

Títol del treball: Efecte de la glicosilació sobre l'activitat i la resposta a tractaments de l'EGFR

Estudiant: Anna Fàbrega Ribas

Grau en Biologia

Correu electrònic: annafabregaribas@gmail.com

Tutor: Sílvia Barrabés Vera

Cotutor*:

Empresa / institució: Departament de Bioquímica de la Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor: Sílvia Barrabés

Nom del cotutor*:

Empresa / institució: Departament de Bioquímica de la
Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s): silvia.barrabes@udg.edu

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 24/05/2018

RESUM

L'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) és una glicoproteïna de la família dels receptors tirosina quinasa que sovint està alterada en situació tumoral. S'ha observat que la seva inhibició disminueix la proliferació tumoral, fet que la converteix en diana dels tractaments antitumorals. Actualment hi ha dues estratègies d'inhibició de l'EGFR: els anticossos monoclonals i els inhibidors tirosina quinasa (TKI). Malauradament, l'eficàcia d'aquests tractaments sovint es veu limitada per l'aparició de resistències i per altres factors.

Per estudiar com determinats canvis en l'EGFR poden afectar els tractaments dirigits contra aquest receptor, cal endinsar-nos en la seva dinàmica conformacional. L'EGFR requereix la unió de dos monòmers per la seva activació que, induïda per un lligand, permet la interacció dels dominis quinasa i l'inici la senyalització. No obstant, la desregulació d'aquest receptor pot venir modulada per diversos factors, com la glicosilació del seu ectodomini. La progressió tumoral s'ha relacionat amb una alteració de la glicosilació i s'ha vist que una glicosilació aberrant de l'EGFR afecta la unió del lligand i la seva activació. Però cal investigar amb més profunditat els efectes de la glicosilació de l'EGFR i el seu impacte en la resposta als tractaments dirigits. Aquest darrer aspecte ha estat l'objecte d'estudi d'aquest Treball de Fi de Grau.

En base a la informació bibliogràfica existent, és àmpliament acceptat que el lloc i el tipus de glicosilació influeix en la conformació i l'activitat de l'EGFR. A part de la controvèrsia en alguns estudis, la fucosilació terminal i la sialilació disminueixen l'activitat d'aquest receptor. En canvi, altres glicosilacions com la fucosilació *core* i els epítops de Lewis n'augmenten l'activitat. A més, sembla que l'alteració de la glicosilació podria tenir algun efecte en la resposta de l'EGFR davant dels tractaments. Segons la informació actual, la glicosilació de l'EGFR no sembla alterar la unió dels anticossos al seu domini extracel·lular. Tot i això, estudis amb un altre membre de la família de l'EGFR, HER2, apunten al contrari. El resultat més rellevant és que la glicosilació extracel·lular de l'EGFR afecta indirectament la sensibilitat als TKI intracel·lularment. Per últim, la necessitat de trobar més tractaments per combatre l'aparició de resistències i la demanda en l'especificitat dels tractaments, realça la importància de la glicosilació com a possible nova via d'estudi contra el càncer.

RESUMEN

El *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) es una glicoproteína de la familia de los receptores tirosina quinasa que a menudo se altera en situación tumoral. Su inhibición disminuye la proliferación tumoral, convirtiéndola en diana para los tratamientos anti-tumorales. Actualmente hay dos estrategias para la inhibición del EGFR: los anticuerpos monoclonales y los inhibidores tirosina quinasa (TKI). Sin embargo, la eficacia de estos tratamientos puede estar limitada por la aparición de resistencia y otros factores.

Para estudiar como determinados cambios en el EGFR podrían afectar a los tratamientos dirigidos a este receptor, es necesario sumergirse en su dinámica conformacional. El EGFR requiere la unión de dos monómeros para su activación que, inducida por un ligando, permite la interacción de los dominios quinasa y el inicio de la señalización. No obstante, la desregulación de este receptor puede ser modulada por varios factores, como la glicosilación de su ectodominio. La progresión tumoral se ha relacionado con la alteración de la glicosilación y se ha visto que una glicosilación aberrante del EGFR afecta a la unión del ligando y su activación. Pero es necesario investigar el potencial impacto que la glicosilación del EGFR puede tener en los tratamientos dirigidos. Este último aspecto ha sido el objetivo de estudio de este *Trabajo de Fin de Grado*.

En base a la información bibliográfica existente, se acepta que tanto el lugar y el tipo de glicosilación influyen en la conformación y la actividad del EGFR. A pesar de la controversia en algunos estudios, la fucosilación terminal y la sialilación disminuyen la actividad del receptor. Por otro lado, otras glicosilaciones como la fucosilación *core* y los determinantes de Lewis aumentan su actividad. Podría ser que la alteración de la glicosilación tuviera algún efecto en la respuesta del EGFR a los tratamientos. Según la información actual, la glicosilación del EGFR no parece afectar la unión de los anticuerpos a su dominio extracelular. Cabe decir que estudios en otro miembro de la familia del EGFR, HER2, apuntan a lo contrario. El resultado más relevante es que la glicosilación extracelular del EGFR afecta indirectamente la sensibilidad a los TKI intracelularmente. Por último, la necesidad de hallar más tratamientos para combatir la aparición de resistencias y la demanda en la especificidad de los tratamientos, realza la importancia de la glicosilación como posible nueva vía de estudio contra el cáncer.

ABSTRACT

The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is a glycoprotein that belongs to the family of tyrosine kinase receptors and that it is usually altered in tumor cells. It has been reported that its inhibition decreases tumor proliferation and thus, it is an attractive target for anti-tumor therapies. There are currently two main strategies of EGFR inhibition: monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors (TKI). Unfortunately, the appearance of resistance and other factors limit often the effectiveness of these treatments.

In order to study how certain changes in EGFR can affect target therapies against this receptor, we must understand its conformational dynamics. EGFR activation requires the binding of two monomers that, induced by the presence of a ligand, allow then the interaction of the kinase domains and initiate the downstream signaling. However, the deregulation of this receptor may be modulated by several factors, such as the glycosylation of its ectodomain. Tumor progression has been related with an alteration of EGFR glycosylation and it has been observed that aberrant glycosylations may affect both the binding of the ligand and its activation. Accordingly, to study the overall effect of glycosylation on the response to EGFR directed treatments requires a more profound investigation. This is the objective of this *Degree Final Project*.

Based on the existing bibliographic information, it is widely accepted that the site and type of glycosylation influence EGFR conformation and activity. In spite of the controversy in some studies, it seems that terminal fucosylation and sialylation decrease the activity of this receptor. In contrast, other glycosylations such as core fucosylation and Lewis epitopes, increase the activity of EGFR. Moreover, it seems that the alteration of glycosylation could have an effect on EGFR response to treatments. According to current information, EGFR glycosylation does not seem to alter the binding of antibodies to the extracellular domain. However, studies on another member of the EGFR family, HER2, show the opposite. The most relevant result obtained in this project is that extracellular glycosylation of EGFR indirectly affects intracellular sensitivity to TKI. Finally, the need to find alternative treatments to fight emerging resistance and the demand for higher treatment specificity opens an avenue for glycosylation itself as a potential novel target against cancer.

ÍNDEX

1 INTRODUCCIÓ	1
1.1 ACTIVACIÓ DE L'EGFR	2
1.2 GLICOSILACIÓ.....	3
1.3 ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES DIRIGIDES A L'EGFR.....	6
2 HYPOTHESIS AND OBJECTIVES	8
3 METODOLOGIA	8
4 RESULTATS I DISCUSIÓ	10
4.1 EFECTES DE LA GLICOSILACIÓ SOBRE EGFR EN SITUACIÓ NORMAL I TUMORAL.....	10
4.2 GLICOSILACIÓ DE L'EGFR I LA RESPOSTA DELS TRACTAMENTS ANTI-EGFR	13
5 DISCUSSIÓ GENERAL	20
6.1 EFECTES DELS MÀB SEGONS LA GLICOSILACIÓ DE L'EGFR.....	22
6.2 EFECTES DELS TKI EN PRESENCIA DE GLICOSILACIÓ EN EGFR.....	22
6.3 GLICOSILACIÓ EGFR NOVA VIA CONTRA EL CÀNCER	24
6 ÈTICA I SOSTENIBILITAT	24
7 CONCLUSIONS	25
ACRÒNIMS	26
BIBLIOGRAFIA	27

1 INTRODUCCIÓ

El càncer és actualment una de les principals causes de mortalitat a tot el món. Al 2018 es diagnosticaran uns 2 milions de nous casos de càncer només als Estats Units i aproximadament un 35% de les persones diagnosticades moriran aquest mateix any d'aquesta malaltia. En els darrers anys, la incidència en la població ha anat creixent i s'estima que un 38% de la població actual serà diagnosticada amb algun tipus de càncer en algun moment durant la seva vida. Malgrat això, els avenços en el coneixement i tractament del càncer han millorat extraordinàriament les expectatives de vida dels malalts. El 2016 hi havia prop de 15.5 milions de persones en tractament per càncer als Estats Units. Però això té un cost per la societat en general molt alt i, per exemple, la despesa als Estats Units de tots els tractaments dels malalts de càncer el 2017 va pujar fins els 147,3 bilions (147 mil milions) de dòlars. Amb l'envelliment global de la població i l'adopció de tractaments més cars i més llargs, la despesa del sistema sanitari en càncer pot portar a un col·lapse global de l'economia en salut. Tot plegat fa que urgeixi trobar nous tractaments en càncer i per això cal una millor comprensió tant dels mecanismes d'acció terapèutica com dels processos biològics que poden afectar la seva eficàcia¹. Aquest Treball Final de Grau s'emmarca en aquest darrer aspecte.

Actualment hi ha més de 400 gens reconeguts com possibles causants dels diversos tipus de càncers². En la seva gran majoria, aquests *cancer driver genes* codifiquen proteïnes que pertanyen a una subfamília d'enzims anomenades quinases. El quinoma és el conjunt complet de proteïnes quinasa codificades en el genoma i, en particular, el quinoma humà conté 547 quinases³. Entre elles, l'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) és un dels receptors de membrana més estudiats en la lluita contra el càncer i serà el centre del present treball.

L'EGFR regula el creixement cel·lular i la diferenciació. La sobreexpressió i desregulació de l'EGFR s'ha associat a molts càncers, regulant-ne la invasió, metastasi i angiogènesis⁴. Pertany a la família dels receptors tirosina quinasa (RTK) que engloba la subfamília ErbB/HER composta per quatre membres: EGFR (ErbB1/HER1), ErbB2/HER2/NEU, ErbB3/HER3 i ErbB4/HER4⁵. Induït per la unió a lligand (el més comú és *epidermal growth factor* (EGF), però n'hi ha d'altres), EGFR forma un homodímer o un heterodímer amb ErbB2, ErbB3 o ErbB4 i activa diferents vies de senyalització com RAS/MAPK o PI3K/AKT^{6,7}. La desregulació de les proteïnes ErbB s'ha relacionat amb la carcinogènesis de molts càncers epitelials com el càncer de mama, ovari i pròstata^{8,9} i, concretament, la desregulació de l'EGFR s'ha associat amb el càncer de pulmó¹⁰. Així doncs, l'estudi d'aquest receptor i la seva família és de gran importància en l'àmbit oncològic.

L'EGFR té quatre dominis funcionals: un domini d'unió extracel·lular ric en cisteïna, un domini transmembrana, un domini tirosina quinasa intracel·lular, i un domini regulador C-terminal¹¹⁻¹³. Alhora, el domini extracel·lular està dividit en quatre subdominis: els subdominis I i III¹⁴, que s'uneixen al lligand, i els subdominis II i IV, que estan involucrats en la dimerització¹⁵. Normalment, quan no hi ha estimulació per part del lligand, l'EGFR manté una conformació plegada en la que els subdominis II i IV formen una interacció intramolecular impeding el seu desplegament i per tant la seva activació¹⁶, tal i com s'aprecia a la Fig. 1. En el seu estat monomèric, l'EGFR pot presentar tres estadis: pegat (*tethered*), tancat (*closed*) o autoinhibit. La interacció de l'EGFR amb el lligand provoca que interacció intramolecular que es forma entre els subdominis II i IV es trenqui, de manera que el monòmer es desplega i adopta una conformació que permet la dimerització. En el seu estat dimèric, l'EGFR pot presentar també tres estadis: desplegat (*untethered*), obert (*open*) o estès (*extended*). L'EGFR únicament pot iniciar la senyalització en la seva forma dimèrica¹⁷.

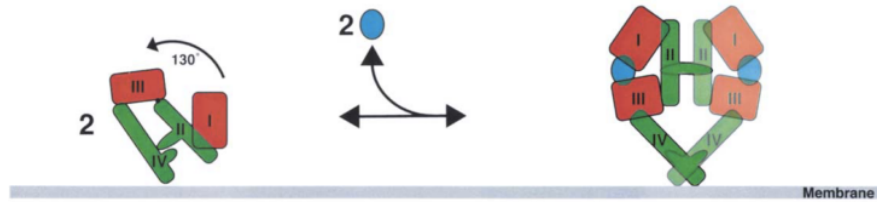


Fig. 1. Esquema dels canvis conformacionals induïts per la interacció amb el lligand que pateix l'EGFR en dimeritzar. A l'esquerra, es mostra l'estructura inactiva de l'EGFR amb conformació plegada. A la dreta, el dímer induït pel lligand (figura blava). Dominis d'unió a lligand I i III en vermell; i els de dimerització II i IV en verd. La unió del lligand es creu que induïx el trencament de la interacció intramolecular entre els subdominis II i IV, provocant una rotació de 130° que exposa les seves superfícies per a la formació del dímer. La barra gris correspondria a la membrana plasmàtica. Figura extreta de Burgess et al. 2003.¹¹

L'equilibri que s'estableix entre les poblacions monomèriques i dimèriques de l'EGFR pot veure's alterat per l'aparició de mutacions en el receptor, per la seva sobreexpressió, o per la seva activació a partir d'altres vies. Aquesta desregulació de l'EGFR és la causa de molts tumors¹⁸⁻²⁰.

1.1 Activació de l'EGFR

Com s'ha mencionat a dalt, l'activació de l'EGFR és induïda per un lligand, que permet la dimerització i la posterior senyalització. Per passar de la forma inactiva a activa, l'EGFR necessita una reorganització conformacional. La unió d'un factor de creixement (*growth factor*) entre els subdominis I i III induïx l'estabilització conformacional del monòmer, que exposa el braç del subdomini II i l'extrem inferior del IV per crear la interfície de dimerització^{11,17}. Aquest receptor requereix la dimerització de dos monòmers, ja sigui amb el propi EGFR (homodímer) o amb algun membre de la seva subfamília, ErbB2, ErbB3 o ErbB4 (heterodímer). Sembla ser que aquesta dimerització promou la interacció a nivell citoplasmàtic, formant un domini quinasa asimètric, on una subunitat quinasa d'un receptor (quinasa donadora) estimula una altra subunitat (quinasa acceptora), activant-la al·lostèricament²¹, fet que permetrà l'autofosforilació del dímer. Aquesta autofosforilació és específica pel lligand i diferents lligands causen patrons de fosforilació distints entre els residus de tirosina del domini intracel·lular²², permetent així el reclutament de proteïnes determinades segons el lloc de fosforilació que iniciaran la cascada de senyalització²³. Així doncs, canvis conformacionals específics a nivell extracel·lular modulen paral·lelament canvis conformacionals en el domini citoplasmàtic²⁴. Però aquesta no és la única forma d'activació de l'EGFR.

L'activació de l'EGFR es complexa. Hem dit que aquest receptor normalment necessita la unió d'un lligand per activar-se, però hi ha algunes excepcions. La primera és quan intervé ErbB2, que és un monòmer que adopta una conformació desplegada sense necessitat de lligand¹¹. La presència d'ErbB2 és capaç d'estabilitzar el monòmer de l'EGFR en la conformació necessària perquè dimeritzi, fins i tot en absència de lligand. Aquest fet provoca la senyalització independentment de lligand, i s'ha vist, que incrementa l'afinitat d'unió de l'EGFR^{13,25}. Una altra excepció és quan l'EGFR presenta certes mutacions que provoquen un canvi conformacional en la seva estructura que li permet desplegar-se en absència de lligand²⁶. Encara que la majoria de receptors TK dimeritzin a través de l'encreuament amb els lligands, les interaccions que permeten la formació del dímer són mediades completament per les dues parts monomèriques que formen el receptor. Cal puntualitzar que el desplegament del monòmer és necessari però que, a vegades, no és del tot suficient per la formació del dímer. Fins i tot, s'ha vist que alguns tipus de **glicosilacions** poden modificar l'equilibri cap a una conformació extensa de l'EGFR que pot influir en la seva activació^{27,28}. A més, hi ha altres mecanismes que poden desregular l'activació de l'EGFR, com una elevada expressió del receptor o del lligand degut a vies

metabòliques paral·leles, o bé un descens en l'endocitosi del receptor per alguna mancança metabòlica. Però encara que hi hagi aquestes vies alternatives d'activació, l'EGFR no tendeix a activar-se sense lligand²⁹. A més, l'EGFR consta de mecanismes per autoinhibir-se i impedir la seva activació²⁴.

1.2 Glicosilació

La glicosilació és el procés de formació, generalment catalitzat per les glicosiltransferases, d'un enllaç covalent entre un carbohidrat i una altra molècula com podria ser un polipèptid, un lípid, un polinucleòtid, o altres compostos orgànics³⁰. En aquest treball ens centrarem en les glicoproteïnes.

La glicosilació proteica és una de les modificacions post-traduccionals més importants, estimant-se que més de la meitat del total de les proteïnes humanes estan glicosilades³¹. Els glicans que trobem en humans estan predominantment units a les proteïnes per dues vies: (I) un residu de N-acetilglucosamina (GlcNAc), unit al grup amino d'un residu d'asparagina (Asn) que es troba en la seqüència consens Asn-X-Ser/Thr (on X pot ser qualsevol aminoàcid excepte la prolina) pels N-glicans; i (II) un residu de N-acetilgalactosamina (GalNAc), unit al grup hidroxil d'un residu de serina (Ser) o treonina (Thr) que pot portar diferents classes d'estructures oligosacàrides bàsiques pels O-glicans^{30,32,33}.

Els N-glicans d'eucariotes comparteixen una regió central (*core*) comuna formada per dos GlcNAcs i tres manoses (Man₃GlcNAc₂Asn). Tal i com s'aprecia a la Fig. 2, es poden dividir en tres classes principals: tipus oligomannosa (únicament manoses), tipus complex i tipus híbrid^{30,32}.

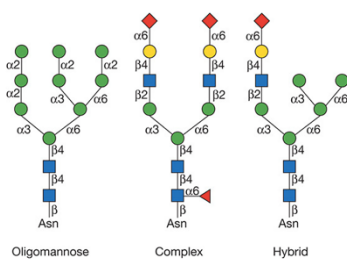


Fig 2. Tipus de N-glicans. Els N-glicans de la seqüència Asn-X-Ser/Thr en glicoproteïnes d'eucariotes són de tres tipus generals: oligomannosa, complex, i híbrid. Cada un a del N-glicans conté l'estructura *core* comuna Man₃GlcNAc₂Asn. Els N-glicans tipus complex tenen fins a sis branques iniciades per GlcNAc i cada una es pot allargar amb repeticions de Galβ1-4-GlcNAc. Símbols dels monosacàrids: fucosa (triangle vermell), manosa (rodona groga), GlcNAc (quadrat blau), àcid siàlic (diamant vermell) i galactosa (rodona groga). Figura extreta del capítol 9, *N-Glycans. Essentials of Glycobiology* [Internet]. 3a edició. Varki et al. (editors) 2015.³⁰

En canvi, els O-glicans es componen per diferents tipus de monosacàrids i no hi ha una seqüència consens determinada d'unió a proteïna. Els O-glicans més representatius s'inicien amb O-GalNAc (α-N-acetilgalactosamina) sovint present en proteïnes altament glicosilades, com mucines, i O-GlcNAc (β-N-acetilglucosamina). Els O-glicans s'allarguen per la unió d'altres carbohidrats (GalNAc, GlcNAc, àcid siàlic, fucosa, glucosa, manosa, entre d'altres) per formar diferents *cores*^{30,32}.

Normalment, les proteïnes que tenen com a destí la superfície extracel·lular passen per les vies de glicosilació en el reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi, on succeeixen una seqüència regulada de processos que involucren diversos enzims catabòlics i anabòlics (glicosidases i glicosiltransferases). En aquestes vies es creen estructures de glicans altament complexes però específiques per les proteïnes involucrades³³. A l'aparell de Golgi és on les cadenes glicosídiques maduren i adquireixen una estructura més complexa depenent dels enzims disponibles³⁴. Des d'allà són transportades en vesícules fins a l'exterior cel·lular³⁵.

Els canvis glicosídics (glicosilació) s'han associat a moltes malalties i càncers. Concretament, processos com la sialilació, la fucosilació, els epítops de Lewis, la ramificació (en anglès

branching) i la truncació (en anglès *truncation*), que comporten canvis en els N- i O-glicans, es veuen alterats en molts càncers³¹. A continuació es descriuen aquestes alteracions.

1.2.1 Sialilació

Els glicans sialilats intervenen en el reconeixement, l'adhesió i la senyalització cel·lulars³⁰. La sialilació consisteix en la unió de residus d'àcid siàlic (àcid N-acetilneuramínic) a les parts terminals dels N- o O-glicans. Aquest enllaç és catalitzat per sialiltransferases (STs), que reben el seu nom per l'enllaç que formen al transferir el residu d'àcid siàlic i al monosacàrid al que s'uneix aquest àcid siàlic. Aquest sucre es pot unir per un enllaç $\alpha 2,3$ o $\alpha 2,6$ a una galactosa (Gal), per $\alpha 2,6$ a una N-GalNAc o N-GlcNAc, o bé per $\alpha 2,8$ a una altre àcid siàlic. Aquestes unions estan catalitzades per diferents membres de la família de les STs (*ST3Gal*, *ST6Gal*, *ST6GalNAc* i *ST8Sia*)^{36,37}.

L'àcid siàlic està molt present en la natura com a sucre terminal en els oligosacàrids de les glicoproteïnes, i aquesta quantitat d'àcid siàlic està regida pels nivells de sialidases i STs³⁸. Hi ha estructures sialilades que s'han relacionat amb la progressió tumoral: els epítops sialilats de Lewis (*sialylated Lewis epitope; SLe*), que es mostren en la Fig. 3, com el SLe^a i el SLe^x ; i que han estat molt estudiats en càncer³⁹⁻⁴¹, aquests epítops s'explicaran més endavant. L'expressió aberrant d'aquest epítops s'ha demostrat que està molt relacionada amb processos metastàtics³⁹, així com una sialilació anormal també s'ha relacionat amb el potencial metastàtic³⁸.

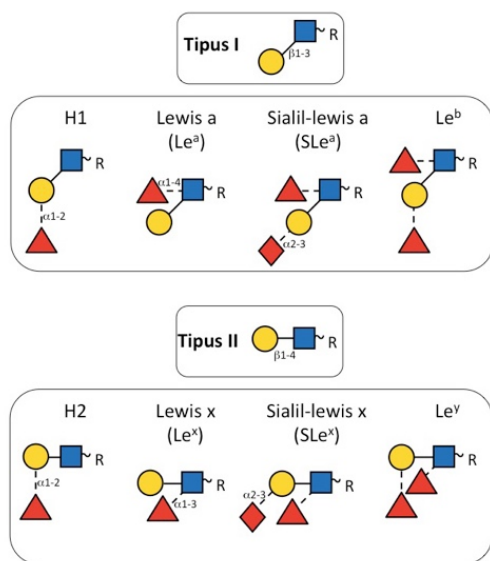


Fig. 3. Determinants de Lewis tipus 1 i tipus 2, que difereixen en l'enllaç de la galactosa més externa ($\beta 1-3$ o $\beta 1-4$, respectivament). R representa la resta del glicà (part més interna). Els determinants de Lewis també poden contenir sulfats al C-6 de la Gal o GlcNAc (no representats). Símbols dels monosacàrids: fucosa (triangle vermell), GlcNAc (quadrat blau), àcid siàlic (diamant vermell) i galactosa (rodona groga). Figura adaptada del capítol 14, Structures Common to Different Glycans. Essentials of Glycobiology [Internet]. 3a edició. Varki et al. 2015.³⁰

1.2.2 Fucosilació

La fucosilació és una de les modificacions més comunes en les glicoproteïnes. Es caracteritza per la unió d'un residu de fucosa a un N- o O-glicà catalitzat per les fucosiltransferases (FUTs). De moment es coneixen 13 FUTs codificades per el genoma humà, onze que s'etiqueten des de FUT1 a FUT11 i dues més, les O-fucosyltransferases, que s'etiqueten POFUT1 i 2. Els gens FUT es poden dividir en tres famílies: FUT1,2, que formen l'enllaç $\alpha 1-2$ fucosa, FUT3-7,9-11, involucrades en la síntesis de $\alpha 1-3/\alpha 1-4$ fucosa, i FUT8, que participa en la síntesis de $\alpha 1-6$ fucosa (fucosa *core*). Pel que fa a les POFUT1,2, s'enllacen directament a residus de serina o treonina⁴²⁻⁴⁴.

Aquests enzims s'expressen en molts teixits i se'ls ha detectat alterats en el sèrum i en cèl·lules tumorals de pacients amb càncer⁴⁵. Un increment de la fucosilació està associat amb l'augment d'activitat de les FUTs, que també està associat amb la formació de varis antígens tumorals, com els antígens de Lewis⁴⁶ que es descriuran en el següent apartat. Els glicans fucosilats són importants en alguns processos biològics com ara la identificació de limfòcits, la resposta immune i el desenvolupament cel·lular⁴⁷. Per altra banda, una fucosilació aberrant, resultat de la deficiència o sobreexpressió de les FUTs i les fucosidases, s'ha associat a diverses malalties humanes i a diferents càncers^{42,47}.

La fucosilació dels glicans es divideix en dos subcategories, fucosilació terminal i fucosilació *core*³¹.

Fucosilació terminal

El glicans de la superfície cel·lular sovint porten residus terminals de fucosa amb enllaç α 1-2/ α 1-3/ α 1-4 en les estructures de N- i O-glicans⁴². La fucosilació terminal, altrament dita externa o antenal, és essencial per unes funcions biològiques normals, per lo que la desregulació de la fucosilació està altament associada amb els càncers i amb l'augment del potencial metastàtic³¹.

Fucosilació *core*

La fucosilació *core* o fucosa *core*, és l'addició d'un residu de fucosa al C6 del residu de GlcNAc més intern del l'estructura *core* de N-glicà (Fig. 2), que és sintetitzat únicament per la α 1,6-fucosiltransferasa (**FUT8**). Sembla ser que la pèrdua de fucosa *core* de les N-glicoproteïnes podria estar relacionada amb alteracions associades al creixement cel·lular, com és el cas dels receptors de EGF, PDGF i TGF- β ₁^{48,49}. Un nombre creixent d'evidències senyalen que aquesta fucosilació *core* és molt important en la regulació de les funcions proteïques⁵⁰.

1.2.3 Epítops de Lewis

L'epítop o antigen de Lewis (Le), és una conjunt d'oligosacàrids fucosilats α 1,3/4 derivats de l'estructura carbohidratada Gal β 1-3/ β 1-4GlcNAc β 1-4R (figura 3). Depenent de l'enllaç que es forma entre la Gal i la GlcNAc, es poden diferenciar entre el antígens de tipus 1 (enllaç Gal β 1,3GlcNAc) o de tipus 2 (Gal β 1,4GlcNAc)⁵¹. Els antígens de Lewis tipus 1 són Lewis a (Le^a), sialil Lewis a (SLe^a) i Lewis b (Le^b); i els tipus 2 són Lewis x (Le^x), sialil Lewis x (SLe^x) i Lewis y (Le^y). Lewis a i x són antígens mono-fucosilats (sense la fucosilació α 1,2), mentre que, Lewis b i y són antígens di-fucosilats. A més, la fucosilació α 1,4 o α 1,3 de Le^a i Le^x pot ser emmascarada per l'addició de àcid siàlic α 2,3 (ST3-4) que formarà l'antigen de Le^a sialilat (SLe^a) i Le^x sialilat (SLe^x) associats amb la migració tumoral⁵². Pel que fa als residus de fucosa α 1-3 o α 1-4 de Lewis units al residu de GlcNAc, poden ser substituïts per àcid siàlic α 2-3, fucosa α 1-2, o sulfat. Els antígens Le estan estructuralment relacionats amb els determinants del sistema antigènic del grup sanguini humà ABH(O)⁵³. Alguns dels epítops s'han reconegut com a marcadors tumorals, concretament SLe^a (conegut com el *carbohydrate antigen 19-9*, CA 19-9), i s'han començat a utilitzar com a pronòstics de certs càncers⁵⁴. Els determinants que tenen una implicació més forta són aquelles variants de Le^x que presenten sialilació i/o sulfatació⁵¹. A més, els epítops de Lewis s'han relacionat amb funcions biològiques de senyal, creixement, apoptosi, adhesió, i migració cel·lulars⁵⁵.

1.2.4 Ramificació i bifurcació

L'estructura *core* dels N-glicans es pot allargar per addició de GlcNAcs degut a l'acció de les N-acetilglucosaminiltransferases (GnNAcT, GnT). Es coneixen dos processos per aquesta amplifcació: la ramificació i la bifurcació³¹.

La **ramificació** correspon a l'addició de GlcNAc sobre l'estructura *core* del N-glicans. GnT-I és l'encarregada de l'elongació del *core* dels N-glicans per formar els N-glicans tipus mannososa o híbrid. Aquestes estructures poden ser modificades posteriorment per altres GnTs (GnT-II, IV, V o VI) que substitueixen les posicions terminals del *core* formant diferents branques tipus complex del N-glicans. Durant la transformació tumoral s'ha detectat un increment de l'expressió de GnT-V (MCAT5), conseqüentment moltes cèl·lules canceroses presenten major nombre de ramificacions GlcNAc β 1-6 en el *core* dels N-glicans⁵².

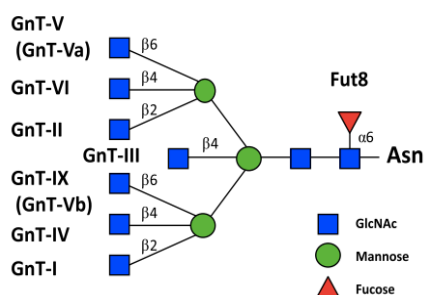


Fig. 4. Activitat de GnT-I a VI. Figura extreta de l'article de Takahashi et al. 2016.⁷²

La **bifurcació** dels N-glicans, en canvi, es dona al afegir un residu GlcNAc β 1-4 a la manosa més interna del *core* dels N-glicans catalitzat per la GnT-III. Aquesta GnT-III s'ha relacionat amb la supressió de la metàstasi, ja que l'addició de la bifurcació GlcNAc suprimeix la formació de ramificacions GlcNAc β 1,6 catalitzada per la GnT-V⁵². Tot i això, la GnT-III també s'ha relacionat amb transformació maligna dels primers estadis del càncer de ronyó i amb la metàstasi en càncer d'ovari³¹.

1.2.5 Truncació

La truncació és l'escurçament dels N- o O-glicans. S'ha observat un increment d'aquest escurçament en els teixits tumorals. En canvi, no s'expressa o és quasi absent en teixits normals. La truncació més freqüent passa en els O-glicans. Els O-glicans de les mucines poden presentar antigens truncats, com per exemple l'antigen T (*Thomsen–Friedreich antigen* o *core 1*), Tn i la seva forma sialilada STn^{56,57}. Aquesta truncació dels O-glicans s'ha vist en carcinomes de mama, de colon i d'ovari. En conjunt, la desregulació d'aquests O-glicans incomplets sovint s'associa a un malt pronòstic, taxes de supervivència baixes i metàstasi³¹.

1.3 Estratègies terapèutiques dirigides a l'EGFR

Per a poder avaluar el possible impacte de la glicosilació de l'EGFR en els tractaments que utilitzen aquest receptor com a diana, és important comprendre els mecanismes d'acció de les estratègies terapèutiques actuals dirigides a l'EGFR. Els primers d'estudiar aquest receptor com a diana del tractament contra el càncer van ser Kawamoto i Sato, que al 1983 estudiaven els tractaments de l'EGFR i la inhibició del creixement tumoral^{58,59}. Els seus resultats, junt amb altres estudis sobre la inhibició de l'EGFR i les seves vies de senyalització, han aportat informació molt valuosa per al tractament tumoral⁵. L'estudi d'aquest receptor ha donat lloc a la creació de diferents proteïnes i molècules capaces de bloquejar EGFR⁶⁰⁻⁶².

Actualment hi ha dues estratègies terapèutiques que han mostrat eficàcia clínica en tractaments de primera línia contra el càncer, i més concretament contra el NSCLC (*Non-small-cell lung carcinoma*). Aquestes són, per una banda, l'ús d'**anticossos monoclonals** (mAb) i, per l'altra, l'ús d'**inhibidors de tirosina quinasa** (TKIs), que funcionen per mecanismes d'acció completament diferents (Fig. 5). Els mAb interaccionen amb el domini extracel·lular de l'EGFR, impeding la unió a lligand i/o la dimerització i interferint amb la transmissió del senyal. Alguns dels mAb més emprats són el cetuximab i el panitumumab. En contrast, els TKIs s'uneixen al domini citoplasmàtic de l'EGFR competint amb l'adenosinatrifosfat (ATP) per inhibir l'autofosforilació i la conseqüent senyalització de les vies intracel·lulars⁶³. Alguns dels TKIs més representatius són l'erlotinib, el gefitinib i l'afatinib. Malauradament, aquests tractaments de primera línia solen comportar l'aparició de mutacions resistents que els fan sovint ineficaços. Per això ha sorgit recentment una tercera estratègia terapèutica basada en tractaments combinats de mAb i TKI⁶⁴. La recerca en aquesta línia és molt activa.

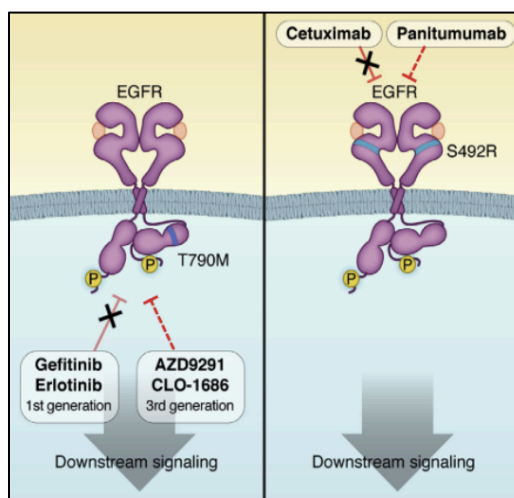


Fig. 5. L'EGFR és un receptor transmembrana que, sota unió del lligand, dimeritza i altera el domini quinasa que en fosforilar transmet el senyal intracel·lular. La part extracel·lular del receptor s'uneix al lligand o a l'anticòs anti-EGFR, com el cetuximab i el panitumumab. Els TKI inhibeixen l'activitat quinasa del receptor. Aquestes petites molècules inclouen gefitinib, erlotinib, AZD9291 i CLO-1686 (els dos últims no explicats). Figura extreta de Arteaga and Engelman, 2014.⁶²

Aquest treball es centra fonamentalment en analitzar els efectes de la glicosilació en l'ectodomini de l'EGFR i en discutir si les possibles glicosilacions d'aquest domini extracel·lular poden alterar, tant negativament com positiva, l'acció dels anticossos o la capacitat inhibidora dels TKI.

2 HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

Since glycosylation is highly relevant in many biological processes and it can affect the function of EGFR, we hypothesize that it can also change EGFR sensitivity to targeted therapies. In order to assess the validity of our hypothesis, all currently available information on the subject will be reviewed.

Three main objectives will be pursued:

1. To define the effects of glycosylation on EGFR and study which consequences it may have in cellular behaviour.
2. To search for information about how EGFR glycosylation may affect current cancer treatments directed to EGFR.
3. To determine whether EGFR glycosylation can be a novel therapeutic strategy against cancer and assess to which extent this possibility has been explored.

3 METODOLOGIA

Per tal de donar resposta a les qüestions plantejades, s'han explorat diferents àrees d'estudi. A grans trets, els temes d'estudi són EGFR, la glicosilació i la relació d'aquests factors amb la sensibilitat als tractaments anti-EGFR. El *modus operandi* ha consistit en una cerca bibliogràfica canalitzada, començant pels conceptes generals cap a informació més detallada utilitzant un seguit de paraules clau. Per fer-ho, s'ha utilitzat com a cercador de confiança PubMed que permet buscar informació en diferents bases de dades com la de *PubMed* mateixa, *NCBI*, *Gene*, *OMIM* o explorar "All databases" i, a partir d'aquí, anar acotant el rang de cerca ^{65,66}.

Un cop obtingut el resultat de la cerca es van seleccionar els articles més útils tenint en compte diferents estratègies: 1) Que el títol coincidís amb les paraules claus escollides (*best match*) o bé que el tema de l'article fos d'interès per la recerca, encara que les paraules claus no apareguessin en el títol, utilitzant l'opció de PubMed "*Publication type, MeSH terms, Substances, Grant support*" per comprovar que l'article coincidís amb els temes d'interès; i 2) Que el document fos recent, actual i naturalment, que coincidís amb l'estudi (*most recent*). Per altra banda, a partir d'una referència interessant també es va accedir a altres articles relacionats per tal de complementar l'estudi. L'estratègia de la cerca és descrita a continuació:

Cerca a PubMed: (paraules clau (data d'accés); resultats *best match/most recent*):

Epidermal growth factor receptor and glycosylation (12/02/2018); 388/292 items.
EGFR and glycosylation (12/02/2018); 216 /146 items.
EGFR fucosylation (12/02/2018); 18/13 items.
EGFR sialylation (12/02/2018); 38/25 items.
Fucosylation and Sialylation and EGFR (12/02/2018); 6 items.
EGFR fucosylation core (20/03/2018); 8/7 items.
Egfr glycosylation sites (25/03/2018); 35/30 items.
EGFR and O-glycosylation (25/03/2018) 9 items.
EGFR Lewis (epitope or antigen) (26/03/2018); 49/40 items.
EGFR and Lewis epitope (26/03/2018); 13 items.
EGFR branching (27/03/2018); 49/40 items.
EGFR bisecting (27/03/2018); 12/8 items.
EGFR cancer (02/04/2018); 31214/31160 items.
EGFR cancer glycosylation (02/04/2018); 108/87 items.

egfr inhibitors (26/04/2018); 18006/15400 items.
egfr glycosylation inhibitors (26/04/2018); 49/29 items.
Anti-EGFR monoclonal antibodies (26/04/2018); 1604/1452 items.
Anti-EGFR Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) (26/04/2018); 132/101 items.
EGFR aberrant glycosylation in cancer (04/05/2018); 15/13 items.
"Genes, erbB-1/drug effects"[Mesh] (04/05/2018); 52 items
EGFR therapy sensibility (05/05/2018); 7/5 items.
EGFR glycosylation treatments; (05/05/2018); 65/12 items
all EGFR inhibitor treatment review (09/05/2018); 2105/738 items.
(Matuzumab or EMD 720000) review (09/05/2018); 27/27 items.
MDX 447 review (09/05/2018); 4/4 items.
mAb806 review (09/05/2018); 13/13 items.
Erlotinib review (09/05/2018); 1493/1468 items
egfr glycosylation resistance (09/05/2018); 17/13 items
egfr glycosylation (resistance or sensitivity) (10/05/2018); 31/21 items.
egfr glycosylation antibodies (10/05/2018); 48/36 items.
antibody effect on egfr glycosylation (11/05/2018); 15/8 items.

A part de PubMed, també es va buscar informació sobre el tema en altres bases de dades:

- *Glycobiology*: Principalment per buscar informació dirigida a la glicosilació i els seus diferents tipus i classificacions més precisa.
 - o *Core fucosylation* ⇒ 658 resultats
 - o *Terminal fucosylation* ⇒ 702 resultats
 - o *Glycosylation sites epidermal growth factor receptor* ⇒ 158 resultats
- *Gene*: Per buscar informació precisa i sintètica del gen estudiat, p. ex, EGFR, FUT, POFUT i altres, i recomana bibliografia d'interès.

Les dades de farmacologia sobre l'afinitat *in vitro* dels diferents TKIs pels quatre membres de la subfamília ErbB/HER es van extreure de dos repositoris:

- *ChEMBL*: conté dades d'afinitat *in vitro* entre petites molècules i proteïnes extretes de fonts bibliogràfiques, principalment d'articles científics en revistes especialitzades⁶⁷.
- *DrugCentral*: conté dades d'afinitat *in vitro* entre fàrmacs i proteïnes. És un repositori públic que integra dades d'altres bases de dades públiques, entre elles ChEMBL⁶⁸.

Un altre mètode utilitzat és, a partir d'un article, retrocedir o recuperar les seves referències i discernir l'origen de les seves hipòtesis i conclusions. Per altra banda, una eina útil per recollir, gestionar i organitzar tota la informació recopilada ha estat el gestor de referències *Mendeley*⁶⁹.

4 RESULTATS I DISCUSIÓ

4.1 Efectes de la glicosilació sobre EGFR en situació normal i tumoral

La glicosilació és una de les modificacions post-traduccionals més rellevants que permet augmentar la variabilitat proteica de les glicoproteïnes depenent de la regió del cos en que es trobin o de la funció que hagin de portar a terme³⁰. EGFR és una glicoproteïna, altament glicosilada, relacionada amb la proliferació i la diferenciació cel·lular. Aquesta glicosilació extracel·lular pot modificar-ne l'activació i senyalització. Per això n'és important el seu estudi, ja que una glicosilació aberrant d'aquest receptor podria alterar-ne l'activitat⁷⁰. Per aquest motiu ens proposem estudiar la glicosilació d'aquest receptor i descobrir quins efectes causa en la seva funcionalitat.

La glicosilació EGFR pot influir en la seva senyalització. Les estructures glucídiques presents en l'ectodomini de l'EGFR poden regular-ne la conformació i les interaccions extracel·lulars, de tal forma que també n'afecten el plegament, estabilitat i activació, a part de definir-ne la seva localització i permanència a la membrana plasmàtica, i internalització cel·lular^{28,48}. Així doncs, l'activitat del receptor pot venir regulada pel seu patró de glicosilació, però no tots els llocs de glicosilació tenen el mateix efecte sobre EGFR, i el tipus de glicosilació també pot influir en la seva activitat. És important senyalar que el patró i el tipus de glicosilació de l'EGFR poden ser diferents depenent de la línia cel·lular d'estudi, i s'ha vist que en situació tumoral poden estar alterats^{28,71,72}. És per això, i per la sobreexpressió del receptor en nombrosos càncers⁷³, que l'estudi de la glicosilació de l'EGFR pot permetre'ns trobar noves dianes per la detecció i el tractament del càncers humans.

EGFR pot estar tan N-glicosilat com O-glicosilat (encara que la O-glicosilació no s'observi en totes les línies cel·lulars)^{74,75}. Pel que fa als N-glicans, EGFR conté 11 llocs canònics (N-X-S/T, on X és qualsevol aminoàcid excepte la prolina) potencialment N-glicosilables i 4 llocs atípics, no canònics (N-X-C), dels que només 1 dels 4 s'ha vist N-glicosilat^{27,74,76}. Com ja s'ha comentat, el patró de glicosilació que presenta EGFR pot variar depenent de la línia cel·lular. Per exemple, en la línia cel·lular A431 (línia cel·lular de carcinoma epidèrmic escatós, en anglès *epidermoid carcinoma*), d'aquests 11 llocs (N104, N151, N172, N328, N337, N389, N420, N504, N544, N579, N599), vuit estan N-glicosilats, dos no presenten glicosilació (N104 i N172), i un està parcialment glicosilat (N579), i també apareix un lloc atípic (N32) parcialment N-glicosilat⁷⁴. Cada lloc de N-glicosilació en particular té una funció específica per l'estabilitat de la glicoproteïna, i n'hi ha de més rellevants que altres. A tall d'exemple, l'eliminació de N-glicà de la **Asn420** (mutació) provoca que EGFR dimeritzi espontàniament, sense necessitat de lligand propiciant la seva desregulació⁷⁷.

La composició d'aquests llocs de glicosilació és una combinació d'estructures de tipus oligomanosa i tipus complex amb presència d'àcid siàlic i antigens de Le (Le^x, Le^y i SLe^x)^{74,76,78}. Estudis més recents^{79,80} han analitzat (a partir de simulacions) les interaccions entre el N-glicans i l'estructura extracel·lular de l'EGFR. Recordem que el domini extracel·lular de l'EGFR consta de quatre subdominis: DI (residus 1 al 165), DII (residus 166 al 310), DIII (residus 311 al 480) DIV (residus 481 al 620)⁸¹ (veure Fig. 1). Entre aquests subdominis, es destaquen un seguit de residus N-glicosilats. Els residus **Asn151** (DI) i **Asn328** (DIII) es troben en els dominis que intervenen en la unió del lligand. Aquests dos residus (Asn151 i 328) sovint estan N-glicosilats⁷⁴, i la presència dels glicans en aquests llocs augmenta l'afinitat d'unió d'EGF a EGFR. Els glicans en l'Asn151 i 328 interactuen entre ells i sostenen el domini d'unió al lligand obert i preparat per acceptar l'EGF, encara que aquests glicans no interactuen amb el lligand que s'uneix fortament a l'EGFR

per forces electrostàtiques⁸⁰. Les mutacions en llocs de glicosilació del subdomini III redueixen l'activació del receptor, mostrant que aquest subdomini és crucial per mantenir la conformació del receptor²⁸. L'EGFR conté dues interfases d'unió dimèrica, una al subdomini II i l'altre al subdomini IV. Aquestes dos interfases són vitals per la creació del dímer que s'han d'unir i mantenir. En el subdomini II hi ha el residu **Asn172** N-glicosilats que juntament amb **Asn337** (DIII) intervé en les interaccions que es creen quan es forma l'homo- o l'heterodímer (els receptors ErbB també presenten residus N-glicosilats homòlegs als descrits per EGFR). Per tant, els N-glicans de les Asn172 i Asn337 ajuden a establir la dimerització del dímer de l'EGFR. Aquest fet podria explicar la dimerització independent de lligand. Futurs estudis podrien comprovar si les mutacions en Asn172 i Asn337 disminueixen la quantitat de dímers de l'EGFR⁸⁰. Per altra banda, el DIV és altament flexible, i els N-glicans presents en aquest subdomini (Asn544, 579, 599) interaccionen amb els lípids de membrana ajudant a mantenir l'estructura plegada del monòmer de l'EGFR. Les delecions del residu **Asn579** s'han relacionat amb la dimerització espontània de l'EGFR indicant la seva participació en l'estabilitat de la conformació plegada de l'EGFR^{27,79}. Per últim, els altres N-glicans que es troben en EGFR també contribueixen a l'estabilitat del dímer, formant ponts d'hidrogen entre ells i la glicoproteïna^{27,80}. Aquests estudis senyalen que els N-glicans són essencials per la conformació adequada de l'EGFR, tant en conformació activa com la inactiva.

Es coneix que l'estabilitat del receptor monomèric és major en presència de lligand, seguida per la glicosilació i la dimerització, encara que tots tres juguen un rol determinant en el funcionament de l'EGFR. Tot i la possible activació de l'EGFR independentment de lligand, la intervenció d'aquest lligand atorga més estabilitat al dímer i permet regular l'activitat del receptor⁷⁹.

La composició de les seqüències dels N-glicans també influeix en el funcionament de l'EGFR. És a dir, que una glicosilació aberrant d'aquests llocs de glicosilació pot alterar l'EGFR així com la resposta cel·lular. Estudis de les seqüències glucídiques que presenta EGFR ho confirmen⁷⁰. Per exemple, s'ha vist que la **sialilació $\alpha 2,3$** i la **fucosilació terminal** suprimeixen la dimerització i l'autofosforilació de l'EGFR. Liu et al. van constatar que la sobreexpressió de les fucosiltransferases $\alpha 1,3$ (Fut3 i Fut4) i la sialiltransferasa $\alpha 2,3$ en cèl·lules tumorals pulmonars suprimia la dimerització i la fosforilació de l'EGFR induïdes per EGF⁷¹, Fig. 6. Aquests resultats s'han corroborat recentment en l'estudi de Jiang et al., en que utilitza la tècnica de glicosilació *in situ* per modificar els terminal glucídics de glicoproteïnes de membrana amb l'addició de radicals de fucosa $\alpha 1,3$ o àcid siàlic $\alpha 2,3$ observant una inhibició del senyal de l'EGFR⁸².

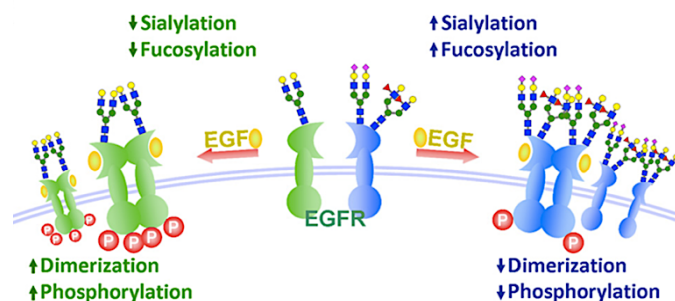


Fig 6. Sialilació i fucosilació suprimeixen l'activació de l'EGFR induïda per EGF (ligand). Figura extreta del Liu et al. 2011.⁷¹

Endinsant-nos en la sialilació, i arribant a la mateixa conclusió que Liu et al. que apunten a que un augment de la sialilació disminueix l'activitat de l'EGFR⁷¹, Park et al. va veure que la disminució de l'activitat de l' **$\alpha 2,6$ -sialtransferasa** afectava l'activació EGFR i promovia la

proliferació tumoral^{83,84}. A més, també s'ha vist que el tractament amb **sialidases** (que extreu tots els àcid siàlic units per α 2-3, α 2-6 i α 2-8) disminueix la sialilació terminal i facilita la formació dels dímers de l'EGFR induït per EGF així com la senyalització^{70,85,86}. Conjuntament, aquests estudis insinuen una relació inversa entre el grau de sialilació de l'EGFR i la seva activació, però tot i això, Yen et al. conclou que encara que la sialilació inhibeix la fosforilació de l'EGFR, aquesta no és suficient per suprimir completament el senyal del receptor i les seves repercussions en la proliferació tumoral⁷⁰. Mathew et al. arribant a la mateixa conclusió esmentada anteriorment^{70,87}, però per vies diferents. En l'estudi tracten les cèl·lules SW1990 amb **1,3,4-O-Bu₃ManNAc** (que dobla els nivells d'àcid siàlic α 2,6) per avaluar l'efecte de la sialilació sobre EGFR i la progressió tumoral. Afirmar que, en comptes d'afectar a la dimerització de l'EGFR, aquest tractament activa el tràfic cel·lular i la internalització de l'EGFR, per endocitosi, dirigint-lo cap a vies de lisi i reciclatge, demostrant així una altra via de control del senyal EGFR⁸⁸. Britain et al. en canvi, contradiu les observacions fetes per els autors anteriors i afirma que la sialilació α 2,6 (mitjançant un increment de l'activitat de ST6Gal-I) incrementa l'activitat de l'EGFR, permetent la proliferació tumoral. Aquest grup va estudiar tres línies cel·lulars diferents i totes tres mostraven una correlació entre l'increment de l'activitat de l'EGFR i la sialilació α 2,6 del receptor. Una possible explicació d'aquestes diferències és que la unió de l'àcid siàlic per α 2,3 o per α 2,6 no sempre és equivalent⁸⁹. Per tant, els resultats de Britain només es podrien comparar amb els de Park, ja que els dos autors estudien únicament els efectes de ST6Gal-I en la resposta de l'EGFR^{83,90}. Tot i això, aquesta explicació no cobreix la divergència dels resultats, que podria ser deguda a alteracions del domini quinasa de l'EGFR provocades per la sialilació α 2,6.

En el cas de la **fucosilació** del EGFR, es dona una situació semblant. Els resultats observats per Liu et al. en relació a la fucosilació terminal senyalaven la inhibició de l'activitat de l'EGFR⁷¹. En canvi, els resultats de Takahashi et al. indiquen que la fucosilació dels epítops de Lewis i la fucosilació *core* (per FUT8) augmenten l'activitat de l'EGFR⁷². Per posar-ho tot en context, molts estudis han exclamat la importància de les FUTs en la progressió tumoral⁴⁶. Per exemple, Zhang et al. va demostrar que bloquejant l'expressió de FUT1 i FUT4 amb siRNA (*small interfering RNA*) s'inhibia el creixement tumoral degut a la inhibició del senyal d'EGFR⁹¹. Aquestes dues fucosiltransferases (FUT1/4) estan relacionades amb la formació dels epítops de **Lewis** Le^y i Le^x, oligosacàrids fucosilats presents en EGFR. S'ha vist que la inhibició de FUT1/4 disminueix els nivells Le^y, inhibeix l'activació d'EGFR i disminueix el creixement cel·lular⁹¹. L'antigen SLe^x també està relacionat amb l'activitat de l'EGFR⁹². S'ha observat que el bloqueig de SLe^x, ja sigui per d'inhibició amb iRNA (RNA d'interferència) o bé per anticossos, evita l'activació, fosforilació i senyalització d'EGFR en cèl·lules tumorals pulmonars^{92,93}. Cal mencionar que una elevada expressió de l'antigen SLe^x està relacionada amb una alta taxa de metastasi⁹⁴, i que la baixa expressió d'aquest epítop pot inhibir la regeneració del teixit danyat⁹³.

La **fucosilació core**, catalitzada per FUT8 (fucosilació α 1,6), és necessària per la unió de EGF a EGFR. S'ha vist que al reduir l'expressió del gen FUT8 disminueix la unió del lligand al receptor, i com a conseqüència la fosforilació i la senyalització de l'EGFR queden bloquejades. Degut a que la fucosa *core* es troba a la part més interna del N-glicà, no varia la conformació de l'EGFR però sí que afecta la seva afinitat pel lligand. S'ha vist que la reintroducció de FUT8 reverteix l'efecte causat, restablint l'activitat de l'EGFR^{48,95,96}.

El número de N-glicans i el seu grau de **ramificació** estan implicats en la regulació de l'**endocitosi** de l'EGFR, regulant la presència de l'EGFR a la superfície cel·lular⁹⁷. Els N-glicans de l'EGFR poden portar poli-N-acetilactosamina (poli-LACs) a les seves antenes i s'ha observat que la seva presència eviten l'endocitosi⁹⁸. Una de les hipòtesis que s'han suggerit és que la galectina 3 (Gal-3) s'uneix a aquestes ramificacions poli-LACs de l'EGFR i aquesta unió manté el receptor a la

superfície de membrana (evitant-ne l'endocitosi). Per contra, la **bifurcació** de GlcNAc dels N-glicans de l'EGFR (catalitzat per **GnT-III**) s'ha vist que disminueix la formació de repeticions de LacNAc, la qual cosa, provoca la disminució de la unió de EGFR a galectina-3, present a la superfície cel·lular, permetent-ne l'endocitosi⁹⁹. Això indicaria que l'especificitat de les terminacions dels N-glicans de l'EGFR podria regular les interaccions del receptor amb l'espai extracel·lular i regular-ne l'endocitosi⁷². Mathew et al. apunta que la sialilació dirigida (mitjançant el tractament amb 1,3,4-O-Bu3ManNAc) afebleix la unió de la galectina, incrementa la internalització de l'EGFR, i canvia el tràfic endosomal cap a una via d'endocitosi independent de clatrina (una de les proteïnes que forma les vesícules). També descriu que l'endocitosi dependent de clatrina no inhibeix la senyalització de l'EGFR un cop internalitzat com sí que ho fa la independent de clatrina que destrueix el receptor⁸⁸. Per altra banda, EGFR s'ha relacionat amb la proteïna pulmonar tensioactiva D (*surfactant protein D*, SP-D) que disminueix la capacitat d'unió de l'EGF desregulant-ne el senyal. Aquesta SP-D és una apoproteïna que pertany al subgrup col·lectiu de la superfamília de les lectines tipus C. Aquest subgrup reconeixen el N-glicans tipus oligomanoses de manera dependent de Ca²⁺. Hasegawa et al. va dir que SP-D i EGFR s'uneixen per la interacció entre els dominis de reconeixement de carbohidrats de SP-D i els N-glicans de l'EGFR. S'ha suggerit que SP-D competeix amb EGF per unir-se als N-glicans (tipus oligomanosa) de l'EGFR, i és possible que aquesta unió directament interfereixi amb la unió amb l'EGF, o bé, que en varïi la conformació i n'alteri les capacitats d'unió a EGFR^{48,72}.

Breument, la glicosilació és molt important per la regulació i el bon funcionament de les proteïnes extracel·lulars. Alteracions de la glicosilació, que es donen en molts càncers, poden provocar la desregulació de les interaccions entre les proteïnes de l'exterior cel·lular¹⁰⁰.

Cal remarcar que la desregulació i l'aparició d'un excessiu nombre d'EGFR pot ser deguda a diferents fets. Com per exemple, la sobreexpressió de l'EGFR (glicosilació en part), el senyal autocrí i paracrí de lligands de l'EGFR o degut a mutacions en aquest receptor que en desregulin l'activitat²⁵. EGFR està sobreexpressat i desregulat en molt tipus de carcinomes, entre ells cap i coll, mama, bufeta, ovari, renal, colon, NSCLC, etc.⁴.

4.2 Glicosilació de l'EGFR i la resposta dels tractaments anti-EGFR

L'estudi d'aquest receptor ha permès el desenvolupament de nombrosos tractaments antitumorals¹⁰¹, permetent diferents estratègies per bloquejar els efectes d'aquest receptor, ja sigui a nivell extracel·lular o intracel·lular. En aquest treball ens plantejarem si la presència de glicosilació en l'EGFR varia l'activitat d'aquests tractaments anti-EGFR.

4.2.1 Tractaments contra EGFR

Com ja s'ha comentat a la introducció, existeixen principalment dues vies d'inhibició de l'EGFR, els **anticossos monoclonals** i els **inhibidors de tirosina quinasa**, tot i que n'hi ha d'altres. En aquest treball ens preguntem si la presència de glicosilació en l'ectodomini de l'EGFR és determinant per la sensibilitat als tractaments anti-EGFR i si té algun efecte en el seu funcionament.

Una de les raons per apostar per aquestes vies és com a alternativa a la quimioteràpia. Els inhibidors d'EGFR tenen menys efectes secundaris que els citotòxics (tot i que també en tenen, com poden ser irritacions cutànies i diarrees¹⁰²), i a més, augmenten la selectivitat terapèutica. Aquests inhibidors es basen en la premissa d'addicció oncogènica, que és la teoria que les cèl·lules tumorals es refien de la sobreexpressió de determinats factors de creixement i receptors, com EGFR, per proliferar. Per tant, quan aquests receptors queden inhibits, les

cèl·lules canceroses moren. En canvi, les cèl·lules no tumorals, que, en general tenen més capacitat adaptativa, sobreviuen^{103,104}. És per aquesta eficàcia selectiva que l'activitat anti-proliferativa dels tractaments contra l'EGFR ha permès a la USFDA (*United States Food and Drug Administration*) aprovar diferents inhibidors d'EGFR pel tractament de càncers metastàtics: Gefitinib al 2003 per NSCLC cetuximab al 2004 per càncer colorectal, erlotinib al 2004 per NSCLC i per càncer de pàncreas, panitumumab al 2006 per càncer colorectal, lapatinib 2007 per càncer de mama. Des d'aleshores, els inhibidors de l'EGFR s'han utilitzat en altres càncers, com els de pulmó, colon, pàncreas i de cap i coll^{63,105}. Els inhibidors que han tingut més transcendència com a teràpies dirigides anti-EGFR són: els anticossos monoclonals cetuximab, panitumumab, zalutumumab i nimotuzumab; i els inhibidors tirosina quinasa gefitinib, erlotinib, lapatinib i afatinib. Tot i que hi ha altres inhibidors que també s'haurien d'estudiar amb més deteniment¹⁰⁶.

Anticossos monoclonals (mAb)

Els anticossos monoclonals anti-EGFR tenen una alta selectivitat pel receptor perquè exclusivament reconeixen certes parts del seu ectodomini. Els mAbs tenen diversos llocs d'interacció amb EGFR, en comparació amb els TKIs, a més les mutacions en el domini intracel·lular del receptor no afecten la unió dels anticossos²⁵. Fins i tot, alguns anticossos poden induir la lisi cel·lular activant el mecanisme de citotoxicitat mitjançada per les cèl·lules dependents d'anticossos (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC)¹⁰⁷.

Cetuximab (Erbix, TMC-225). Va ser el primer mAb aprovat pel tractament clínic. És un anticòs monoclonal quimèric humà/rata que s'uneix al subdomini III de l'EGFR. Bàsicament provoca la inducció de l'apoptosi, la inhibició de la proliferació i angiogènesis, i l'augment de la resposta davant de quimio- o radioteràpies¹⁰⁸. Cetuximab inhibeix la fosforilació de l'EGFR, impedit la unió d'altres lligand al receptor. A més, induïx el mecanisme de citotoxicitat ADCC que porta a la destrucció de les cèl·lules que estiguin marcades amb cetuximab¹⁰⁹. L'USFDA, el 2004, va aprova el seu ús pel càncer colorectal amb metastasi amb expressió de l'EGFR i resistent a *irinotecan* (quimioteràpia)¹¹⁰; i el 2008 es va aprovar el cetuximab amb combinació amb radioteràpia per el tractament local del càncer de cap i coll (HNSCC) en fase avançada. S'ha demostrat un increment en la supervivència observada (OS) en pacients amb fase avançada, en la utilització de radioteràpia combinada amb cetuximab comparat amb la OS en tractaments sense cetuximab¹¹¹.

Panitumumab (Vectibix, ABX-EGF). És un anticòs IgG2 monoclonal completament humà, amb gran afinitat per EGFR, actua bloquejant la unió del lligand i internalitzant el receptor¹¹². La USFDA va aprovar el panitumumab com a tractament de primera línia en pacients diagnosticats amb càncer de colon metastàtic amb *KRAS wild-type*. A més, s'han observat amb un increment de la seva supervivència en pacients amb HNSCC metastàtic, p16 negatiu, en administrar panitumumab¹¹³.

Zalutumumab. És un mAb completament humà anti-EGFR, que s'ha estudiat per càncers de cap i coll, però l'assaig en fase III de DAHANCA-19 (*Danish Head and Neck Cancer Group*), combinant radioteràpia i l'addició de zalutumumab, no mostra una OS significativament major que els tractaments de radioteràpia sols¹⁰⁶.

Nimotuzumab (h-R3). És un anticòs monoclonal humà recombinant anti-EGFR, estudiat en els gliomes de SCCHN (*squamous cell carcinoma of the head and neck*) que ha entrat en assaig fase III com a tractament local i regional de carcinomes nasofaríngeal¹⁰⁶.

Matuzumab (EMD-72000). És un anticòs IgG1 monocanal anti-EGFR completament humà. Els resultats dels seus estudis preclínic li han permès la seva entrada a estudis clínics de fase II, com a segona línia de tractament de NSCLC ¹¹⁴.

Anticòs monoclonal 806 (mAb806). És un anticòs IgG2 que s'uneix a un epítoc conformacional que s'exposa quan EGFR (*wild-type*) està sobreexpressat en cèl·lules tumorals o quan aquest receptor està mutat (p. ex, EGFRvIII). L'epítoc en qüestió està localitzat entre els aminoàcids 287 i 302 del subdomini II de l'ectodomini de l'EGFR. Aquest domini està emmascarat en l'estadi plegat del monòmer de l'EGFR, o en l'estadi estès del dímer unit a lligand¹¹⁵, el que explica que mAb806 no s'uneixi a l'EGFR en teixits normals (on es troba en conformació plegada). En canvi, en situació oncològica on EGFR està sobreexpressat, aquest epítoc queda al descobert permetent la unió de mAb806. Per últim, canvis en la conformació degut a canvis en la glicosilació o tractaments amb TKI AG1478 també augmenten l'aparició d'aquest epítoc ¹¹⁵.

Inhibidors tirosina quinasa (TKI)

L'activitat tirosina quinasa de l'EGFR, implicada en el creixement cel·lular, és també una diana per la lluita contra el càncer. L'EGFR s'activa degut a l'autofosforilació del domini citoplasmàtic i, per tant, la inhibició d'aquesta fosforilació inactiva la transmissió del senyal. És per això que els TKIs han demostrat gran eficàcia com agents antitumorals i molts d'ells han estat ja aprovats com a tractaments de primera línia. L'eficàcia d'aquests inhibidors pot ser deguda a diferents mecanismes d'acció: poden competir amb l'ATP, amb l'entitat de fosforilació, amb el substrat dels dos, o bé actuar al·lostèricament ²⁵.

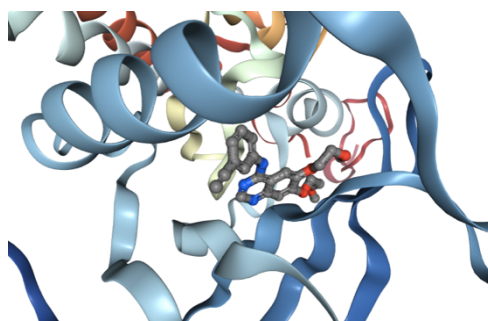


Fig. 7. Estructura de raigs X (codi PDB: 1M17) que confirma la interacció a nivell molecular d'erlotinib amb EGFR en el lloc d'unió de l'ATP. Figura extreta del Stamos et al. 2002.¹⁴⁴

Segons diverses fonts públiques (ChEMBL, DrugCentral), actualment hi ha fins a 18 fàrmacs (al mercat o en fase de desenvolupament) que mostren afinitats potents ($pK_i \geq 7.0$) per l'EGFR. A continuació es detallen les principals característiques d'alguns dels fàrmacs més representatius dirigits a interaccionar amb EGFR ^{67,68}.

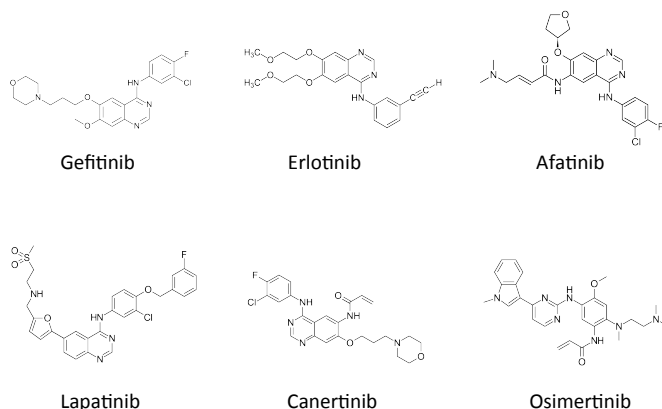


Fig. 8. Estructures de sis inhibidors de l'EGFR. Fer notar que, llevat d'osimertinib, l'inhibidor d'última generació, tots els inhibidors de l'EGFR comparteixen un motiu estructural d'anilopirimidina decorat amb diferents substituents que confereixen a cada fàrmac una farmacologia particular.

Font: DrugCentral.⁶⁸

Gefitinib (Iressa, ZDI1839). És un TKI selectiu per EGFR (ErbB1) de primera generació, que també pot inhibir ErbB2 en alguns càncers (ex, càncer de mama) ¹¹⁶. Aquest TKI inhibeix l'autofosforilació de varies línies cel·lulars. Al 2003, la USFDA, va aprovar-lo per pacients de

NSCLC, sobretot per aquells en que la quimioteràpia ha fallat. Aproximadament un 10% dels pacients de NSCLC responen a la teràpia amb gefitinib. Certes mutacions puntuals en el domini quinasa, concretament prop de la zona d'unió a ATP, poden provocar l'aparició de resistències davant del tractament²⁵.

Erlotinib (Tarceva). És un TKI reversible i selectiu contra EGFR (ErbB1) de primera generació, que bloqueja la progressió tumoral. La USFDA va aprovar el seu ús el 2004 per NSCLC i pel càncer de pàncreas local o metastàtic amb combinació de quimioteràpia, i el 2006 per al càncer colorectal⁶³. La USFDA al 2016 va modificar les indicacions d'erlotinib pel tractament de NSCLC per limitar-ne l'ús a aquells pacients que presentin tumors amb l'EGFR mutat. Específicament la deleció a l'exó 19, la deleció a l'exó 21 o la substitució L858R del gen EGFR presenten¹¹⁷.

Afatinib (Gilotrif, BIBW2992). És un TKI irreversible de segona generació, que inhibeix la transmissió del senyal de tots els homo- i heterodímers de la família ErbB. Ha estat aprovat pels tractaments de primera línia en pacients de NSCLC en aquells tumors que no presenten resistència deguda a mutació de l'EGFR i com a tractament opcional per aquells pacients amb NSCLC avançat que han progressat tot i la quimioteràpia utilitzant platí. S'ha vist que l'afatinib augmenta la OS en els pacients que presenten delecions en l'exó 19 comparat amb la quimioteràpia¹¹⁸.

Lapatinib (Tykerb). És un TKI reversible de segona generació, que és específic per els ErbB1 i també per ErbB2 en formar-se l'heterodímer²⁵. Va ser aprovat per la USFDA el 2007 pel tractament del càncer de mama avançat o metastàtic ErbB2 positiu¹¹⁹.

Canertinib. És un TKI experimental (estudi fase II) de segona generació, irreversible i no selectiu que actua sobre tots els membres de la família ErbB i té gran eficàcia i alta activitat antitumoral. El seu avantatge és que la freqüència de les seves dosis és menor; per altra banda, pot comprometre l'especificitat i la tolerabilitat. Pot inhibir l'activitat quinasa de l'EGFR a concentracions molt reduïdes que li dona una activitat antitumoral potent per EGFR i ErbB2. S'ha estudiat en carcinomes de mama i en NSCLC amb metàstasi²⁵.

Osimertinib (Tagrisso). És un inhibidor irreversible de l'EGFR de tercera generació aprovat recentment (2017), tant per la USFDA com per l'EMA (*European Medicines Agency*), pel tractament de casos de NSCLC en els que les cèl·lules cancerígenes tinguin una mutació específica (T790M) nativa o adquirida per resistència com a conseqüència d'un tractament previ amb altres inhibidors de l'EGFR (gefitinib o afatinib)¹²⁰.

En aquest punt, és bo fer una reflexió sobre la selectivitat dels TKIs i dels fàrmacs en general. La capacitat d'interaccionar amb múltiples proteïnes (polifarmacologia) és una propietat dels fàrmacs en general¹²¹. De fet, s'estima que de mitjana cada fàrmac interacciona amb 6 proteïnes¹²². La proteïna diana per la que el fàrmac ha estat optimitzat per interaccionar òptimament s'anomena diana primària (*primary target*); totes les altres proteïnes amb les que el fàrmac pot tenir interaccions biològicament rellevants constitueixen les anomenades proteïnes "fora de diana" (*off-targets*). L'afinitat del fàrmac amb el *primary target* en determinarà la seva eficàcia al tractament, mentre les afinitats pels *off-targets* seran responsables dels seus efectes secundaris, molts dels quals poden ser severos i fins i tot fatals. Per regla general, els fàrmacs solen presentar polifarmacologia per *off-targets* filogenèticament relacionats amb el seu *primary target*¹²².

En aquest sentit, malgrat els seus beneficis terapèutics evidents, els TKIs estan associats a nombrosos efectes secundaris. Això és degut a que moltes quinases estan estretament

relacionades filogenèticament (la seva seqüència al lloc d'enllaç dels inhibidors és similar) i, en conseqüència, és difícil aconseguir inhibidors prou selectius per la quinasa diana d'interès. La Taula 1 recull els perfils farmacològics de quatre inhibidors de l'EGFR (gefitinib, erlotinib, afatinib, i lapatinib). Tal i com es pot observar, malgrat ser potents inhibidors de l'EGFR (amb afinitats de l'ordre de 10 nM), tots ells tenen afinitats residuals per la resta de membres de la subfamília, prou potents per ser biològicament rellevants a les dosis administrades.

Taula 1. Perfil farmacològic de quatre fàrmacs representatius que tenen EGFR com a diana principal. Les afinitats pels diferents receptors estan donades en pK_i ($-\log K_i$). Font: ChEMBL⁶⁷ i DrugCentral⁶⁸.

Target	Gefitinib	Erlotinib	Afatinib	Lapatinib
EGFR	9.4	9.2	10	9.0
ErbB2	6.0	5.5	8.3	8.2
ErbB3	6.1	6.0	5.4	5.3
ErbB4	6.4	6.6	8.2	7.3

Altres molècules Anti-EGFR

Hi ha moltes altres inhibidors d'EGFR disponibles que esperen l'aprovació de la USFDA per el seu ús clínic²⁵. A més, hi ha altres vies d'estudi, la utilització d'oligonucleòtids sense sentit com a inhibidors, immunoconjugats com a anticossos, agents semblants a FR-18, pèptids, afiboides i nanoboides han arribat a fases preclíniques i a investigació clínica²⁵.

Mecanismes de resistència

La resistència pot ser adquirida o *de novo*. La **resistència adquirida** es dona quan la cèl·lula és capaç d'activar altres proteïnes que substitueixen les funcions de la proteïna inhibida. Encara que EGFR s'utilitzi com a diana per boquejar el creixement cel·lular, les nombroses interaccions i xarxes intracel·lulars podrien mantenir la cèl·lula activa encara que EGFR estigui inhibit. En canvi, la **resistència de novo** es dona quan la cèl·lula presenta la capacitat (abans de la interacció amb l'inhibidor) de continuar activa independentment de la inhibició de l'EGFR, junt amb una activació mínima d'altres vies compensatòries (contrari a la resistència adquirida). L'aparició de mutacions i amplificacions del gen de l'EGFR pot provocar el desenvolupament de resistències als anticossos i als inhibidors tirosina quinasa. Hi ha diferents vies en que la cèl·lula pot rodejar la inhibició de l'EGFR i presentar resistència¹²³. Per exemple, la desregulació de l'endocitosi de l'EGFR, amb la seva posterior degradació, provoca un augment de l'expressió de l'EGFR que causa la dimerització i la transactivació de ErbB2 i ErbB3, fet que pot provocar l'adquisició de resistències en NSCLC i SCCHN a cetuximab¹²⁴.

Les **mutacions** en el receptor són importants per determinar la sensibilitat als inhibidors de l'EGFR. Depenent de la mutacions de l'EGFR les cèl·lules presentaran més o menys sensibilitat als inhibidors. I és que certes mutacions són més efectives que altres. Una de les mutacions de l'EGFR que aporta més resistència és EGFRvIII (*EGFR variant III*), que és una variant de l'EGFR amb una estructura constitutiva truncada (falta el domini d'unió a lligand) però amb activitat tirosina quinasa. Aquesta variant s'ha identificat en el glioblastoma multiforme (GBM), tumor cerebral, i els pacients que la desenvolupen es tornen residents al gefitinib¹⁰⁵. Algunes de les mutacions es desenvolupen degut a una exposició prolongada a tractaments TKIs anti-EGFR. Un cas és la substitució T790M a l'exó 20 (substitució d'una treonina per una metionina a la posició 790) que afecta la capacitat d'unió del TKI al domini citoplasmàtic^{125,126}. Hi ha altres mutacions de l'EGFR que provoquen resistència als tractaments com L718Q, L844V i C797S per separat. En canvi, hi ha mutacions que n'augmenten la sensibilitat, com: L858R junt amb les mutacions L718Q, L844V o C797S, sensibles als TKI gefitinib i afatinib¹²³.

4.2.2 Sensibilitat dels tractaments anti-EGFR segons la seva glicosilació

Com s'ha explicat, EGFR pot ser inhibit tant pel seu domini extracel·lular com pel seu domini quinasa⁶³. A més, nombrosos estudis senyalen que la glicosilació, que es dona al domini extracel·lular, està implicada en l'alteració de la dimerització i la fosforilació de l'EGFR⁷¹. Per tant, podria ser que la glicosilació afectés directament la unió dels anticossos al domini extracel·lular, i influir indirectament en la unió dels TKI al domini intracel·lular.

La glicosilació externa de l'EGFR afecta el plegament proteic, alterant-ne la conformació i conseqüentment influint en l'activació del receptor^{26,74}. Els **anticossos** que tenen com a diana l'EGFR es poden unir a diferents regions del seu ectodomini. Per exemple, cetuximab bloqueja la unió del lligand a l'EGFR⁶⁰, matuzumab bloqueja la dimerització de l'EGFR¹⁰¹ i mAb806 s'uneix prop del braç de dimerització impeding-ne la dimerització¹²⁷. En presència de glicosilació és podria pensar que les interaccions entre els mAb i la superfície del EGFR s'haurien de veure alterades, ja que si el lloc d'unió entre l'anticòs i la superfície proteica presenta sucres, el reconeixement per part dels mAbs es podria veure alterat. En canvi, els estudis computacionals mostren que la glicosilació de l'EGFR no afecta l'afinitat d'unió dels anticossos amb el receptor, cetuximab no mostra canvis d'activitat en presència o absència de glicosilació¹²⁸. És més, altres estudis computacionals mostren que les interaccions entre l'anticòs i EGFR es creen per mitja dels glicans⁸⁰. Això podria explicar el perquè els anticossos són efectius en diferents tumors tot i la gran diversitat de patrons de glicosilació que expressen les cèl·lules⁶³. A més, el fet que la glicosilació no afecti a la unió dels anticossos, també explicaria el perquè els anticossos anti-EGFR obtinguts experimentalment, en absència de glicosilació, després s'uneixen a l'estructura glicoproteica. Per tant, sota aquestes observacions, els glicans de l'EGFR en general no disminueixen la capacitat d'unió dels anticossos anti-EGFR. Per altra banda, podria ser que els glicans augmentessin la capacitat d'unió dels anticossos a la proteïna. Un cas seria mAb806, que s'uneix a prop del braç de dimerització, en el subdomini II, inhibint la dimerització de l'EGFR¹²⁷. La presència del N-glicà en l'Asn337 provoca que l'epítip d'unió a l'anticòs mAb806 quedi més exposat, augmentant lleument (5%) la capacitat d'unió de mAb806 al EGFR¹²⁹. En canvi, un estudi experimental (no en EGFR sinó en un parent seu, ErbB2) mostra que la disminució de N-glicans augmenta l'activitat antitumoral de trastuzumab (un anticòs anti-ErbB2 utilitzat en càncer de mama HER2 positiu), mostrant que els anticossos si que es poden veure influïts negativament per la glicosilació¹³⁰. En aquest estudi amb ErbB2, s'analitza el tractament de cèl·lules de càncer de mama amb sobreexpressió de l'HER2 (ErbB2) amb tunicamicina (antibiòtic natural que impedeix la glicosilació de les proteïnes bloquejant el primer pas en la biosíntesis dels N-oligosacàrids en el reticle endoplasmàtic) i la seva resposta davant de la inhibició per part de trastuzumab, un anticòs pel que ràpidament apareixen resistències. Van observar que un tractament òptim amb tunicamicina sense provocar l'estrès del RE, però amb disminució dels N-glicans, augmentava els efectes antitumorals d'aquest anticòs anti-HER2¹³⁰.

Pel que fa a la inhibició per **TKI** s'ha vist que la glicosilació de l'EGFR afecta l'activitat inhibidora d'aquestes molècules petites. Britain et al. van comprovar que la sialilació α 2,6 de l'ectodomini de l'EGFR, per part de ST6Gal-I, provoca resistència a l'apoptosi induïda per gefitinib en tres línies cel·lulars tumorals diferents. Aquest grup va observar que hi havia una correlació directa entre l'activitat tirosina quinasa de l'EGFR i l'augment de la sialilació α 2,6 del receptor, tot i les diferències genètiques de les tres línies cel·lular estudiades⁹⁰. Aquestes observacions concorden amb els estudis de Park et al. que també va veure que la sialilació de EGFR prevenia la citotoxicitat induïda per gefitinib (Taula 2). Tot i això, hi ha una discordança entre els resultats d'aquests dos estudis respecte a l'activació de l'EGFR. Segons el grup de Britain et al., la sialilació α 2,6 de l'EGFR augmenta la fosforilació de l'EGFR, activant-lo⁹⁰. En canvi, segons Park, aquesta

sialilació inhibeix la fosforilació del domini tirosina quinasa induïda per lligand, inactivant l'EGFR⁸³. D'aquests dos autors el que se n'extreu és que la sialilació $\alpha 2,6$ altera el domini quinasa afectant la inhibició del TKI. Una de les possible explicació és que la modificació induïda per la sialilació $\alpha 2,6$ afecti el domini quinasa alterant-ne l'activitat. En el cas de Britain aquesta alteració augmentaria la fosforilació del receptor i impediria la unió del TKI. Per altra banda, en el cas de Park, aquesta modificació del domini quinasa afectaria la fosforilació (la unió de l'ATP) i també la unió del TKI. Contràriament, segons Yen et al., la disminució de la sialilació global ($\alpha 2,3$, $\alpha 2,6$ i $\alpha 2,8$), augmenta la fosforilació i disminueix la sensibilitat a gefitinib, encara que en es seu estudi no es va poder observar aquest efecte en totes les línies cel·lulars⁷⁰. Aquests resultats indicarien, seguint amb la hipòtesis anterior, que ja sigui per falta o per excés l'alteració de la sialilació podria estar relacionada amb modificacions conformacionals del domini quinasa, alterant-ne l'activitat. Tot i això, hi ha evidències que no tots els tipus de sialilació indueixen el mateix efecte. Per exemple la sialilació $\alpha 2,3$ i la $\alpha 2,6$ no tenen perquè tenir la mateixa funció⁸⁹, pel que pot ser que l'afecta de les sialidases (disminució de la sialilació global) no sigui comparable a la sobreexpressió de ST6Gal-1 (sialilació $\alpha 2,6$). Tornant a la sialilació $\alpha 2,6$, Mathew et al. van aconseguir re-sensibilitzar cèl·lules pancreàtiques resistents a TKIs (gefitinib i erlotinib) utilitzant un tractament amb 1,3,4-O-Bu3ManNAz ("glioenginyeria metabòlica"), que incrementa la sialilació $\alpha 2,6$. Aquest grup va observar que la sialilació de l'EGFR en disminueix la senyalització i conserva el potencial anti-cancerígen dels TKI. Però no va detectar alteracions significatives en la dimerització del receptor degut a la sialilació⁸⁸, com els altres estudis^{70,83,90}. Així doncs, van considerar la internalització del receptor com una via alternativa de regulació de l'EGFR mitjançada per sialilació⁸⁸. En aquest últim cas, caldria comprovar si el domini quinasa es veuria afectat.

Taula 2. Comparativa de l'efecte de la sialilació en EGFR en la seva activitat i sensibilitat davant de TKI.

Sialilació	Efecte sobre EGFR	Sensibilitat a TKI	Línia cel·lular ¹	Referència
↑ $\alpha 2,3$	↓ Dimerització	-	CL1-0/5	Liu et al. 2011
↑ $\alpha 2,6$ (ST6Gal-I)	↓ Fosforilació	↓ gefitinib	SW480	Park et al. 2012
↓ $\alpha 2,3/6/8$ (Sialidasa)	↑ Dim. Fos.	↓ gefitinib	A431, CL1-0/5	Yen et al. 2015
↑ $\alpha 2,6$ (1,3,4-O)	↑ endocitosis	↑ gefitinib i erlotinib	SW1990	Mathew et al. 2016
↑ $\alpha 2,6$ (ST6Gal-I)	↑ Activació, Fos.	↓ gefitinib	OV4, SKOV3, BxPC3	Britain et al. 2018

Augment (↑); disminució (↓); Sialidasa, eliminació de la sialialcò $\alpha 2,3$, $\alpha 2,6$ i $\alpha 2,8$; Dim, dimerització; Fos, Fosforilació; A431, carcinoma epidermoid; CL, carcinoma de pulmó; BxPC3, línia cel·lular de càncers de pàncreas; OV4 i SKOV3, línia cel·lular de càncers de ovari; SW1990, línia cel·lular de càncers de pàncreas en fase avançada; SW480, Línia cel·lular de carcinoma colorectal. ¹ Poden incloure altres línies cel·lulars d'estudi, s'ha anomenat les més rellevants.

Resumint, la sialilació és un tipus de glicosilació que ha portat molta controvèrsia. Tot i això, es podria dir que els nivells de sialilació afecten a la sensibilitat cel·lular al TKI anti-EGFR, tot i que no se sap encara ben bé com.

La sialilació no és l'únic tipus de glicosilació que pot afectar la sensibilitat dels TKI. La sobreexpressió de FUT8 (responsable de catalitzar la unió de la fucosa *core*) en la línia cel·lular HE293 (*Human embryonic kidney cells 293*) augmenta la sensibilitat a gefitinib en comparació amb cèl·lules control. La disminució de l'expressió de FUT8 redueix aquesta sensibilitat al TKI. També s'ha vist en la línia cel·lulars A549 (*adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells*), el *knockdown* de gen FUT8 també disminueix la sensibilitat a gefitinib en comparació amb les control⁹⁶. Continuant amb la susceptibilitat a erlotinib, s'ha demostrat que el tractament

amb tunicamicina (antibiòtic natural que impedeix la glicosilació de les proteïnes bloquejant el primer pas en la biosíntesis del N-oligosacàrids en el RE) en la línia cel·lular NSCLC augmenta la inhibició del creixement cel·lular mediat per EGFR. Particularment, aquest tractament re-sensibilitza les cèl·lules resistents a erlotinib. Aquesta sensibilització podria ser deguda a l'estrès del RE per culpa de tunicamicina i la posterior inhibició de la N-glicosilació de l'EGFR¹³¹.

Aquets estudis demostren que la glicosilació del receptor altera l'activitat i la efectivitat dels TKIs.

5 DISCUSSIÓ GENERAL

La unió del lligand a EGFR en el domini extracel·lular, propicia l'activació del receptor i la seva senyalització a nivell intracel·lular²¹. La sobreexpressió o la mutació d'aquest receptor s'ha associat al desenvolupament de nombrosos càncers, convertint-lo en una diana terapèutica anti-tumoral potent. Es coneixen varis anticossos i molècules capaces d'inhibir EGFR ja sigui atacant el domini extracel·lular o el domini quinasa intracel·lular^{60,101}. El domini extracel·lular de l'EGFR està format per una estructura proteica que presenta modificacions post-traduccionals (glicans) que poden afectar la seva conformació i estabilitat²⁸. Per fer-nos una idea, dels 180kDa de massa que té EGFR, 40kDa són del N-glicans²⁷. Estudis experimentals i computacionals demostren inequívocament que la glicosilació és necessària per la integritat i l'estabilitat de l'EGFR^{28,128}. En aquest treball ens preguntem com influeix la glicosilació sobre EGFR i si aquesta glicosilació té algun efecte directe (unió dels mAb) com indirecte (inhibició per TKI) sobre els diferents tractaments anti-EGFR.

A grans trets la glicosilació de l'EGFR en disminueix la flexibilitat, i estabilitza la seva conformació ja sigui en forma monomèrica o dimèrica. Per altra banda, hi ha certes localitzacions en el conjunt de glicans que presenta EGFR (12 possibles llocs de glicosilació⁷⁴) que en regulen la conformació i afecten les interaccions amb el lligand. Per exemple s'ha vist, via mutagènesis, que els N-glicans de la posició 420 i 579 tenen un efecte inhibidor de la dimerització independent de lligand, mantenen el monòmer de l'EGFR en conformació plegada, en absència de lligand. La falta d'aquests dos glicans provoca que el lligand no es pugui unir i el receptor dimeritzi independentment de lligand^{27,28,77}. Els N-glicans de la posició 152 i 328 del subdomini d'unió a lligand I i III, respectivament, estabilitzen i augmenten la capacitat d'unió de l'EGF a EGFR⁸⁰. Pot ser la raó perquè aquests dos residus sovint es troben glicosilats en EGFR^{70,77}. A més, les mutacions dels llocs de glicosilació en el subdomini III disminueixen la capacitat d'unió del lligand al receptor²⁸, reafirmant la importància de la glicosilació de l'EGFR per la seva activitat. S'ha de deixar clar que els glicans no interactuen amb el lligand, interaccionen únicament amb l'estructura proteica del receptor i amb altres glicans, augmentant l'estabilitat del receptor dimeritzat. Altrament, l'existència dels llocs de glicosilació homòlegs en altres membres de la família ErbB reforça la idea que les interaccions entre glicans de diferents monòmers ErbB poden influir en l'estabilitat i la dimerització dels homo- i heterodímes d'aquesta família⁸⁰. Totes les evidències explicades anteriorment denoten la importància de la glicosilació en la regulació de l'EGFR. Varis autors afirmen que una glicosilació cel·lular aberrant pot alterar el comportament cel·lular¹³².

Els tipus de glicosilació expressat en situació tumoral pot variar depenent de la línia cel·lular d'estudi, dels danys genètics o altres factors com la presència de determinats enzims¹⁰⁰. S'ha vist que les terminacions dels N-glicans de l'EGFR pot influir en les interaccions d'aquest receptor amb el seu entorn propiciant un canvi en la seva regulació. Per exemple, estructures

oligomanoses en l'EGFR, i en presència de l'apoproteïna SP-D, poden influir en la unió a lligand⁷². El nombre de ramificacions dels N-glicans de l'EGFR està implicat amb la disminució de la seva endocitosis⁹⁷. Per exemple, la presència poli-LACs en aquestes ramificacions n'evita l'endocitosis possiblement per la interacció amb altres molècules com la Gal-3, que mantenen el receptor a superfície⁹⁸. Per contra, la bifurcació dels N-glicans de l'EGFR, catalitzada per la GnT-III, disminueix en nombre de poli-LACs permetent la endocitosis¹³³. Un altre factor que s'ha vist que regula la endocitosis és l'augment de la sialilació α 2,6 dirigida. S'ha vist que aquesta modificació afebleix la relació amb la galectina, incrementant el tràfic endosomal però per una via independent de clatrina. A diferència de l'endocitosis mediada per clatrina, que permet que es mantingui el senyal fins i tot un cop internalitzat el receptor i que es recicli el receptor a membrana, aquest tipus d'internalització provoca la digestió del receptor⁸⁸. A part de la regulació en la endocitosis, la sialilació és una glicosilació que ha portat controvèrsia.

Segons la literatura s'ha associat la presència d'àcid siàlic a un increment de la malignitat tumoral¹³⁴. Però estudis de l'efecte de la sialilació sobre EGFR afirmen que un augment de la sialilació en aquest receptor provoca una disminució de la seva dimerització i fosforilació en presència de EGF^{71,83}. S'ha vist que els tractaments amb sialidases (que extreuen tots els radicals siàlics (α 2,3, α 2,6 i α 2,8) de la superfície cel·lular) augmenten la dimerització i la fosforilació de l'EGFR^{70,86}, confirmant les observacions d'aquests autors. Si es relaciona l'EGFR amb la capacitat tumoral, l'augment de la sialilació disminuiria la proliferació cel·lular mitjançada per EGFR en comptes d'augmentar-la. Fins i tot, s'ha vist que l'augment de la sialilació α 2,6 pot estar implicada en la internalització del receptor degut a la inhibició de les interaccions extracel·lulars entre els N-glicans del receptor i la galectina que el mantenen a superfície, disminuint-ne la senyalització⁸⁷. Però un article més recent de Britain et al., contradiu els resultats obtinguts per altres autors, i afirma que l'augment de la sialilació α 2,6 provoca l'increment de la dimerització de l'EGFR així com la seva fosforilació⁹⁰. Per tant, augmentant la proliferació cel·lular. Aquest article és recolzat pels estudis en què s'associa l'increment de la sialilació α 2,6 amb un augment de la progressió tumoral^{36,135}. Aquest autor puntualitza que hi ha evidències de que la sialilació α 2,3 i α 2,6 no tenen perquè tenir el mateix efecte⁸⁹, intentant trobar una explicació a les seves discrepàncies amb estudis previs de Liu i Yen que afirmen que la disminució de la sialilació augmenta l'activitat de l'EGFR^{70,71}. Per altra banda, aquesta diferència entra els diferents tipus de sialilació no explica les discordàncies amb Park et al., que també va analitzar la sobreexpressió de ST6-Gal1 (sialilació α 2,6), arribant a conclusions oposades amb Britain respecte a la sialilació i la fosforilació de l'EGFR^{83,90}. De tota aquesta controvèrsia se'n pot extreure la importància de la sialilació en la regulació del comportament cel·lular. Fins i tot, hi ha determinades estratègies anti-tumorals que van en contra de la sialilació per frenar la malignitat tumoral associada a la sialilació α 2,6^{134,136}. Però, si l'augment de la sialilació disminueix l'activitat de l'EGFR, com deien els primers autors, aquesta estratègia estaria afavorint la progressió tumoral^{70,71,83,86}. En canvi, segons els resultats de Britain, aquesta estratègia estaria afavorint la inhibició de EGFR i afavorint una menor activitat tumoral. Així doncs, calen més estudis per arribar al fons de la qüestió. Per altra banda, el fet que no totes les línies cel·lulars responguin de la mateixa manera, davant d'aquestes alteracions podria explicar aquesta divergència de resultats.

Un d'aquests autors Liu et al., a part d'estudiar com la sialilació α 2,3 disminuïa l'activitat de l'EGFR, també va estudiar els efectes de la fucosilació terminal α 1,3 que també en disminuïa l'activitat⁷¹. No tots els tipus de fucosilació tenen el mateix efecte, per exemple la fucosilació *core* augmenta la capacitat de dimerització de l'EGFR, augmentant la seva senyalització⁴⁸, igual com els epítops Lewis (Le^y) i els epítops sialilats de Lewis (SLe^x), que s'ha vist que la seva inhibició evita l'activació per fosforilació i senyalització de l'EGFR^{91,93,94}.

No està clar si la modificació específica dels glicans podria controlar l'activitat de l'EGFR i la seva implicació en la resposta cel·lular. Tot i la controvèrsia, en general es podria dir que la glicosilació afecta l'activitat de l'EGFR i que la seva regulació podria aportar noves estratègies de combat anti-tumorals.

6.1 Efectes dels mAb segons la glicosilació de l'EGFR

Tot i la importància de la glicosilació en l'estabilitat i la conformació de l'EGFR, els estudis computacionals realitzats per Kaszuba et al. senyalen que la glicosilació de l'EGFR no afecta en l'afinitat d'unió dels anticossos anti-EGFR amb el seu antigen. Per exemple, cetuximab no varia la seva afinitat d'unió independentment de la presència o absència de glicosilació^{80,128}. És més, Azimzadeh et al. diu que aquestes interaccions entre els mAb i el receptor podrien ser mitjançades pels mateixos glicans⁸⁰. Per tant, el fet que la glicosilació no afecti a la unió dels anticossos anti-EGFR al domini extracel·lular podria ser un dels motius del perquè aquests anticossos poden ser útils en diferents tumors tot i les variacions en el patró de glicosilació de les diferents línies cel·lulars⁶³. A més, també permet explicar perquè els mAb anti-EGFR que es generen en laboratoris en absència de glicosilació, després són capaços d'unir-se a la glicoproteïna de les cèl·lules tumorals glicosilades. Per altra banda, també a partir de simulacions, s'ha observat una lleu millora en l'afinitat d'unió del mAb806 que, a diferència d'altres anticossos anti-EGFR, s'uneix a la regió del braç de dimerització. Aquest anticòs mAb806, en presència del glicà de la posició Asn337, es veu lleugerament afavorit per una canvi conformacional que permet que els seu epítop d'unió a EGFR quedi més al descobert¹²⁷. Així doncs, la glicosilació podria afavorir un augment de l'afinitat d'unió de l'anticòs anti-EGFR i el receptor propiciant la seva inhibició (millorant l'efectivitat del tractament amb el mAb).

Tot i ser de gran ajuda per dissenyar fàrmacs i per les interpretacions a nivell molecular, els estudis computacionals tendeixen a considerar els patrons de glicosilació cel·lulars i els possibles tipus de glicosilació presents en ells com a negligibles⁸⁰. Aquests autors busquen explicar d'una forma clara les interaccions que es donen en el receptor en condicions normals. Però les cèl·lules presenten mecanismes complexos en la seva regulació, on hi intervenen molt factors, com el patró de glicosilació, que s'ha vist que pot afectar l'activitat cel·lular, sobre tot en situació tumoral^{72,100}. Cal confirmar experimentalment les observacions fetes en aquests estudis computacionals per aportar veracitat als resultats teòrics. Per altra banda, estudis fets amb ErbB2, un altre membre de la família ErbB, apunten a que la disminució dels N-glicans en la superfície cel·lular si que beneficia la unió de anticossos anti-HER2 (ErbB2) al receptor¹³⁰. Aquests resultats estan recolzats per un altre estudi més recent, també en HER2, on es veu que la presència de glicosilació també disminueix la capacitat d'unió de l'anticòs anti-HER2 a l'epítop del receptor¹³⁷. Calen, doncs, estudis experimentals per determinar si la glicosilació de l'EGFR té el mateix efecte negatiu sobre la interacció amb els mAbs que en el seu parent ErbB2, o si per contra la glicosilació de l'EGFR és beneficiosa per la interacció amb els mAbs i, conseqüentment, per la seva inhibició directe.

6.2 Efectes dels TKI en presència de glicosilació en EGFR

Recordem que canvis conformacionals a nivell extracel·lular de l'EGFR modulen alhora canvis conformacionals en el domini citoplasmàtic²⁴. Per tant, si la glicosilació del domini extracel·lular influeix en el reordenament conformacional del domini quinasa de l'EGFR, també afectarà a l'activitat quinasa i conseqüentment a la inhibició pels TKIs. Gefitinib és un TKI que s'utilitza per inhibir EGFR quan es troba sobreexpressat¹¹⁶. Aquest inhibidor s'ha fet servir en estudis per avaluar la sensibilitat al tractament de diferents línies cel·lulars en funció d'alteracions en la

glicosilació^{83,88,90}. Varis estudis concorden en que la sialilació de l'EGFR augmenta la resistència a aquest TKI^{83,90}. En canvi altres estudis, han observat un efecte invers, que la sialilació de l'EGFR provoca la sensibilització cel·lular al gefitinib^{70,88}. Aquesta divergència de resultats podria ser deguda a diferents factors. No tots els autors analitzen els mateixos valors, per exemple, Yen et al. utilitza sialidases per avaluar la resposta de l'EGFR en disminuir els nivells de la sialilació global ($\alpha 2,3$, $\alpha 2,6$ i $\alpha 2,8$). Aquest autor observa que aquesta reducció induïx l'activació de l'EGFR i amb ell l'augment de la resistència a gefitinib⁷⁰. Mathew, també va observar que l'augment de sialilació augmentava la sensibilitat a TKI (gefitinib i erlotinib) però en seguir els passos de Yen per comprovar si hi havia un augment en l'activació de EGFR, no va obtenir resultats significatius en la seva línia cel·lular d'estudi (pàncreas). Tot i això, aquest autor associa els seus resultats a un augment de l'endocitosi degut a que la sialilació $\alpha 2,6$ impedeix la unió de la galectina, cosa que afavoreix la internalització del receptor. A més, afirma que l'increment de la sialilació $\alpha 2,6$ és capaç de sensibilitzar línies cel·lulars resistents a TKI⁸⁸. Per contra, Park i Britain, que també van analitzar la sialilació $\alpha 2,6$ però en línies cel·lulars en que s'havia suprimit o sobreexpressat l'expressió de ST6Gal-I, apunten que l'augment de la sialilació augmenta la resistència a gefitinib. Tot i que concorden en l'efecte de la sialilació en la resistència de TKI, arriben a conclusions diferents pel que fa a la dimerització i fosforilació de l'EGFR. Park et al. afirma que, en cèl·lules de càncer colorectal, la sialilació $\alpha 2,6$ inhibeix el creixement cel·lular mediat per EGFR, en canvi, Britain et al. diu el contrari, que la sialilació $\alpha 2,6$ augmenta la fosforilació d'EGFR i per tant el creixement cel·lular de cèl·lules pancreàtiques i d'ovari^{83,90}. Ja sigui per les tècniques d'anàlisi o degut a les diferències en la línia cel·lular d'estudi, és evident que cal més informació per poder entendre l'efecte de la sialilació sobre EGFR i la resposta cel·lular. El que sí que és interessant és el fet que, independentment de l'efecte, la sialilació repercuteix sobre la sensibilitat dels TKI. En plantejar-nos el perquè, sorgeixen diverses hipòtesis.

A nivell del domini citoplasmàtic, una possible explicació és que el domini quinasa es vegi alterat com a conseqüència de la sialilació extracel·lular. En el cas de Park et al. es podria raonar que l'alteració de la conformació normal del receptor, per l'increment de la sialilació $\alpha 2,6$, alteri també el funcionament normal del domini quinasa de l'EGFR disminuint la fosforilació. Aquesta hipòtesi també explicaria el perquè hi ha més resistència a gefitinib, ja que l'alteració del domini quinasa degut a l'augment de la sialilació, faria que hi hagués menys afinitat d'unió per part dels TKI. L'explicació de Britain et al. també podria ser deguda a alteracions en el domini quinasa però a una reorganització que afavoriria la fosforilació i disminuiria l'afinitat a TKI. Mathew no detecta canvis significatius en la fosforilació del receptor en funció de la sialilació extracel·lular, però això no desmenteix ni confirma que hi hagi una reorganització del domini quinasa, que podria ser el causant d'aquesta re-sensibilització en les seves línies cel·lulars resistents. Ja que parlem de TKI, és important remarcar que encara que estigui prescrits per un receptor en concret, poden afectar altres receptors, inhibint la seva funcionalitat i afectant així la resposta cel·lular¹²¹, fet que podria explicar els diferents resultats obtinguts pels diferents autors. Per últim, encara que es comportin igual davant la sialilació i la resistència al TKI, estem parlant de línies cel·lulars diferents que es podrien regular per patrons genètics i expressions proteïques diferents, així que la resposta cel·lular no té perquè ser la mateixa.

A part de la sialilació, la fucosilació *core* de l'EGFR també afecta la sensibilitat a gefitinib. Es va veure que la supressió de l'expressió de FUT8 (gen que codifica per l'enzim Fut8, encarregat de catalitzar l'addició de la fucosa *core*) en dos línies cel·lulars diferents disminuïa la sensibilitat a aquest TKI⁹⁶. Finalment, la disminució global de N-glicans en EGFR, pel bloqueig de la seva síntesis, fa disminuir el creixement cel·lular mediat per EGFR junt amb la disminució de la resistència a TKI (en aquest cas erlotinib)¹³¹.

Molts articles parlen sobre com les modificacions en EGFR afecten l'eficàcia de la inhibició per TKI, i molt pocs és centren en com afecta la glicosilació de l'EGFR en aquesta inhibició. Calen més estudis per entendre el rol de la glicosilació en EGFR. Aquest receptor té una gran complexitat de mecanismes que en regulen l'activació; com la formació del dímer, la interacció amb la membrana, i la dinàmica entre els diferents compartiments cel·lulars, com l'endocitosi^{138,139}; i molt d'aquests mecanismes poden estar influïts per la glicosilació^{28,80,88,97,128}. No està clar si la modificació específica dels glicans podria controlar l'activitat de l'EGFR i la seva implicació en la resposta cel·lular. Però tot apunta a que la glicosilació del receptor altera l'activitat i l'efectivitat dels TKIs, senyalant la glicosilació com a nova via contra el càncer.

6.3 Glicosilació EGFR nova via contra el càncer

Des de fa temps que es coneix que les cèl·lules tumorals presenten una patró de glicosilació alterat¹⁴⁰. Tot i això, l'efecte d'aquesta alteració en el comportament tumoral encara és una incògnita. Tot i la desconexió de la reacció cel·lular, s'ha observat que la glicosilació no és aleatòria i que hi ha una sèrie de glicans que repetidament s'han vist associats a la progressió tumoral⁸⁹.

Cada individu respon de manera diferent davant d'un tractament amb inhibidors o a la teràpia dirigida, i s'han descrit diverses mutacions i polimorfismes de l'EGFR, que es poden fer servir com a factors predictius¹⁴¹. Una nova proposta seria fer servir la glicosilació anòmala com a marcador tumoral identificant el patró associat al càncer¹⁴². La sialilació α 2,6 en podria ser una bona candidata. També es podrien avaluar els nivells d'expressió de ST6Gal-I en els pacients tractats amb gefitinib i utilitzar-lo com a factor de pronòstic. Tot i això, donades les contradiccions en la bibliografia, calen més estudi per determinar l'efecte de la sialilació del EGFR en la resistència dels càncers als TKIs^{83,90,143}. Sabem que la presència de N-glicans en HER2, a certes línies cel·lulars, impedeix la unió dels anticossos i dificulta l'entrada de les molècules petites a l'interior cel·lular¹³⁷. S'ha suggerit eliminar els glicans alhora que s'aplica el tractament anti-EGFR, de manera que es facilitaria la unió dels inhibidors i l'eficàcia dels tractaments. A més, la inhibició en la biosíntesis dels N-glicans pot influir en el plegament proteic i podria ser una altra estratègia per reduir l'activació dels receptor TK (EGFR, ErbB2) en diferents càncers⁵². Tot i això, aquesta estratègia és molt delicada perquè podria afectar altres proteïnes, com també al funcionament cel·lular. Per últim, un estudi utilitza la tècnica de glicosilació "*in situ glycan edition*" per tal d'estudiar la resposta a la modificació dels glicans de l'EGFR⁸². Aquesta tècnica es podria utilitzar per resoldre dubtes sobre l'efecte de la glicosilació en receptors de membrana com EGFR. Utilitzant aquesta tècnica es podria resoldre la controvèrsia de la sialilació, senyalant si són convenient o no els tractaments anti-sialilació quan l'objectiu és EGFR. L'estudi de la glicosilació podria obrir noves portes per la creació de futurs tractaments contra el càncer.

6 ÈTICA I SOSTENIBILITAT

Aquest treball és merament de rescat d'informació i busca transmetre la informació vigent en la bibliografia científica per tal de resoldre un seguit de dubtes. Tota la informació inclosa està disponible obertament a la comunitat científica, i en cap moment es pretén fer un ús profitós d'aquest coneixement.

Les figures presents en el treball són adaptacions de llibres públics o figures extretes d'articles científics disponibles amb la finalitat d'il·lustrar l'explicació, acuradament referenciades, sota cap concepte per fer-ne un ús d'apropiament de la propietat intel·lectual.

7 CONCLUSIONS

EGFR is nowadays an attractive target for the fight against cancer. However, recent evidences of its extracellular glycosylation motivated the question of its potential interference with current treatments directed to inhibit EGFR activity. Accordingly, an effort was done to compile, on one hand, all the information available in the public domain about EGFR glycosylation and, on the other hand, the different therapeutic strategies used at present to inhibit the function of this receptor. The integrated analysis of these two pieces of information allowed for gaining a deeper understanding of the possible effects that EGFR glycosylation could have on the activity of EGFR and the response to EGFR-directed treatments.

The most relevant conclusions obtained in this project are:

1. EGFR glycosylation affects its activity by interfering with ligand binding, which alters EGFR's conformation and dimerization and thus, ultimately affecting its phosphorylation and signal transmission. Both the site and type of glycosylation influence EGFR conformation and activity. Apart from a few controversial studies, the general understanding is that terminal fucosylation and α 2,3 sialylation decrease the activity of EGFR. In contrast, other types of glycosylation, such as core fucosylation and Lewis epitopes, increase the activity of the receptor. In addition, receptor endocytosis could be also regulated by the presence of N-glycans.
2. Limited information could also be found linking EGFR glycosylation with EGFR-directed therapies with monoclonal antibodies (mAb) and tyrosine kinase inhibitors (TKI). Inconclusive results were obtained with respect to the effect of glycosylation on the activity of monoclonal antibodies, but they seem to suggest that glycosylation would not affect the binding of the antibody on the EGFR extracellular surface. In contrast, the activity of TKIs to inhibit EGFR function does seem to be indirectly modulated by EGFR glycosylation, although further investigations are certainly required to define the exact mechanistic details on how this occurs.
3. Since EGFR aberrant glycosylation can alter cellular behavior, it is of utmost importance to understand its functioning. Currently, there are different research lines in cancer trying to exploit glycosylation. One of them is the use of EGFR aberrant glycosylation as an oncological biomarker. Another new technique under investigations is the use of *in situ* glycan edition to study the effect of direct glycosylation modifications. Overall, there is still a clear need for additional studies to further understand EGFR glycosylation and its effects on cellular behavior and EGFR activity. Glycosylation in itself may well become a potential novel target against cancer.

ACRÒNIMS

A431	<i>Human epidermoid carcinoma, cancer cell line</i>
A549	<i>Human alveolar basal epithelial lung adenocarcinoma, cancer cell line</i>
ADCC	<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
CL1-0/5	<i>Lung cancer cell lines</i>
DAHANCA-19	<i>Danish Head and Neck Cancer Group 19</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ErbB	<i>Erythroblast oncogene B</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGFRvIII	<i>Epidermal growth factor receptor variant III (mutant)</i>
FUT	<i>Fucosiltransferasa</i>
GalNAc	<i>N-acetilgalactosamina</i>
Gal-3	<i>Galectin 3</i>
GlcNAc	<i>N-acetilglucosamina</i>
GnNAcT (GnT)	<i>N-acetilglucosaminiltransferasa</i>
HE293	<i>Human embryonic kidney cells 293</i>
HER	<i>Human epidermal growth factor receptor</i>
HNSCC	<i>Head and neck squamous-cell carcinoma</i>
KRAS	<i>Kirsten RAt Sarcoma</i>
Le	<i>Lewis epitope</i>
mAb	<i>Monoclonal antibody</i>
LAC	<i>N-acetilactosamina (LacNAc)</i>
NEU	<i>Neuraminidase (Sialidase)</i>
NSCLC	<i>Non-small-cell lung carcinoma</i>
O-GalNAc	<i>α-N-acetilgalactosamina</i>
O-GlcNAc	<i>β-N-acetilglucosamina</i>
OS	<i>Observed survival</i>
<i>pKi (-logKi)</i>	<i>Ligand affinity; Ki = interaction constant, binding constant</i>
POFUT	<i>O-fucosyltransferases</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
RE	<i>Reticle endoplasmàtic</i>
RNAi	<i>RNA interference</i>
RNAi	<i>RNA small interfering</i>
RTK	<i>Receptor tyrosine kinases</i>
SCCHN	<i>Squamous cell carcinoma of the head and neck</i>
SLe	<i>Sialyl lewis</i>
SP-D	<i>Surfactant protein D</i>
ST	<i>Sialyltransferase</i>
STn	<i>Sialyl Thomsen–Friedreich antigen</i>
SW1990	<i>Human pancreatic adenocarcinoma cell line SW-1990</i>
TGF-β ₁	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
TKI	<i>Tyrosine kinase inhibitor</i>
Tn	<i>Thomsen–Friedreich antigen</i>
USFDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
SW480	<i>Colorectal carcinoma cell line</i>

BIBLIOGRAFIA

1. NCI. Cancer Statistics. *National Cancer Institute* (2018). Available at: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>. (Accessed: 8th May 2018)
2. Gonzalez-Perez, A. *et al.* IntOGen-mutations identifies cancer drivers across tumor types. *Nat. Methods* **10**, 1081–2 (2013).
3. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science (80-.)*. **298**, 1912–34 (2002).
4. De Luca, A. *et al.* The role of the EGFR signaling in tumor microenvironment. *J. Cell. Physiol.* **214**, 559–567 (2008).
5. Mitsudomi, T. & Yatabe, Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J.* **277**, 301–308 (2010).
6. Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–34 (2010).
7. Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 127–137 (2001).
8. Arora, P., Cuevas, B. D., Russo, A., Johnson, G. L. & Trejo, J. Persistent transactivation of EGFR and ErbB2/HER2 by protease-activated receptor-1 promotes breast carcinoma cell invasion. *Oncogene* **27**, 4434–4445 (2008).
9. Hynes, N. E. & Stern, D. F. The biology of ErbB-2/NEU/HER-2 and its role in cancer. *BBA - Rev. Cancer* **1198**, 165–184 (1994).
10. da Cunha Santos, G., Shepherd, F. A. & Tsao, M. S. EGFR mutations and lung cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **6**, 49–69 (2011).
11. Burgess, A. W. *et al.* An Open-and-Shut Case? Recent Insights into the Activation of EGF/ErbB Receptors. *Mol. Cell* **12**, 541–552 (2003).
12. Hynes, N. E. & Lane, H. A. ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 341–354 (2005).
13. Riese, D. J. & Stern, D. F. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* **20**, 41–48 (1998).
14. Lax, I. *et al.* Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. *EMBO J.* **8**, 421–7 (1989).
15. Ogiso, H. *et al.* Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* **110**, 775–787 (2002).
16. Cho, H.-S. & Leahy, D. J. Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science (80-.)*. **297**, 1330–1333 (2002).
17. Ferguson, K. M. *et al.* EGF Activates Its Receptor by Removing Interactions that Autoinhibit Ectodomain Dimerization. *Mol. Cell* **11**, 507–517 (2003).
18. Humphrey, P. A. *et al.* Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 4207–4211 (1990).
19. Jungbluth, A. A. *et al.* A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the human epidermal growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 639–644 (2003).
20. Artega, C. Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. *Semin. Oncol.* **29**, 3–9 (2002).
21. Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A. & Kuriyan, J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* **125**, 1137–1149 (2006).
22. Wilson, K. J., Gilmore, J. L., Foley, J., Lemmon, M. A. & Riese, D. J. Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: Implications for cancer. *Pharmacol. Ther.* **122**, 1–8 (2009).
23. Olayioye, M. A. *et al.* ErbB-1 and ErbB-2 Acquire Distinct Signaling Properties Dependent upon Their Dimerization Partner. *Mol. Cell Biol.* **18**, 5042–5051 (1998).
24. Endres, N. F., Barros, T., Cantor, A. J. & Kuriyan, J. Emerging concepts in the regulation of the EGF receptor and other receptor tyrosine kinases. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 437–446 (2014).
25. Yewale, C., Baradia, D., Vhora, I., Patil, S. & Misra, A. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: A review of trends and strategies. *Biomaterials* **34**, 8690–8707 (2013).
26. Shan, Y. *et al.* Oncogenic mutations counteract intrinsic disorder in the EGFR kinase and promote receptor dimerization. *Cell* **149**, 860–870 (2012).
27. Whitson, K. B. *et al.* Functional effects of glycosylation at Asn-579 of the epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* **44**, 14920–14931 (2005).
28. Takahashi, M. *et al.* N-glycan of ErbB family plays a crucial role in dimer formation and tumor promotion. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1780**, 520–524 (2008).
29. Odaka, M., Kohda, D., Lax, I., Schlessinger, J. & Inagaki, F. Ligand-Binding Enhances the Affinity of Dimerization of the Extracellular Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Biochem.* **122**, 116–121 (1997).
30. Varki, A. *Essentials of Glycobiology [Internet]*. Cold Spring Harbor (NY) (Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017, 2015).
31. Christiansen, M. N. *et al.* Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics* **14**, 525–546 (2014).
32. Medzihradzsky, K. F. Characterization of Site-specific N-Glycosylation. in *Post-translational Modifications of Proteins* (ed. Kannicht, C.) **446**, 293–316 (Humana Press, 2008).
33. Potapenko, I. O. *et al.* Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Mol. Oncol.* **4**, 98–118 (2010).
34. Helenius, A. & Aebi, M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science (80-.)*. **291**, 2364–2369 (2001).
35. Thaysen-Andersen, M. & Packer, N. H. Site-specific glycoproteomics confirms that protein structure dictates formation of N-glycan type, core fucosylation and branching. *Glycobiology* **22**, 1440–1452 (2012).
36. Dall'Olio, F. & Chiricolo, M. Sialyltransferases in cancer. *Glycoconj. J.* **18**, 841–850 (2001).
37. Harduin-Lepers, A. *et al.* Sialyltransferases functions in cancers. *Front. Biosci.* **4**, 499–515 (2012).
38. Shah, M. H., Telang, S. D., Shah, P. M. & Patel, P. S. Tissue and serum α 2-3- and α 2-6-linkage specific sialylation changes in oral carcinogenesis. *Glycoconj. J.* **25**, 279–290 (2008).
39. Ugorski, M. & Laskowska, A. Sialyl Lewis(a): A tumor-associated carbohydrate antigen involved in adhesion and metastatic

- potential of cancer cells. *Acta Biochim. Pol.* **49**, 303–311 (2002).
40. Nakamori, S. *et al.* Increased expression of sialyl Lewisx antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Res.* **53**, 3632–3637 (1993).
 41. Ravindranath, M. H. *et al.* Endothelial-selectin ligands sialyl Lewisx and sialyl Lewis^a are differentiation antigens immunogenic in human melanoma. *Cancer* **79**, 1686–1697 (1997).
 42. Miyoshi, E., Moriwaki, K. & Nakagawa, T. Biological function of fucosylation in cancer biology. *Journal of Biochemistry* **143**, 725–729 (2008).
 43. Mollicone, R. *et al.* Activity, splice variants, conserved peptide motifs, and phylogeny of two New α 1,3-fucosyltransferase families (FUT10 and FUT11). *J. Biol. Chem.* **284**, 4723–4738 (2009).
 44. Ma, B., Simala-Grant, J. L. & Taylor, D. E. Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes. *Glycobiology* **16**, 158R–184R (2006).
 45. Miyoshi, E., Uozumi, N., Sobajima, T., Takamatsu, S. & Kamada, Y. Roles of Fucosyltransferases in Cancer Phenotypes. in *Glycosignals in cancer: Mechanisms of malignant phenotypes* (eds. Furukawa, K. & Fukuda, M.) 3–16 (2016).
 46. Wang, P. H. *et al.* Altered mRNA expressions of sialyltransferases in ovarian cancers. *Gynecol. Oncol.* **99**, 631–639 (2005).
 47. Becker, D. J. & Lowe, J. B. Fucose: Biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* **13**, 41R–53R (2003).
 48. Wang, X. *et al.* Core fucosylation regulates epidermal growth factor receptor-mediated intracellular signaling. *J. Biol. Chem.* **281**, 2572–2577 (2006).
 49. Wang, X. *et al.* Dysregulation of TGF- β 1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 15791–15796 (2005).
 50. Chen, C.-Y. *et al.* Fucosyltransferase 8 as a functional regulator of non-small cell lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 630–635 (2013).
 51. Stanley, P. & Cummings, R. D. Structures Common to Different Glycans. in *Essentials of Glycobiology [Internet]* (eds. Varki, A. *et al.*) (Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015–2017, 2017). doi:10.1101/glycobiology.3e.014
 52. Vasconcelos-Dos-Santos, A. *et al.* Biosynthetic machinery involved in aberrant glycosylation: promising targets for developing of drugs against cancer. *Front. Oncol.* **5**, 1–23 (2015).
 53. Le Pendu, J. *et al.* ABH and Lewis histo-blood group antigens in cancer. *APMIS* **109**, 9–26 (2001).
 54. Basbug, M. *et al.* Prognostic value of preoperative CEA and CA 19-9 levels in patients with colorectal cancer. *Hepatogastroenterology.* **58**, 400–405 (2011).
 55. Chen, H.-L. Lewis Glyco-Epitopes: Structure, Biosynthesis, and Functions. in *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-3* (ed. Wu, A.) **705**, 53–80 (Advances in Experimental Medicine and Biology, 2011).
 56. Häuselmann, I. & Borsig, L. Altered Tumor-Cell Glycosylation Promotes Metastasis. *Front. Oncol.* **4**, 28 (2014).
 57. Hakomori, S. Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines. *Adv. Exp. Med. Biol.* **491**, 369–402 (2001).
 58. Kawamoto, T. *et al.* Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 1337–1341 (1983).
 59. Sato, J. D. *et al.* Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors. *Mol. Biol. Med.* **1**, 511–29 (1983).
 60. Li, S. *et al.* Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* **7**, 301–311 (2005).
 61. Li, S., Kussie, P. & Ferguson, K. M. Structural Basis for EGF Receptor Inhibition by the Therapeutic Antibody IMC-11F8. *Structure* **16**, 216–227 (2008).
 62. Arteaga, C. L. & Engelman, J. A. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer cell* **25**, 282–303 (2014).
 63. Chong, C. R. & Jänne, P. A. The Quest to Overcome Resistance to EGFR-Targeted Therapies in Cancer. *Nat. Med.* **19**, 1389–1400 (2013).
 64. Batson, S. *et al.* Tyrosine kinase inhibitor combination therapy in first-line treatment of non-small-cell lung cancer: Systematic review and network meta-analysis. *Onco. Targets. Ther.* **10**, 2473–2482 (2017).
 65. NCBI. PubMed. *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine* (2018). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
 66. OMIM. OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. *Johns Hopkins University* (2018). Available at: <https://www.omim.org/>. (Accessed: 30th April 2018)
 67. Gaulton, A. *et al.* The ChEMBL database in 2017. *Nucleic Acids Res.* **45**, D945–D954 (2017).
 68. Ursu, O. *et al.* DrugCentral: Online drug compendium. *Nucleic Acids Res.* **45**, D932–D939 (2017).
 69. Mendeley. Mendeley. (2018).
 70. Yen, H.-Y. *et al.* Effect of sialylation on EGFR phosphorylation and resistance to tyrosine kinase inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 6955–6960 (2015).
 71. Liu, Y.-C. *et al.* Sialylation and fucosylation of epidermal growth factor receptor suppress its dimerization and activation in lung cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 11332–11337 (2011).
 72. Takahashi, M., Kizuka, Y., Ohtsubo, K., Gu, J. & Taniguchi, N. Disease-associated glycans on cell surface proteins. *Mol. Aspects Med.* **51**, 56–70 (2016).
 73. Yarden, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. Signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur. J. Cancer* **37**, 3–8 (2001).
 74. Zhen, Y., Caprioli, R. M. & Staros, J. V. Characterization of glycosylation sites of the epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* **42**, 5478–5492 (2003).
 75. Stateva, S. R. & Villalobo, A. O-GlcNAcylation of the human epidermal growth factor receptor. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 8196–8204 (2015).
 76. Sato, C. *et al.* Characterization of the N-Oligosaccharides Attached to the Atypical Asn-X-Cys Sequence of Recombinant Human Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Biochem.* **127**, 65–72 (2000).
 77. Tsuda, T., Ikeda, Y. & Taniguchi, N. The Asn-420-linked sugar chain in human epidermal growth factor receptor suppresses ligand-independent spontaneous oligomerization: Possible role of a specific sugar chain in controllable receptor activation. *J. Biol. Chem.* **275**, 21988–21994 (2000).
 78. Stroop, C. J. *et al.* Characterization of the carbohydrate chains of the secreted form of the human epidermal growth factor

- receptor. *Glycobiology* **10**, 901–17 (2000).
79. Taylor, E. S., Pol-Fachin, L., Lins, R. D. & Lower, S. K. Conformational stability of the epidermal growth factor (EGF) receptor as influenced by glycosylation, dimerization and EGF hormone binding. *Proteins* **85**, 561–570 (2017).
 80. Azimzadeh Irani, M., Kannan, S. & Verma, C. Role of N-glycosylation in EGFR ectodomain ligand binding. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **85**, 1529–1549 (2017).
 81. Lu, C. *et al.* Structural Evidence for Loose Linkage between Ligand Binding and Kinase Activation in the Epidermal Growth Factor Receptor. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 5432–5443 (2010).
 82. Jiang, H. *et al.* Modulating Cell-Surface Receptor Signaling and Ion Channel Functions by In Situ Glycan Editing. *Angew. Chemie Int. Ed.* **57**, 967–971 (2018).
 83. Park, J.-J. *et al.* Sialylation of epidermal growth factor receptor regulates receptor activity and chemosensitivity to gefitinib in colon cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **83**, 849–857 (2012).
 84. Yamamoto, H., Oviedo, A., Sweeley, C., Saito, T. & Moskal, J. R. α 2,6-Sialylation of Cell-Surface N-Glycans Inhibits Glioma Formation in Vivo. *Cancer Res.* **61**, 6822–6829 (2001).
 85. Meuillet, E. J. *et al.* Sialidase gene transfection enhances epidermal growth factor receptor activity in an epidermoid carcinoma cell line, A431. *Cancer Res.* **59**, 234–240 (1999).
 86. Mozzi, A. *et al.* NEU3 activity enhances EGFR activation without affecting EGFR expression and acts on its sialylation levels. *Glycobiology* **25**, 855–868 (2015).
 87. Mathew, M. P. *et al.* Metabolic glycoengineering sensitizes drug-resistant pancreatic cancer cells to tyrosine kinase inhibitors erlotinib and gefitinib. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **25**, 1223–1227 (2015).
 88. Mathew, M. P. *et al.* Metabolic flux-driven sialylation alters internalization, recycling, and drug sensitivity of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in SW1990 pancreatic cancer cells. *Oncotarget* **7**, 66491–66511 (2016).
 89. Varki, N. M. & Varki, A. Diversity in cell surface sialic acid presentations: Implications for biology and disease. *Lab. Invest.* **87**, 851–857 (2007).
 90. Britain, C. M., Holdbrooks, A. T., Anderson, J. C., Willey, C. D. & Bellis, S. L. Sialylation of EGFR by the ST6Gal-I sialyltransferase promotes EGFR activation and resistance to gefitinib-mediated cell death. *J. Ovarian Res.* **11**, 12 (2018).
 91. Zhang, Z. *et al.* Suppression of FUT1/FUT4 expression by siRNA inhibits tumor growth. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1783**, 287–296 (2008).
 92. Liang, J., Gao, W. & Cai, L. Fucosyltransferase VII promotes proliferation via the EGFR/AKT/mTOR pathway in A549 cells. *Onco. Targets. Ther.* **10**, 3971–3978 (2017).
 93. Allahverdian, S., Wang, A., Singhera, G. K., Wong, B. W. & Dorscheid, D. R. Sialyl Lewis X modification of the epidermal growth factor receptor regulates receptor function during airway epithelial wound repair. *Clin. Exp. Allergy* **40**, 607–618 (2010).
 94. Liang, J., Liang, Y. & Gao, W. Clinicopathological and prognostic significance of sialyl Lewis X overexpression in patients with cancer: a meta-analysis. *Onco. Targets. Ther.* **9**, 3113–3125 (2016).
 95. Li, W. *et al.* Down-regulation of trypsinogen expression is associated with growth retardation in α 1,6-fucosyltransferase-deficient mice: attenuation of proteinase-activated receptor 2 activity. *Glycobiology* **16**, 1007–1019 (2006).
 96. Matsumoto, K. *et al.* N-Glycan fucosylation of epidermal growth factor receptor modulates receptor activity and sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Sci.* **99**, 1611–1617 (2008).
 97. Lau, K. S. *et al.* Complex N-Glycan Number and Degree of Branching Cooperate to Regulate Cell Proliferation and Differentiation. *Cell* **129**, 123–34 (2007).
 98. Partridge, E. A. *et al.* Regulation of cytokine receptors by golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science (80-.)*. **306**, 120–124 (2004).
 99. Takahashi, M., Kuroki, Y., Ohtsubo, K. & Taniguchi, N. Core fucose and bisecting GlcNAc, the direct modifiers of the N-glycan core: their functions and target proteins. *Carbohydr. Res.* **344**, 1387–1390 (2009).
 100. Vajaria, B. N. & Patel, P. S. Glycosylation: a hallmark of cancer? *Glycoconj. J.* **34**, 147–156 (2017).
 101. Schmiedel, J., Blaukat, A., Li, S., Knöchel, T. & Ferguson, K. M. Matuzumab binding to EGFR prevents the conformational rearrangement required for dimerization. *Cancer Cell* **13**, 365–373 (2008).
 102. Maemondo, M. *et al.* Gefitinib or Chemotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer with Mutated EGFR. *N. Engl. J. Med.* **362**, 2380–2388 (2010).
 103. Malina, A., Cencic, R. & Pelletier, J. Targeting Translation Dependence in Cancer. *Oncotarget* **2**, 76–88 (2011).
 104. Weinstein, I. B. Cancer: Addiction to oncogenes - The Achilles heal of cancer. *Science (80-.)*. **297**, 63–64 (2002).
 105. Wheeler, D. L., Dunn, E. F. & Harari, P. M. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **7**, 493–507 (2010).
 106. Kozakiewicz, P. & Grzybowska-Szatkowska, L. Application of molecular targeted therapies in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol. Lett.* **15**, 7497–7505 (2018).
 107. Markovic, A. & Chung, C. H. Current role of EGF receptor monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors in the management of head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **12**, 1149–59 (2012).
 108. Matta, A. & Ralhan, R. Overview of current and future biologically based targeted therapies in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck Oncol.* **1**, 1–6 (2009).
 109. Huang, S.-M. & Harari, P. M. Modulation of Radiation Response after Epidermal Growth Factor Receptor Blockade in Squamous Cell Carcinomas: Inhibition of Damage Repair, Cell Cycle Kinetics, and Tumor Angiogenesis. *Clin. cancer Res.* **6**, 2166–74 (2000).
 110. Cunningham, D. *et al.* Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 337–345 (2004).
 111. Vermorken, J. B. *et al.* Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1116–1127 (2008).
 112. Yang, X. D., Jia, X. C., Corvalan, J. R., Wang, P. & Davis, C. G. Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **38**, 17–23 (2001).
 113. Vermorken, J. B. *et al.* Cisplatin and fluorouracil with or without panitumumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck (SPECTRUM): an open-label phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol.* **14**, 697–710 (2013).

114. Pirker, R. EGFR-directed monoclonal antibodies in non-small cell lung cancer. *Target. Oncol.* **8**, 47–53 (2013).
115. Gan, H. K., Burgess, A. W., Clayton, A. H. A. & Scott, A. M. Targeting of a conformationally exposed, tumor-specific epitope of EGFR as a strategy for cancer therapy. *Cancer Res.* **72**, 2924–2930 (2012).
116. Moulder, S. L. *et al.* Epidermal Growth Factor Receptor (HER1) Tyrosine Kinase Inhibitor ZD1839 (Iressa) Inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing Breast Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *Cancer Res.* **61**, 8887–8895 (2001).
117. US Food and Drug Administration. Approved Drugs - Erlotinib (Tarceva). *Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations* (2016). Available at: <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm525739.htm>. (Accessed: 3rd May 2018)
118. Deeks, E. D. & Keating, G. M. Afatinib in advanced NSCLC: a profile of its use. *Drugs Ther. Perspect.* **34**, 89–98 (2018).
119. GlaxoSmithKline. Tykerb (lapatinib) - Highlights of Prescribing Information. 1–35 (2014).
120. Jiang, X.-M. *et al.* Osimertinib (AZD9291) decreases programmed death ligand-1 in EGFR-mutated non-small cell lung cancer cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **38**, 1512–1520 (2017).
121. Jalencas, X. & Mestres, J. On the origins of drug polypharmacology. *Med. Chem. Commun.* **4**, 80–87 (2013).
122. Mestres, J., Gregori-Puigjané, E., Valverde, S. & Solé, R. V. Data completeness - The Achilles heel of drug-target networks. *Nat. Biotechnol.* **26**, 983–984 (2008).
123. Ercan, D. *et al.* EGFR Mutations and Resistance to Irreversible Pyrimidine-Based EGFR Inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **21**, 3913–23 (2015).
124. Wheeler, D. L. *et al.* Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: Role of HER (ErbB) family members. *Oncogene* **27**, 3944–3956 (2008).
125. Kobayashi, S. *et al.* EGFR Mutation and Resistance of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N. Engl. J. Med.* **352**, 786–792 (2005).
126. Pao, W. *et al.* Acquired Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib Is Associated with a Second Mutation in the EGFR Kinase Domain. *PLoS Med.* **2**, e73 (2005).
127. Ng, Y. Z., Kannan, S., Lane, D. P., Fuentes, G. & Verma, C. S. mAb806 binding to epidermal growth factor receptor: a computational study. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **83**, 153–168 (2015).
128. Kaszuba, K. *et al.* N-Glycosylation as determinant of epidermal growth factor receptor conformation in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 4334–4339 (2015).
129. Sivasubramanian, A., Chao, G., Pressler, H. M., Wittrup, K. D. & Gray, J. J. Structural model of the mAb 806-EGFR complex using computational docking followed by computational and experimental mutagenesis. *Structure* **14**, 401–414 (2006).
130. Han, X. *et al.* Tunicamycin enhances the antitumor activity of trastuzumab on breast cancer in vitro and in vivo. *Oncotarget* **6**, 38912–38925 (2015).
131. Ling, Y.-H., Li, T., Perez-Soler, R. & Haigentz Jr, M. Activation of ER stress and inhibition of EGFR N-glycosylation by tunicamycin enhances susceptibility of human non-small cell lung cancer cells to erlotinib. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **64**, 539–548 (2009).
132. Pinho, S. S. & Reis, C. A. Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer* **15**, 540–555 (2015).
133. Sato, Y. *et al.* Overexpression of N-Acetylglucosaminyltransferase III Enhances the Epidermal Growth Factor-induced Phosphorylation of ERK in HeLaS3 Cells by Up-regulation of the Internalization Rate of the Receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 11956–11962 (2001).
134. Vajaria, B. N., Patel, K. R., Begum, R. & Patel, P. S. Sialylation: an Avenue to Target Cancer Cells. *Pathol. Oncol. Res.* **22**, 443–447 (2016).
135. Schultz, M. J., Swindall, A. F. & Bellis, S. L. Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glycans. *Cancer Metastasis Rev.* **31**, 501–518 (2012).
136. Gnanapragassam, V. S. *et al.* Sialic Acid Metabolic Engineering: A Potential Strategy for the Neuroblastoma Therapy. *PLoS One* **9**, e105403 (2014).
137. Peiris, D. *et al.* Cellular glycosylation affects Herceptin binding and sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin and growth factors. *Sci. Rep.* **7**, 43006 (2017).
138. Perez-Torres, M., Guix, M., Gonzalez, A. & Arteaga, C. L. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) antibody down-regulates mutant receptors and inhibits tumors expressing EGFR mutations. *J. Biol. Chem.* **281**, 40183–40192 (2006).
139. Lemmon, M. A., Schlessinger, J. & Ferguson, K. M. The EGFR Family: Not So Prototypical Receptor Tyrosine Kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a020768 (2014).
140. Smith, K. D., Davies, M. J., Bailey, D., Renouf, D. V. & Hounsell, E. F. Analysis of the Glycosylation Patterns of the Extracellular Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Expressed in Chinese Hamster Ovary Fibroblasts. *Growth Factors* **13**, 121–132 (1996).
141. Obradović, J. *et al.* Frequencies of EGFR single nucleotide polymorphisms in non-small cell lung cancer patients and healthy individuals in the Republic of Serbia: a preliminary study. *Tumor Biol.* **37**, 10479–10486 (2016).
142. Chiang, W. F. *et al.* Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) promotes EGF receptor signaling of oral squamous cell carcinoma metastasis via the complex N-glycosylation. *Oncogene* **37**, 116–127 (2018).
143. Very, N., Lefebvre, T. & El Yazidi-Belkoura, I. Drug resistance related to aberrant glycosylation in colorectal cancer. *Oncotarget* **9**, 1380–1402 (2018).
144. Stamos, J., Sliwkowski, M. X. & Eigenbrot, C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J. Biol. Chem.* **277**, 46265–46272 (2002).