immunohistochemiczną i fluoroscencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH, *fluorescence in situ hybridisation*). Amplifikacji genu *HER2* nie stwierdzono ani w jednym przypadku chorych na guza łagodnego nerki, natomiast nadmierną ekspresję tego markera odnotowano u 7 (26%) chorych na raka nerki. Zgromadzone dane dotyczące ekspresji *HER2* są przeciwstawne, ponieważ w części badań wykazano ekspresję tego markera — na poziomie białkowym — u 40% chorych na raka nerki, natomiast na poziomie amplifikacji genu — u 17%. Jednak w części badań nie potwierdzono tych wyników [20].

Ważną grupą zagadnień jest poszukiwanie innych, dodatkowych czynników molekularnych, jakie mogą

istotnie wpływać na funkcje EGFR w komórkach raka nerki. Taką zależność zaobserwowano między funkcją EGFR a TEFs (*trefoil peptides*). Te ostatnie uważa się za czynniki rozpraszania istotnie wpływające na inwazję komórek w otaczające podścielisko za pośrednictwem cyklooksygenazy 2 oraz receptora trombokasanu A2. Wpływają one na zwiększenie inwazyjności komórek raka nerki, raka jelita grubego poprzez aktywność proangiogenną oraz indukującą procesy zapalne. Zablokowanie funkcji EGFR za pomocą gefitynibu przyczyniło się do zahamowania inwazji badanych komórek indukowanych TEFs [21–22]. Kinaza tyrozynowa ACK-1 (*activated Cdc42-associated kinase*) jest kinazą niezwiązaną z receptorem, która współdziała z Cdc 42 oraz EGFR. Mutacja tego czynnika molekularnego jest istotnym zjawiskiem obserwowanym w patofizjologii raka płuca, gruczołu krokowego, jajnika, żołądka. Zmutowana postać ACK-1 wpływa na proliferację komórek, migrację oraz ich wzrost. Kodowane przez zmutowany gen zmienione białko ACK-1 nie wiąże się z ubikwitiną i wykazuje oporność na działanie proteasomu, stąd ta postać stale aktywnego białka ACK-1 wpływa na stabilizację EGFR po przyłączeniu się ligandu EGF [23]. Spośród dodatkowych czynników molekularnych należy zwrócić uwagę na metaloproteiny. Są to enzymy pozwalające na inwazję komórek w otaczające podścielisko, co istotnie wpływa na dostępność czynników wzrostu do odpowiednich receptorów zlokalizowanych na komórkach rakowych. Jednocześnie metaloproteiny wpływają na uwalnianie wielu cytokin związanych z błoną komórkową. Przykładem takiego enzymu jest ADAM17, którego zablokowanie wpływa na zahamowanie postępu takich chorób zapalnych jak reumatoidalne zapalenie stawów czy też udar niedokrwienny. W badaniu eksperymentalnym *in vitro* oraz *in vivo* wykazano, że zablokowanie ADAM17 za pomocą RNAi zahamowało wzrost guzów raka nerki poprzez zablokowanie funkcji EGFR w wyniku zahamowania zrzucania związanego z błoną komórkową TGF- α [24].

Rola NF-2 (merlin) w regulacji ekspresji EGFR w komórkach raka nerki

Merlin jest białkiem kodowanym przez gen *NF-2* zlokalizowany na chromosomie 22. Białko to należy do rodziny ERM, a nazwa jest skrótem „*moesin-ezrin-radix-like protein*”. U kręgowców merlin ma masę 70 kDa i występuje w 10 izoformach. Koniec aminowy ma strukturę zawierającą domenę FERM (jest to składnik większości białek łączących cytoplazmę z błonami komórkowymi). Merlin podlega dimeryzacji, w tym tworzy heterodimery z innymi białkami rodziny ERM. Zadania tego białka w komórce polegają na tworzeniu stabilnego

rusztowania poprzez łączenie się z filamentami aktyny oraz glikoproteinami zlokalizowanymi w błonach komórkowych. Największą zawartość białka merlin mają tkanka nerwowa i tkanki płodowe. Fosforylacja tego białka prowadzi do jego aktywacji, co przyczynia się do przekazywania sygnału wewnątrz komórki za pomocą takich czynników jak: CD44, kinaza proteinowa A oraz aktywowane kinazy p21 [25–28].

Niedobór funkcjonalny genu *NF-2* prowadzi do powstawania guzów nowotworowych u ludzi i myszy. W prawidłowych komórkach białko merlin, kodowane przez gen *NF-2*, odgrywa ważną rolę w przyleganiu międzykomórkowym. Brak funkcji białka merlin przyczynia się do braku możliwości zahamowania wzrostu sąsiadujących komórek w wyniku przylegania kontaktowego. Omawiane białko spełnia ważne funkcje strukturalne w przyleganiu kontaktowym poprzez tworzenie stabilnego rusztowania z kadheryną [29]. Stabilizacja złącza kontaktowego wiąże się także z negatywnym wpływem białka merlin na EGFR zlokalizowanym w błonie komórkowej, z której w warunkach prawidłowych osłabione jest przekazywanie sygnału do wnętrza komórki oraz internalizacja receptora. W komórkach pozbawionych ekspresji genu *NF-2* obserwuje się stałą aktywność EGFR stymulującą proliferację komórek. Zablockowanie EGFR prowadzi do zahamowania proliferacji komórkowej [30, 31].

Mutacje homozygotyczne prowadzące do wypadnięcia funkcji antyonkogenu *NF-2* u chorych na raka nerki występują u około 2% chorych na raka nerki. Rolę EGFR w powstawaniu guza nerki ustalono u myszy, u których doprowadzono do delecji genu *NF-2* *-/-* w komórkach krętych kanalików proksymalnych. W ciągu 3 miesięcy u wszystkich myszy tego typu dochodziło do rozwoju guzów nerek, które w ciągu następnych 6–10 miesięcy ulegały progresji przejawiającej się wzrostem guza pierwotnego będącego już rakiem. Już w pierwszym okresie wzrostu licznych guzów wypełniających światło proksymalnych kanalików krętych istotną rolę odgrywał EGFR. Powstałe guzy rakowe po wszczepieniu zwierzętom doświadczalnym, bez pasażowania *in vitro*, tworzyły guzy nowotworowe, które okazały się być wrażliwe na działanie inhibitora EGFR — erlotynibu. Badane guzy rakowe także przestały wzrastać po zastosowaniu terapii genowej przywracającej ekspresję genu *NF-2* [32]. Rolę antyonkogenna *NF-2* w postaci regulowania wielkości wątroby oraz możliwości powstawania guzów rakowych wątroby przedstawił zespół badaczy z Kalifornii i Massachusetts [33, 34].

Zależność regulacyjna między VHL a EGFR w raku nerki

Koncepcję istnienia genów odpowiedzialnych za zahamowanie wzrostu guzów nowotworowych popierają

wyniki badań dotyczących fuzji komórek prawidłowych i nowotworowych. Po tym zabiegu komórki nowotworowe nie wykazywały aktywności inicjującej powstawanie guzów nowotworowych [35, 36]. Badania statystyczne dotyczące zachorowania na guza Wilmsa oraz *retinoblastoma* wykazały również istnienie genów hamujących powstawanie guzów nowotworowych. Badania te przeprowadził Knudson [37, 38], który wykazał potrzebę mutacji drugiego z antyonkogenów, pochodzącego od matki, wobec już istniejącej uprzednio mutacji allelu tego antyonkogenu pochodzącego od ojca.

Choroba von Hippel-Lindau jest schorzeniem dziedzicznym autosomalnie dominującym, a głównym mechanizmem sprawczym jest mutacja germinalna antyonkogenu *VHL* (*von Hippel-Lindau*). Mutacja tego rodzaju jest przyczyną pojawienia się wielu schorzeń o charakterze biologicznie łagodnym, ale także i złośliwym. Częstość występowania choroby von Hippel-Lindau szacuje się na 1 przypadek pojawiający się na 36 tysięcy żywych porodów z 90-procentową penetracją trwającą do 65. roku życia. Diagnostyka tej choroby opiera się na spełnieniu określonych kryteriów. Rodzinna historia zachorowania na chorobę von Hippel-Lindau dotyczy występowania naczyniaka krwionośnego zarodkowego (*hemangioblastoma*) zlokalizowanej w ośrodkowym układzie nerwowym, guza chromochłonnego (*pheochromocytoma*) lub raka jasnokomórkowego nerki. U osób bez rodzinnego występowania tych schorzeń kryteria rozpoznania choroby von-Hippel-Lindau wymagają stwierdzenia dwóch lub większej liczby naczyniaków krwionośnych zarodkowych ośrodkowego układu nerwowego oraz guza w jamie brzusznej (z wyjątkiem torbieli nerek i najądrza — często występujące w ogólnej populacji) [39, 40].

Patofizjologia choroby von Hippel-Lindau i innych opisanych jednostek chorobowych wiąże się z uszkodzeniem antyonkogenu *VHL*. Jest on zlokalizowany na chromosomie 3. (3p25-26). Zgodnie z hipotezą Knudsona dziedziczna postać choroby von Hippel-Lindau wiąże się z występowaniem germinalnej mutacji jednego allelu *VHL*, a mutacja drugiego allela tego antyonkogenu ma charakter somatyczny i stąd różnice w klinicznym obrazie przebiegu tej złożonej choroby. Antyonkogen *VHL* jest składową kompleksu białkowego zawierającego elonginę B, elonginę C oraz CUL 2. Ważną składową częścią tego kompleksu jest czynnik indukowany hipoksją (*HIF*, *hypoxia-inducible factor*). W przypadku mutacji *VHL* nie istnieje możliwość degradacji tego kompleksu stworzonego razem z *HIF*, który zwiększa produkcję czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (*VEGF*, *vascular endothelial growth factor*) i innych biologicznie aktywnych substancji odpowiedzialnych za powstawanie guza nowotworowego [41].

Badania doświadczalne przeprowadzone na liniach komórkowych raka jasnokomórkowego nerki wykazały

istotną rolę biologiczną antyonkogenu *VHL*. Przywrócenie jego funkcji w badanych komórkach o profilu ekspresji *VHL* $-/-$ prowadziło do zahamowania wzrostu guzów w organizmach zaszczepionych badanych myszy. W komórkach raka jasnokomórkowego nerki o charakterze sporadycznym stwierdzono inaktywację *VHL* u około 55% chorych, co wykazano w trakcie badań kliniczno-patologicznych [42, 43]. Dokładne badania doświadczalne potwierdziły istotną rolę utraty funkcji antyonkogenu *VHL* w powstawaniu guzów nerek charakteryzujących się znacznym stopniem unaczynienia. Badania tego typu wykazują także mechanizmy molekularne, które są odpowiedzialne za powstawanie raka nerki.

Utrata funkcji antyonkogenu *VHL* w wyniku mutacji prowadzi do stałej stymulacji powstawania HIF oraz VEGF. To właśnie te czynniki molekularne są odpowiedzialne za występowanie bogatej siatki naczyniowej w guzach raka nerki. Kolejnym czynnikiem regulowanym przez HIF jest TGF- α . Indukcja powstawania tej cytokiny pozwoliła wykazać, że TGF- α jest czynnikiem autokrynnie pobudzającym proliferację komórek raka nerki o profilu *VHL* $-/-$ oraz komórek, u których przywrócono funkcje tego antyonkogenu. Takiej zależności nie obserwowano w przypadku VEGF oraz TGF- β 1 [44]. Powstający w opisanym mechanizmie TGF- α potrafi uniezależnić badaną linię komórkową raka nerki od surowicy, czego nie obserwowano w przypadku innych cytokin [45]. Kodowane przez antyonkogen *VHL* białko łączy się z podjednostką alfa cząsteczki HIF, co funkcjonalnie prowadzi do przyłączenia się ubikwityny i w ten sposób HIF ulega degradacji przez proteasom. W przypadku stwierdzenia mutacji *VHL* ten mechanizm nie działa i stale funkcjonujący czynnik HIF aktywuje docelowe geny odpowiedzialne za progresję raka nerki, między innymi poprzez syntezę TGF- α i VEGF. Zablockowanie EGFR (receptor dla TGF- α) za pomocą RNAi hamuje proliferację badanych komórek i uniezależnia je od aktywności HIF [46]. Jednocześnie istnieją dowody eksperymentalne wskazujące na istotną rolę hipoksji oraz czynnika HIF-2 α w indukowaniu nadmiernej ekspresji EGFR bez mutacji, co wykazano na poziomie mRNA i białka [47]. Natomiast indukowanie doświadczalnego raka nerki za pomocą streptozocyny jest niezależne od opisanych molekularnych mechanizmów [48].

Modulowanie ekspresji EGFR za pomocą interferonu-alfa i bortezomibu

Interferon- α jest białkiem powstającym, w warunkach naturalnych, w leukocytach w odpowiedzi ze strony układu odpornościowego na infekcję wirusową. Ponadto cytokina ta ma właściwości pirogenne poprzez działanie ośrodkowe na neurony podwzgórza. Mechanizm działania

interferonu- α polega na przyłączeniu się do receptora IFNAR składającego się z dwóch łańcuchów INFAR1 oraz INFAR2 [49]. Interferon- α działa, hamując proliferację zarówno na komórki prawidłowe, jak i transformowane nowotworowo. Antyproliferacyjne działanie interferonu- α pojawia się w okresie 24–48 godzin. Poznano kilka mechanizmów prowadzących do zahamowania proliferacji, wśród których znajduje się zmniejszenie ekspresji receptorów dla insuliny, transferyny i EGF. Interferon- α zmniejsza ekspresję EGFR jedynie w komórkach raka nerki, które wykazują wrażliwość na antyproliferacyjne działanie tej cytokiny [50].

Bortezomib (Velcade) jest pierwszym lekiem blokującym funkcje proteasomu, który jest dużym kompleksem białkowym składającym się z części korowej, wyglądającej jak wydrążony pień drzewa oraz dwóch przykrywek. Część korowa [20 S (jednostek Svedberga)] zbudowana jest z dwóch pierścieni zawierających podjednostki α (zewnątrzna część o charakterze strukturalnym) oraz podjednostki β , znajdujące się wewnątrz i charakteryzujące się aktywnością katalityczną. Przykrywki (19S) odgrywają ważną rolę podczas detekcji naznaczonych ubikwityną białek docelowych, które mają być degradowane do mniejszych peptydów, które z kolei są już degradowane do aminokwasów pod wpływem peptydaz [51]. Bortezomib jest lekiem peptydowym (Pyz,-Phe-boro-Leu), który zawiera atom boru spełniający ważną funkcję podczas blokowania miejsc katalitycznych podjednostek β proteasomu. Od 2008 r. lek ten zarejestrowano do leczenia szpiczaka mnogiego oraz chłoniaków z komórek płaszczka. Toksyczność głównie obejmuje neuropatię występującą u około 30% chorych, neutropenię i małopłytkowość, chorzy stosunkowo często zapadają także na półpasiec [52, 53]. Badania modelowe przeprowadzone na komórkach raka nerki wykazały, że skuteczność bortezomibu zależy od skuteczności blokowania czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Natomiast ten czynnik transkrypcyjny jest jednym z celów szlaku sygnałowego zapoczątkowanego przez aktywację EGFR poprzez kinazę fosfatydyloinozitolową-3/AKT. Skojarzenie inhibitora kinazy EGFR (PD153035) z bortezomibem pozwala uzyskać synergizm działania cytotoksycznego wymienionych substancji, natomiast antagonizm działania stwierdzono w sytuacji wcześniejszego działania bortezomibu z następowym stosowaniem PD153035. Omówione badanie miało charakter eksperymentalny i przeprowadzono je na liniach komórkowych raka nerki [54].

Zastosowanie gefitynibu w leczeniu chorych na raka nerki

Gefitynib jest małą cząsteczką selektywnie blokującą kinazę tyrozynową domeny EGFR. W 2009 r. gefitynib

zarejestrowano do leczenia niedrobnokomórkowego raka płuca u chorych z występującą mutacją w zakresie genu kodującego EGFR. Decyzja o nowej rejestracji gefitynibu zapadła po przeprowadzeniu badania IPASS, w którym wzięło udział 1217 chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca, którzy nigdy lub od dawna już nie używali tytoniu. U chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca z mutacją EGFR stwierdzono istotnie statystycznie wydłużenia czasu do progresji (HR: 0,48; 95% CI: 0,36–0,64; $p < 0,0001$) po zastosowaniu gefitynibu niż po chemioterapii składającej się z paklitakselu i karboplatyny [55]. Wrażliwość raka nerki na działanie gefitynibu w odniesieniu do występowania mutacji w genie kodującym EGFR stwierdzono w jednym przypadku — chorego intensywnie przeleczonego interferonem, interleukiną-2 i tamoksyfenem. W badaniu reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) stwierdzono delecję 15 par zasad, co przyczyniło się do utraty około 750 aminokwasów w białku EGFR. Gefitynib zastosowano w dawce 500 mg doustnie dziennie, a następnie w dawce 250 mg doustnie dziennie z powodu toksyczności skórnej. W ciągu 4 miesięcy stwierdzono zmniejszenie się guzów przerzutowych w płucach do 30% i tę odpowiedź określono jako stabilizację. W ciągu następnych 3 miesięcy stwierdzono progresję w płucach i pojawienie się ognisk przerzutowych w mózgu, które przyczyniły się do zgonu [56].

Badania eksperymentalne przeprowadzone *in vitro* na komórkach raka nerki wykazały, że w 70% linii komórkowych raka nerki występuje nadmierna ekspresja EGFR, a pod wpływem działania gefitynibu istotnie ($p < 0,001$) zmniejszyła się produkcja VEGF i interleukiny-8 do nadszczu [57]. W badaniach eksperymentalnych *in vivo* wykazano, że komórki raka nerki mysiej linii komórkowej RENCA przestały proliferować, a w guzach rakowych stwierdzono zmniejszenie gęstości siatki naczyńowej pod wpływem działania gefitynibu [58]. Dodatkowo badania *in vitro* wykazały synergizm w działaniu przeciwnowotworowym między paklitaksem a gefitynibem. Ten ostatni potęgował zmniejszenie ekspresji białka hamującego apoptozę — bcl-2 — pod wpływem paklitakselu, co prowadziło do nasilonej apoptozy [59]. W badaniu eksperymentalnym przeprowadzonym na liniach komórkowych raka nerki Gemmill i wsp. [60] wykazali synergizm działania między gefitynibem a rapamycyną (inhibitor mTOR), szczególnie w stosunku do komórek raka nerki z ekspresją genu typu dzikiego *VHL*. W badaniach doświadczalnych zwrócono uwagę na ufosforylowaną postać AKT, która potencjalnie może stać się markerem wskazującym na wytworzenie się oporności na działanie gefitynibu względem raka nerki [61].

W tabeli 1 przedstawiono wyniki badań klinicznych nad zastosowaniem gefitynibu u chorych na raka nerki. Najczęściej badania konstruowano zgodnie z definicją

fazy II badania klinicznego, w których brało udział po kilkudziesięciu chorych, stąd bardzo trudno dokonać uogólnienia w stosunku do rzeczywistej skuteczności gefitynibu u chorych na raka nerki. Natomiast profil toksyczności we wszystkich badaniach pokrywa się i wskazuje na reakcje skórne, biegunkę oraz osłabienie.

Wykorzystanie erlotynibu do leczenia raka nerki

Erlotynib jest małą cząsteczką (429,9 Da) stosowaną doustnie hamującą aktywność kinazy tyrozynowej EGFR poprzez współzawodniczenie o miejsce wiązania z cząsteczkami ATP. Blokowanie funkcji kinazy tyrozynowej ma charakter odwracalny. Erlotynib jest metabolizowany pod wpływem cytochromu P450 (CYP3A4) i wydalany w 86% ze stolcem. Obecnie erlotynib jest zarejestrowany do stosowania w leczeniu raka niedrobnokomórkowego płuca drugiej linii oraz do terapii zaawansowanego lub przerzutowego raka trzustki w skojarzeniu z gemcytabiną [67, 68]. W przypadku raka niedrobnokomórkowego płuca leczenie podtrzymujące erlotynibem wydłuża istotnie czas przeżycia całkowitego i czas do progresji, co wykazano w badaniu SATURN [69]. Badania eksperymentalne dotyczące stosowania erlotynibu względem komórek nabłonka nerki (*Madin-Darby canine kidney II*) wykazały istotną rolę białek transportujących ksenobiotyki z rodziny ABC, do której zaliczają się: MDR-1 (*multidrug resistance 1*; koduje *P-glycoprotein*; ABCB1), BCRP (*breast cancer resistance protein*; ABCG2), MRP-2 (*multidrug resistance-2*; ABCC2). W badaniach *in vitro* wykazano, że erlotynib jest aktywnie transportowany za pomocą MDR-1 oraz BCRP. Natomiast w trakcie badań *in vivo* wykazano, że u myszy o profilu BCRP1/MDR-1 *-/-* biodostępność erlotynibu była istotnie większa (60,4% vs. 40%; $p = 0,02$) niż u myszy z grupy kontrolnej [70].

W tabeli 2 przedstawiono wyniki badań dotyczących zastosowania erlotynibu w monoterapii lub w skojarzeniu z innymi lekami u chorych na zaawansowanego lub przerzutowego raka nerki, głównie jasnokomórkowego, ale z uwzględnieniem raka brodawczakowatego w jednym badaniu klinicznym [76]. W większości badań wzięło udział po kilkudziesięciu chorych, u których stosowano erlotynib w dawce 150 mg dziennie doustnie. Te badania definiowano jako fazę II lub I/II. Można zauważyć, że w porównaniu z gefitynibem w większości badań erlotynib stosowano razem z bewacyzumabem, co jest kliniczną próbą blokowania dwóch ważnych dla rozwoju raka nerki mechanizmów, takich jak angiogeneza (bewacyzumab) oraz blokowanie aktywności EGFR (erlotynib). Zgromadzone dane są zbyt skąpe, aby można było sformułować istotne wnioski klinicznie. Podobnie

Tabela 1. Wyniki badań klinicznych dotyczących stosowania gefitynibu u chorych na raka nerki w postaci uogólnionej

Table 1. Clinical results of gefitinib use in metastatic renal cell cancer

Autor	Faza badania klinicznego	Liczba chorych (n)	Leczenie	RECIST	Odpowiedź Mediana TTP, PFS, OS (miesiące)	Toksyczność o znaczeniu klinicznym
Jermann i wsp. [62]	II	28	Gefitynib 500 mg/d. p.o.	SD: 53,8%	PFS: 3,6 OS: 9,8	Wysypka skórna: 54% Biegunka: 39%
Dawson i wsp. [63]	II	21	Gefitynib 500 mg/d. p.o.	SD: 38%	PFS: 2,7 OS: 8,3 OS, gdy PD: 6,1 OS, gdy SD: 16+	Biegunka: 14,2%
Drucker i wsp. [64]	II	18	Gefitynib vs. interferon- α	PD: 81% po 4 m. vs. PD: 40% po 4 m.	TTP: 4,7 vs. TTP: -	-
Amato i wsp. [65]	II	17 (14 oceniono)	Interferon- α 3 mln j. s.c. 3 x tygodniowo przez 12 tygodni, następnie 6 mln. j. s.c. + gefitynib (n = 14) 500 mg/d. p.o. lub imatynib 600 mg/d. p.o.	PR: 21% SD: 50% PD: 29%	TTP: 4,27 OS: 11,42	Wysypka, objawy grypopodobne, osłabienie, biegunka po gefitynibie, trombocytopenia, leukopenia
Motzer i wsp. [66]	I/II	42 (11 — faza I 31 — faza II)	Gefitynib 250 mg/d. p.o. + sunitynib 37,5 mg lub 50 mg/d. p.o. przez 4 tygodnie (2 tygodnie przerwy)	PR: 37% SD: 34%	PFS: 11	Biegunka: 14%

d. — dzień, dni, dziennie; m. — miesiące; p.o. (per os) — doustnie; s.c. (sub cutaneous) — podskórnym; PR (partial response) — odpowiedź częściowa; SD (stable disease) — stabilizacja; PD (progressive disease) — progresja; RECIST — Response Evaluation Criteria in Solid Tumors; TTP (time to progression) — czas do progresji; PFS (progression free survival) — czas wolny od progresji; OS (overall survival) — przeżycie całkowite; mln — miliony; j. — jednostki międzynarodowe

Tabela 2. Wyniki badań klinicznych dotyczących stosowania erlotynibu u chorych na raka nerki w postaci zaawansowanej lub uogólnionej

Table 2. Clinical results of erlotinib in advanced or metastatic renal cell cancer

Autor	Faza badania klinicznego	Liczba chorych (n)	Leczenie	RECIST	Odpowiedź Mediana TTP, PFS, OS (miesiące)	Toksyczność o znaczeniu klinicznym
Beeram i wsp (71)	II (ocena farmakokinetyki i obrazowanie PET)	40	Erlotynib 150 mg/d. p.o.	SD: 2,5%	—	—
Flaig i wsp (72)	II (PD po leczeniu sunitynibem/sorafenibem)	25	Erlotynib 150 mg/d. p.o. + sunitynib 6 mg lub sorafenib 2 mg/d., d. 8.	SD: 21,8% > 6 m.	PFS: 2,8 OS: 9,2	Wysypka skórna; biegunka
Hainsworth i wsp (73)	II	63 (59 oceniono)	Erlotynib 150 mg/d. p.o. + bewacyzumab 10 mg/kg i.v. co 2 tygodnie	OR: 25% SD: 61% PD: 14%	PFS: 11 Przeżycie po 18 miesiącach — 60%	Wysypka skórna
Hainsworth i wsp (74)	I/II	94 (88 oceniono)	Erlotynib 150 mg/d. p.o. + bewacyzumab 10 mg/kg i.v. co 2 tygodnie	PR: 17% SD: 50% PD: 29%	PFS: 8,9 OS: 17,2	Wysypka skórna, biegunka, osłabienie (3./4. stopnia)
Bukowski i wsp (75)	II randomizowane	104	Erlotynib 150 mg/d. p.o. + bewacyzumab 10 mg/kg i.v. co 2 tygodnie vs. bewacyzumab 10 mg/kg i.v. co 2 tygodnie	OR: 14% vs. OR: 13%	PFS: 11 OS: 20 vs. PFS: 8,5 OS: nie uzyskano	Nadciśnienie tętnicze; wysypka skórna; białkomocz; biegunka; krwawienie; 1 zgon z powodu perforacji przewodu pokarmowego w grupie erlotynib + bewacyzumab
Gordon i wsp [76] rak nerki broadczakowaty	II	52 (45 oceniono)	Erlotynib 150 mg/d. p.o.	PR: 11% SD: 53% Kontrola raka: 64%	TTP: po 6 miesiącach — 29% OS: 27	Zapalenie płuc; zakrzepica

d. — dzień, dni, dziennie; p.o. (per os) — doustnie; s.c. (sub cutaneous) — podskórnie; PR (partial response) — odpowiedź częściowa; SD (stable disease) — stabilizacja; PD (progressive disease) — progresja; RECIST — Response Evaluation Criteria in Solid Tumors; TTP (time to progression) — czas do progresji; PFS (progression free survival) — czas wolny od progresji; OS (overall survival) — przeżycie całkowite; mln — miliony; j. — jednostki międzynarodowe

jak w przypadku gefitynibu we wszystkich badaniach pokrywa się profil toksyczności.

Badania nad klinicznym wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych (cetuksymab, panitumumab) blokujących EGFR u chorych na raka nerki

Blokowanie funkcjonalne zewnątrzkomórkowej domeny EGFR za pomocą przeciwciał monoklonalnych w skojarzeniu z chemioterapią okazało się skuteczną formą terapii u chorych na przerzutowego raka jelita grubego oraz raków głowy i szyi. Cetuksymab jest chimerycznym mysio/ludzkim przeciwciałem monoklonalnym klasy IgG1 skierowanym przeciwko EGFR stosowanym w postaci wlewów dożylnych. Mechanizm działania tego przeciwciała obejmuje hamowanie proliferacji komórkowej i indukowanie apoptozy. Dodatkowo wykazano także modulowanie czynności cytotoksycznej zależnej od aktywności komórek immunokompetentnych ADCC (*antibody dependent cellular cytotoxicity*) [77, 78]. Panitumumab jest ludzkim przeciwciałem monoklonalnym klasy IgG2 skierowanym przeciwko domenie zewnątrzkomórkowej EGFR. W przypadku tego przeciwciała po raz pierwszy wykazano rolę predykcyjną statusu onkogenu *KRAS* (obecność postaci dzikiej lub zmutowanej) u chorych na raka jelita grubego. Obecność *KRAS* typu dzikiego zarówno w przypadku panitumumabu oraz cetuksymabu ma istotne klinicznie znaczenie w kontekście skuteczności terapeutycznej [79–81].

Badania eksperymentalne przedkliniczne wskazywały na potencjalne możliwości terapeutyczne cetuksymabu (C225) u myszy, którym wszczepiono linie komórkowe raka nerki, w których stwierdzono ekspresję EGFR. Cetuksymab hamował proliferację komórkową oraz wzrost odsetka komórek podlegających apoptozie, co wyrażało się zmniejszeniem się wielkości guzów raka nerki [82]. Motzer i wsp. [83] przeprowadzili badanie kliniczne fazy II, w którym chorzy ($n = 55$) na przerzutowego raka nerki otrzymali cetuksymab ($400\text{--}500\text{ mg/m}^2$, a następnie dawka podtrzymująca 250 mg/m^2), który nie był skuteczny klinicznie, ponieważ nie odnotowano odpowiedzi obiektywnych, a mediana czasu do progresji wynosiła 57 dni. Badacze stwierdzili typowy profil toksyczności związany z terapią tym przeciwciałem, czyli skórne zmiany trądzikowe (17%) oraz suchość skóry (4%). W przypadku panitumumabu przeprowadzono badanie fazy I/II, w którym wzięło udział łącznie 88 chorych na przerzutowego raka nerki uprzednio poddanych immunoterapii z zastosowaniem cytokin. Chorzy otrzymali cztery poziomy dawki panitumumabu, czyli $1,0\text{ mg/kg/tydzień}$; $1,5\text{ mg/kg/tydzień}$; $2,0\text{ mg/kg/tydzień}$; $2,5\text{ mg/kg/tydzień}$. Większą odpowiedź odnotowano

u 3 chorych, mniejszą — u 2 chorych, natomiast u 44 chorych (50%) stwierdzono stabilizację raka nerki. Mediana czasu do progresji wynosiła 100 dni. Złymi czynnikami predykcyjnym w zakresie krótszego czasu do progresji okazały się niskie stężenie hemoglobiny oraz wysoka aktywność fosfatazy alkalicznej. Toksyczność obejmowała głównie zmiany trądzikopodobne, które stwierdzono u 68% leczonych panitumumabem z powodu przerzutowego raka nerki [84].

Podsumowanie

Ocena ekspresji EGFR u chorych na raka nerki nie jest postępowaniem rutynowym, a jako problematyka badawcza nie jest również często podejmowana. Dlatego zgromadzone dane mają charakter przygodny. Większość negatywnych wyników badań klinicznych, w których stosowano inhibitory EGFR (małe cząsteczki lub przeciwciała monoklonalne), przyczyniło się do zmniejszenia tempa badania tej problematyki szczególnie w zakresie badań klinicznych. Przeprowadzone dotychczas badania kliniczno-patologiczne także wykazały zmienny odsetek ekspresji EGFR u chorych na raka nerki. Jeszcze mniej danych jest w zakresie korelacji ekspresji tego markera z określeniem potencjalnej skuteczności coraz częściej stosowanych leków blokujących funkcje molekularne EGFR. Niemniej należy pamiętać, że historia stosowania małych cząsteczek w leczeniu raka płuca także była skomplikowana. Nie inaczej było również z pierwszymi próbami stosowania cetuksymabu w leczeniu przerzutowego raka jelita grubego. Należy mieć nadzieję, że doskonalenie technik dokładniejszej charakterystyki molekularnej chorych występujących w codziennej praktyce lekarskiej będzie pomocne w podejmowaniu optymalnych decyzji terapeutycznych.

Piśmiennictwo

1. Motzer R.J., Bander N.H., Nanus D.M. Renal-cell carcinoma. *NEJM* 1996; 335: 865–875.
2. Grawitz P. Entstehung von Nierentumoren aus Nebennierenngewebe. *Arch. Klin. Chir.* 1883; 30: 824–834.
3. Oberling C., Riviere M., Haguenu F. Ultrastructure of clear cells in renal carcinomas and its importance for the demonstration of their renal origin. *Nature* 1960; 186: 402–403.
4. Diaz J.I., Mora L.B., Hakam A. The Mainz classification of renal tumors. *Cancer Control* 1999; 6: 571–579.
5. Kopper L., Timar J. Genomics of renal cell cancer — dose it provide breakthrough? *Pathol. Oncol. Res.* 2006; 12: 5–11.
6. Graveel C., Su Y., Koeman J. i wsp. Activating Met mutations produce unique tumor profiles in mice with selective duplication of the mutant allele. *PNAS* 2004; 101: 17198–17203.
7. Brenner W., Raber G., Hergert T. i wsp. Loss of tumor suppressor protein PTEN during renal carcinogenesis. *Int. J. Cancer* 2002; 99: 53–57.
8. Hager M., Haufe H., Lasuardi L. i wsp. P-AKT overexpression in primary renal cell carcinomas and their metastases. *Clin. Exp. Metastasis* 2010; 27: 611–617.
9. Pantuck A.J., Seligson D.B., Klatte T. i wsp. Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma. Implications for

- molecular patient selection for targeted therapy. *Cancer* 2007; 109: 2257–2267.
10. Downward J., Parker P., Waterfield D. Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nature* 1984; 311: 483–485.
 11. Oda K., Matsuoka Y., Funahashi A. i wsp. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol. Sys. Biol.* 2005; 1: 2005.0010.
 12. Uhlman D.L., Nguyen P., Carlos J. i wsp. Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in papillary and nonpapillary renal cell carcinoma: correlation with metastatic behavior and prognosis. *Clin. Cancer Res.* 1995; 1: 913–920.
 13. Moch H., Sauter G., Buchholz N. i wsp. Epidermal growth factor receptor expression is associated with rapid tumor cell proliferation in renal cell carcinoma. *Hum. Pathol.* 1997; 28: 1255–1259.
 14. Sakaeda T., Okamura N., Gotoh A. i wsp. EGFR mRNA is up-regulated, but somatic mutations of the gene are hardly found in renal cell carcinoma in Japanese patients. *Pharm. Res.* 2005; 22: 1757–1761.
 15. Kallio J.P., Hirvikoski P., Helin H. i wsp. Membranous location of EGFR immunostaining is associated with good prognosis in renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer* 2003; 89: 1266–1269.
 16. Hofmockel G., Riess S., Bassukas I.D. i wsp. Epidermal growth factor family and renal cell carcinoma: Expression and prognostic impact. *Eur. Urol.* 1997; 31: 478–484.
 17. Merseburger A.S., Hennenlotter J., Simon P. i wsp. Membranous expression and prognostic implications of epidermal growth factor receptor in human renal cell cancer. *Anticancer. Res.* 2005; 25: 1901–1908.
 18. Pu Y.-S., Huang C.-Y., Kuo Y.-Z. i wsp. Characterization of membranous and cytoplasmic EGFR expression in human normal renal cortex and renal cell carcinoma. *J. Biomed. Sci.* 2009; 16: 82.
 19. Gattenlohner S., Etschmann B., Riedmiller H. i wsp. Lack of KRAS and BRAF mutation in renal cell carcinoma. *Eur. Urol.* 2009; 55: 1490–1491.
 20. Latif Z., Watters A.D., Bartlett J.M.S. i wsp. Gene amplification and overexpression of HER2 in renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2002; 89: 5–9.
 21. Rodrigues S., Attoub S., Nguyen Q.D. i wsp. Selective abrogation of the proinvasive activity of the trefoil peptides pS2 and spasmodic polypeptide by disruption of the EGF receptor signaling pathways in kidney and colonic cancer cells. *Oncogene* 2003; 22: 4488–4497.
 22. Rodrigues S., Van Aken E., Van Bocxlaer S., Atoub S. i wsp. Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase 2 and EGF receptor signaling. *FASEB J* 2003; 17: 7–16.
 23. Chua B.T., Lim S.J., Tham S.C. i wsp. Somatic mutation in the ACK1 ubiquitin association domain enhances oncogenic signaling through EGFR regulation in renal cancer derived cells. *Mol. Oncol.* 2010; 4: 323–334.
 24. Franovic A., Robert I., Smith K. i wsp. Multiple acquired renal carcinoma tumor capabilities abolished upon silencing of ADAM17. *Cancer Res.* 2006; 66: 8083–8090.
 25. McClatchey A.I., Giovannini M. Membrane organization and tumorigenesis — the Nf-2 tumor suppressor, Merlin. *Genes Dev.* 2005; 19: 2265–2277.
 26. Den Bakker M.A., Vissers K.J., Molijn A.C. i wsp. Expression of the neurofibromatosis type 2 gene in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 1999; 47: 1471–1480.
 27. LaJeunesse D.R., McCartney B.M., Fehon R.G. Structural analysis of *Drosophila* merlin reveals functional domains important for growth control and subcellular localization. *J. Cell. Biol.* 1998; 141: 1589–1599.
 28. Alfthan K., Heiska L., Gronholm M. i wsp. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates merlin at serine 518 independently of p21-activated kinase and promotes merlin-ezrin heterodimerization. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 18559–18666.
 29. Lallemand D., Curto M., Saotome I. i wsp. NF-2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions. *Genes Dev.* 2003; 17: 1090–1100.
 30. Curto M., Cole B.K., Lallemand D. i wsp. Contact-dependent inhibition of RGF signaling by Nf-2/Merlin. *J. Cell. Biol.* 2007; 177: 893–903.
 31. Cole B.K., Curto M., Chan A.W. i wsp. Localization to the cortical cytoskeleton is necessary for Nf2/Merlin-dependent epidermal growth factor receptor silencing. *Mol. Cell Biol.* 2008; 28: 1274–1284.
 32. Morris Z.S., McClatchey A.I. Aberrant epithelial morphology and persistent epidermal growth factor receptor signaling in a mouse model of renal carcinoma. *PNAS* 2009; 106: 9767–9772.
 33. Benhamouche S., Curto M., Saotome I. i wsp. Nf-2/Merlin controls progenitor homeostasis and tumorigenesis in the liver. *Genes Dev.* 2010; 24: 1718–1730.
 34. Yi C., Kissil J.L. Merlin in organ size control and tumorigenesis: Hippo versus EGFR? *Genes Dev.* 2010; 24: 1673–1679.
 35. Harris H., Miller O.J., Klein G. i wsp. Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature* 1969; 223: 363–368.
 36. Stanbridge E.J. Suppression of malignancy in human cells. *Nature* 1976; 260: 17–20.
 37. Knudson A.G. Mutation and cancer : statistical study of retinoblastoma. *PNAS* 1971; 68: 820–823.
 38. Knudson A.G., Strong L.C. Mutation and cancer : a model for Wilms' tumor of the kidney. *J. Natl. Cancer Inst.* 1972; 48: 313–324.
 39. Neumann H.P., Wiestler O.D. Clustering of features of von Hippel-Lindau syndrome: evidence for a complex genetic locus. *Lancet* 1991; 337: 1052–1054.
 40. Maher E.R., Yates J.R., Harries R. i wsp. Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease. *QJM* 1990; 77: 1151–1163.
 41. Lonser R.R., Glenn G.M., Walther M. i wsp. von Hippel-Lindau disease. *Lancet* 2003; 361: 2059–2067.
 42. Gnarr J.R., Tory K., Weng Y. i wsp. Mutations of the VHL tumor suppressor gene in renal carcinoma. *Nat. Genet.* 1994; 7: 85–90.
 43. Shuin T., Kondo K., Torigoe S. i wsp. Frequent somatic mutations and loss of heterozygosity of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res.* 1994; 54: 2852–2855.
 44. De Paulsen N., Brychzy A., Fournier M.C. i wsp. Role of transforming growth factor- α in von Hippel-Lindau (VHL-/-) clear cell renal carcinoma cell proliferation: A possible mechanism coupling VHL tumor suppressor inactivation and tumorigenesis. *PNAS* 2001; 98: 1387–1392.
 45. Gunaratnam L., Morley M., Franovic A. i wsp. Hypoxia inducible factor activates the transforming factor/epidermal growth factor receptor growth stimulatory pathways in VHL-/- renal cell carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 44966–44974.
 46. Smith K., Gunaratnam L., Morley M. i wsp. Silencing of epidermal growth factor receptor suppresses hypoxia-inducible factor-2-driven VHL-/- renal cancer. *Cancer Res.* 2005; 65: 5221–5230.
 47. Franovic A., Gunaratnam L., Smith K. i wsp. Translational up-regulation of the EGFR by tumor hypoxia provides a nonmutational explanation for its overexpression in human cancer. *PNAS* 2007; 104: 13092–13097.
 48. Kleymenova E., Everitt J.L., Pluta L. i wsp. Susceptibility to vascular neoplasms but no increase susceptibility to renal carcinogenesis in Vhl knockout mice. *Carcinogenesis* 2004; 25: 309–315.
 49. Sen G.C., Lengyel P. The interferon system. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 5017–5020.
 50. Eisenkraft B.L., Nanus D.M., Albino A.P. i wsp. Alfa-interferon down-regulates epidermal growth factor receptors on renal carcinoma cells: relation to cellular responsiveness to the antiproliferative action of alfa-Interferon. *Cancer Res.* 1991; 51: 5881–5887.
 51. Voorhees P.M., Dees E.C., O'Neil B. i wsp. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9: 6316–6325.
 52. Bonvini P., Zorzi E., Basso G. i wsp. Bortezomib-mediated 26S proteasome inhibition causes cell-cycle arrest and induces apoptosis in CD-30 + anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia* 2007; 21: 838–842.
 53. Pour L., Adam Z., Buresova L. i wsp. Varicella-zoster virus prophylaxis with low-dose acyclovir in patients with multiple myeloma treated with bortezomib. *Clin. Lymph. Myeloma* 2009; 9: 151–153.
 54. An J., Retting M.B. Epidermal growth factor receptor inhibition sensitizes renal cell carcinoma cells to the cytotoxic effects of bortezomib. *Mol. Cancer Ther.* 2007; 6: 61–69.
 55. Mok T.S., Wu Y.L., Thongprasert S. i wsp. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *NEJM* 2009; 361: 947–957.
 56. Iyevleva A.G., Novik A.V., Moiseyenko V.A. i wsp. EGFR mutation in Sidney carcinoma confers sensitivity to gefitinib treatment: a case report. *Urol. Oncol.* 2009; 27: 548–550.
 57. Asakuma J., Sumitomo M., Asano T. i wsp. Modulation of tumor growth and tumor induced angiogenesis after epidermal growth factor receptor inhibition by ZD1839 in renal cell carcinoma. *J. Urol.* 2004; 171: 897–902.

58. Oh H.Y., Kwon S.M., Kim S.I. i wsp. Antiangiogenic effect of ZD1839 against murine renal cell carcinoma (RENCA) In an orthotopic Mouse model. *Urol. Int.* 2005; 75: 159–166.
59. Sumitomo M., Asano T., Asakuma J. i wsp. ZD1839 modulates paclitaxel response In renal cancer by blocking paclitaxel-induced activation of epidermal growth factor receptor-extracellular Signac-regulated kinase pathway. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 794–801.
60. Gemmill R.M., Zhou M., Costa L. i wsp. Synergistic growth inhibition by Iressa and Rapamycin modulated by VHL mutations In renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer* 2005; 92: 2266–2277.
61. Kuroda K., Horiguchi A., Sumitomo M. i wsp. Activated AKT prevents antitumor activity of gefitinib In renal cancer cells. *Urology* 2009; 74: 209–215.
62. Jermann M., Stahel R.A., Salzberg M. i wsp. A phase II, open label study of gefitinib (IRESSA) in patients with locally advanced, metastatic, or relapsed renal-cell carcinoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2006; 57: 533–539.
63. Dawson N.A., Guo C., Zak R. i wsp. A phase II of gefitinib (Iressa, ZD1839) in stage IV and recurrent renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 7812–7819.
64. Drucker B., Bacik J., Ginsberg M. i wsp. Phase II trial of ZD1839 (IRESSA) in patients with advanced renal cell carcinoma. *Invest. New Drugs* 2003; 21: 341–345.
65. Amato R.J., Jac J., Hernandez-McClain J. Interferon-alfa I n combination with either imatinib (Gleevec) or gefitinib (Iressa) in metastatic renal cell carcinoma: a phase II trial. *Anticancer Drugs* 2008; 19: 527–533.
66. Motzer R.J., Hudes G.R., Ginsberg M.S. i wsp. Phase I/II trial of sunitinib plus gefitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Am. J. Clin. Oncol.* 2010; 33: 614–618.
67. Siegel-Lakhai W., Beijen J.H., Schellens J.H.M. Current knowledge and future directions of the selective epidermal growth factor receptor inhibitors erlotinib (Tarceva) and gefitinib (Iressa). *Oncologist* 2005; 10: 579–589.
68. Moore M.J., Goldstein D., Hamm J. i wsp. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: A phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 1960–1966.
69. Capuzzo F., Ciuleanu T., Stelmakh L. i wsp. Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small cell lung cancer: A multicentre, randomised placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2010; 11: 521–529.
70. Marchetti S., de Vries N.A., Buckle T. i wsp. Effect of the ATP-binding cassette drug transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC2 on erlotinib hydrochloride (Tarceva) disposition in vitro and in vivo pharmacokinetic studies employing Bcrp1 $-/-$ /Mdr1a/1b $-/-$ (triple-knockout) and wild-type mice. *Mol. Cancer Ther.* 2008; 7: 2280–2287.
71. Beermam M., Rowinsky E.K., Weiss G.R. i wsp. A phase I, pharmacokinetic (PK) and biological correlativestudy of OSI-774 (Tarceva) in patients with advanced renal cell carcinoma with FDG-PET imaging: evidenceof durable stable disease and anti-tumor activity. *EJC* 2005; 2 (supl.): 111 (a369).
72. Flaig T.W., Costa L.J., Gustafson D.L. i wsp. Safety and efficacy of the combination of erlotinib and sunitinib for the treatment of metastatic renal cell carcinoma after failure of sunitinib or sunitinib. *Br. J. Cancer* 2010; 103: 796–801.
73. Hainsworth J.D., Sosman J.A., Spiegel D.R. i wsp. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with a combination of bevacizumab and erlotinib. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 7889–7896.
74. Hainsworth J.D., Spiegel D.R., Sosman J.A. i wsp. Treatment of advanced renal cell carcinoma with the combination bevacizumab/erlotinib/imatinib: A phase I/II trial. *Clin. Genitourin. Cancer* 2007; 5: 427–432.
75. Bukowski R.M., Kabbinavar F.F., Figlin R.A. i wsp. Randomized phase II study of erlotinib combined with bevacizumab compared with bevacizumab alone in metastatic renal cell cancer. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 4536–4541.
76. Gordon M.S., Hussey M., Nagle R.B. i wsp. Phase II study of erlotinib in patients with locally advanced or metastatic papillary histology renal cell cancer: SWOG S0317. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 5788–5793.
77. Li S., Schmitz K.R., Jeffrey P.D. i wsp. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell.* 2005; 7: 301–311.
78. Kurai J., Chikumi H., Hashimoto K. i wsp. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 1552–1561.
79. Foon K.A., Yang X.D., Weiner L.M. i wsp. Preclinical and clinical evaluations of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Int J Radiation Oncology Biol. Phys.* 2004; 58: 984–990.
80. Amado R.G., Wolf M., Peeters M. i wsp. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 1626–1634.
81. Karapetis C.S., Khambata-Ford K.L., Jonker D.J. i wsp. KRAS mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *NEJM* 2008; 359: 1757–1765.
82. Prewett M., Rothman M., Waksal H. i wsp. Mouse-human chimeric anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits the growth of human renal cell carcinoma xenografts in nude mice. *Clin. Cancer Res.* 1998; 4: 2957–2966.
83. Motzer R.J., Amato R., Todd M. i wsp. Phase II trial of anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 in patients with advanced renal cell carcinoma. *Invest. New Drugs* 2003; 21: 99–101.
84. Rowinsky E.K., Schwartz G.H., Gollob J.A. i wsp. Safety, pharmacokinetics, and activity of ABX-EGFR, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in patients with metastatic renal cell cancer. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 3003–3015.