

جهش های سرطانزای ERBB3 در سرطان های انسانی

(Burgess et al., 2003). رسپتورهای ERBB توسط لیگاند-های چندگان های، مانند فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، فاکتور رشد انتقالی α (TGF- α) و نوروگولین ها، فعال می شود (Yarden and Sliwkowski, 2001). در پویایی رسپتور، یک مولکول سیگنالی ساده شرکت می کند که به طور همزمان به دامنه ی I و III متصل است که موجب هترودیمریزاسیون و همودایمریزاسیون از راه بازوی دایمریزاسیون در دامنه ی II می شود (Burgess et al, 2003; Cho and Leahy, 2002; Dawson et al., 2005; Lemmon and Schlessinger, 2010; Ogiso et al., 2002). در نبود لیگاند، بازوی دایمریزاسیون دامنه ی II از راه یک برهمکنش درون مولکولی با دامنه ی IV، بالا می رود که این امر موجب مهار شدن آن و ایجاد ساختار خود بازدارنده می شود (Burgess et al., 2003; Cho and Leahy, 2002; Dawson et al., 2005; Lemmon & Schlessinger, 2010; Ogiso et al., 2002).

شناسایی موتان های ERBB3

در اجرای تعیین توالی کل اگزوم از تومورهای روده بزرگ ابتدایی با نمونه های طبیعی همپوشانی داشته، پژوهشگران موتاسیون های سوماتیک را در ERBB3 شناسایی کردند (Seshagiri et al., 2012). برای درک بیشتر رابطه موتاسیون ERBB3 در تومورهای انسانی، همه ی اگزون های ERBB3 در همه ی نمونه های توموری اولیه در برگیرنده ی 100 نمونه روده های (70 نمونه از مجموع پایش [Seshagiri et al., 2012] و 30

خانواده گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسان (HER) از گروه تیروزینکینازها بوده و در سرطان های چندگانه، از راه تقویت و بیان زیاد، یا جهش تنظیم می شود. ERBB3/HER3، تنها عضو با دامنه ی کینازی معیوب است که در برخی سرطان ها افزایش یافته و یا بیشتر بیان می شود، ولی گزارشی مبنی بر حمل موتاسیون های سرطانزا توسط آنها وجود ندارد. در اینجای پژوهشگران در گزارشی به شناسایی جهش های سوماتیک ERBB3 در سرطان های روده و معده پرداختند. پژوهشگران دریافتند که جهش های ERBB3 سلول های اپیتلیال روده و سینه به شیوه مستقل از لیگاند منتقل می شود. اما، جهش در فعالیت سرطانزایی ERBB3 وابسته به ERBB2 فعال کینازی است. افزون بر این، آنتی بادی های ضد-ERBB و بازدارنده های مولکولی کوچک به طور موثری پیشرفت بیماری و سیگنالینگ انکوژنیک را با دخالت ERBB3، مهار می کند.

خانواده HER از تیروزین کینازهای گیرنده (RTK)، که به عنوان رسپتور ERBB نیز شناخته می شود، دارای چهار عضو است - ERBB1/HER1، EGFR/ERBB2/HER2، ERBB3/HER3، و ERBB4/HER4 (Baselga and Swain, 2009; Hynes and Lane, 2005). اعضای خانواده ERBB دارای یک دامنه ی خارج سلولی (ECD)، یک ناحیه تراغشایی تک محدوده-ای، یک دامنه ی تیروزین کینازیدرون سلولی، و یک دم سیگنالینگ در C-ترمینال است. ECD یک ساختار چهار دامنه یی است که دارای دو دامنه ی L (I و II) و دو دامنه ی غنی از سیستینین (IV و II) است. (Ferguson, 2008).

نمونه روده بزرگ)، ۹۲ نمونه معده، ۷۱ نمونه مربوط به آدنوکارسینوما (adeno) ریه سلول-غیر کوچک (NSCLC)، ۶۷ نمونه NSCLC (سنگفرشی)، ۴۵ نمونه کارسینوما کلیوی، ۳۷ نمونه سرطان پوستی، ۱۱ مورد سلول کبدی (HCC)، ۳۲ نمونه تخمدان، ۱۶ سلول بزرگ شش، ۱۵ مورد مری، ۱۲ مورد سرطان ریوی سلول-کوچک، و ۹ مورد از سرطانهای دیگر (۴ مورد سرطان ریه، ۲ مورد سکوم، یک مورد ریه (غدد عصبی، یک مورد پانکراس و یک مورد سرطان رکتوم) تعیین شد (جدولهای S۱ آنالیز). پژوهشگران پروتیین موتاسیون های ERBB3 در حال تغییری در ۱۲٪ موارد معدی (۱۱/۹۲)، ۱۱٪ از موارد روده بزرگ (۱۱/۱۰۰)، ۱٪ از NSCLC (آدنو؛ ۱/۷۱)، و ۱٪ از سرطان های NSCLC (۱/۶۷)؛ استخوان گیجگاهی) را یافتند (جدول S۱، شکل A۱). اگرچه بررسی های پیشین، موتاسیون های ERBB3 در حال تغییر پروتیین پراکنده در NSCLC (سنگفرشی؛ [۱۸۸/۳] ۵۰٪، TCGA، ۲۰۰۸)، گلیوبلاستما (TCGA، ۲۰۰۸؛ [۹۱/۱] ۱٪)، سرطان سینه مثبت-هورمونی (Kan et al., ۲۰۰۸؛ [۱۴۴/۶] ۴٪) (Stephens et al., ۲۰۱۲؛ [۱۰۰/۱] ۱٪) روده بزرگ؛ (Jeong et al., ۲۰۰۶؛ [۳۳۹/۳] ۱٪) (TCGA، ۲۰۱۱؛ [۲۲/۲] ۱۰٪) معده (Wang et al., ۲۰۰۷؛ [۲۲/۲] ۱۰٪) (et al., ۲۰۱۱) را گزارش می کند و سرطان سر و گردن (Stransky et al., ۲۰۱۱؛ [۷۴/۱] ۱٪)، اما هیچ وابستگی کارکردی در سرطان ها ارزیابی نشده است (شکل A۱؛ جدول های S۲ و S۳). در مجموع، بررسی های ژنومیک در مقیاس بالای اخیر، موتاسیون های ERBB3 را در در سرطان های روده بزرگ (TCGA، a۲۰۱۲؛ [۲۱۲/۱۴] ۷٪) و سینه (TCGA، b۲۰۱۲؛ [۴۸۴/۸] ۲٪) گزارش می کند. همه ی موتاسیون ها را در این بررسی از نظر سوماتیک بودن توسط تستی که حضور آنها را در DNA توموری اصلی و فقدان آن در بافت طبیعی اتصالی را از راه تعیین توالی و/یا آنالیز طیف سنجی جرمی تعیین می کند، گزارش شد. علاوه بر جهش های نامتعارف، پژوهشگران همچنین سه جهش (تغییر غیر پروتیینی) مترادف، در سرطان های روده بزرگ، معده، و تخمدان ها را کشف شد.

بیشتر موتاسیون های شناخته شده در تومورهای انسانی، در منطقه ECD جای گرفته اند، هرچند بخشی از دامنه ی کینازی و دم درون سلولی ERBB3 نقشه برداری شده است. جالب آنکه، در میان جهش های ECD، هفت موقعیت وجود دارد،

۷104، A232، P262، G284، D297، G325 و T355، که دارای جایگزین هایی در چندین نمونه بودند، که نقاط جهشی داغ را نشان می دهند. جالب است که جهش کدون ۱۰۴، اغلب فراوان بوده و در بررسی های زیادی دیده شده است (Stephens et al., 2012; TCGA, 202a, 2012b) که بیانگر رابطه عملکردی است. افزون بر این، بیشتر جایگزین های بی معنی در موقعیت های نقاط داغ، در تغییر اسید آمینه های مشابه، نشان دهنده نقش نهانی در این موتاسیون ها است. در مجموع نقاط داغ ECD، داده های موتاسیونی آنالیز متا، دو موتاسیون، S۸۴۶I و E۹۲۸G، در دامنه ی کینازی را شناسایی می کنند (Jeong et al., 2006; tcga, 2012a; ang et al., 2011).

جالب آنکه، بیشتر واحدهای جهش یافته مورد شناسایی ارتولوگ حفظ شده ERBB3 (شکل S۱A)، میباشند، که نشاندهنده آنست که این موتاسیونها اثر عملکردی دارند. برای درک بیشتر موتاسیونها، پژوهشگران نقشه ی آنها را برای انتشار (Cho & Leahy, 2002) ERBB3 ECD و ساختارهای کریستالی دامنه ی کینازی (Jura et al., 2009; Shi et al., 2010) (شکل های D۱-B۱؛ شکل B۱S). نمایان کرده اند. جالب آنکه، موتاسیون های نقطه داغ، در ۷104، A232 و G284 در کنش دامنه ی II/III دسته بندی شده است. دسته بندی این سه جایگاه کنشی بین دامنه ی I و II پیشنهاد می کند که آنها از راه مکانیسمی معمولی عمل می کنند. دامنه ی II دارای چندین مدول غنی از سیستمین است که مشابه مهره داران است. تغییرات اندک در ارتباط میان این اشکال نیمه مستقل به اهمیت میان اعضای خانواده تخصیص داده می شود (Alvarade et al., ۲۰۰۹).

می توان گفت موتاسیون های ۷104/A232/G284، یک یا تعداد بیشتری از این مدولها را تغییر میدهند و باعث تغییر فنوتیپ میشود. موتاسیون P262 اساس دامنه ی II، بوده که در مجاورت Q271 است و در برهمکنش دامنه ی II/IV برای بستن و تشکیل کنفرماسیون بسته مورد نیاز است، شرکت می کند. D297 در مجاورت بازوی بلند دامنه ی II قرار دارد و در هتروداپیریزاسیون تحت تأثیر اتصال به لیگاند، نقش دارد. تفاوت کنفرماسیون بزرگ در اعضای خانواده با یا بدون لیگاند دیده میشود، که به عمل لولایی در مرز دامنه ی II و III، که در محل G325 یافت می شود، نیاز دارد. به طور مشابه، T355 نیز دامنه ی II/III است

که در تغییرات کنفرماسیونی بزرگ رخ می دهد. موتان های دامنه ی کینازی واحدهای ۸۰۹ و ۸۴ همولوگ موقعیت های نزدیک به دم C-ترمینال در ساختار کینازی EGFR، است که بخشی است که نقش مهمی در اندوسیتوز دارد. واحد یا مجاور E928 بخشی از برهمکنش پروتیین/پروتیین هستند که در دایمر کینازی نامتقارن، در ساختارهای اشعه X دامنه های کینازی خانواده ERBB، دیده می شود. بیشتر وقت ها، اما نه همیشه، موتاسیون هایی که در اینجا توضیح داده شدند، در نزدیکی محل های عملکردی وجود دارد، که در اتصال لیگاند، برهمکنش های هترودایمی، تغییرات ساختار فضایی عظیم، یا سیگنالینگ احتمالی از در میان مدول های دامنه ی II نقش دارند. جزئیات طبیعت دقیق تغییرات این محل ها، و بازخوانی فنوتیپ آنها فراتر از موضوع آنالیز حال حاضر است. محل های موتاسیون ها در ERBB3 مشاهده می شود که ساختار آندر شکل S1B کشیده شده است.

در تلاشی برای درک حضور موتاسیون ها در انتخاب برخی ژن ها نظیر KRAS، HRAS، NRAS، BRAF، PIK3CA و AKT1-3 در نمونه های روده بزرگ و معده با موتاسیون های ERBB3، مجموع های از ژن ها را در این نمونه ها تعیین توالی و آنالیز شد. در ۳۰٪ از نمونه ها که موتاسیون های ERBB3 مستقل از موتاسیون های KRAS، BRAF، یا PIK3CA در سرطان های رودهای هستند (شکل S1C؛ جدول S4). در سرطان معده، در ۶۰٪ نمونه ها، موتاسیون های ERBB3 مستقل از ژن های مسیر تیروزینکینازی پذیرنده هستند (شکل S1C). موتاسیون های ERBB3 رشد مهارتی مستقل سلولهای اپیتلیال سینه و روده بزرگ را تقویت می کنند.

سلولهای زنده اپیتلیال روده بزرگ موش (IMCE) می تواند از راه Ras انکوژن منتقل شود (D'Abaco et al., 1996; Whitehead et al., 1993). پژوهشگران از سلول های IMCE استفاده کرده و موتاسیون های ERBB3 را برای رشد مستقل از لنگرگاه، سیگنالینگ، و تومورزایی در زیوه، از راه بیان پایدار جهش های ERBB3 به تنهایی یا در ترکیب با ERBB2، تست کردیم. پژوهشگران دریافتند که هنگامیکه تیپ وحشی ERBB3 (WT) یا موتاسیون ها روی خودشان بیان نمی شود، رشد لنگرگاه-مستقل تقویت نمی شود (شکل های A2؛ B2). به هرروی، بیشتر جهش های ERBB3، برخلاف ERBB3-WT، هنگامی که با ERBB2 بیان می شوند، رشد مستقل از لنگرگاه را تقویت می کنند (اشکال A2 و B2). همگام با

نمود رشد مستقل از لنگرگاه، بیشتر سلول های IMCE موتان های ERBB3 در حال بیان همراه با ERBB2، نشان می دهد که ERBB3 و/یا pERBB2 افزایش یافته و افزایش همزمان Pakt و یا PERK نیز مشاهده می شود (شکل های C2 و D2). اگرچه برخی موتان های ERBB3 بر روی خودشان pERBB3 افزایشی را نشان می دهند (شکل C2)، اما رشد مستقل از لنگرگاه یا سیگنالینگ پاییندست افزایش نمی یابد. پژوهشگران دریافتند که این امر موجب افزایش فعالیت اتوفسفیرلاسیون موتان ها در یک روش کینازی در شیشه، با استفاده از پروتیین های ERBB3 نوترکیب خلص میشود. برپایه گزارش ها (Shi et al. 2010)، پژوهشگران دریافتند که ERBB3 تیپ وحشی بیانگر فعالیت کینازی میباشد (شکل S2A). به هر روی، تحت شرایط مشابه در شیشه، افزایشی در فعالیت موتان های کینازی ERBB3 وابسته به پروتیینکیناز ERBB3-WT دیده نشد (شکل های S2A). گویا که تنها سطح افزایشی pERBB3 در سلول های موتانی که تنها ERBB3 در آنها در حال بیان است، برهمکنشی با دیگر اعضای آندوژن خانواده ERBB3 در سلول های IMCE یافت می شود. برای تایید فعالیت انکوژنی موتان های ERBB3، پژوهشگران چندین موتان ECD نقاط داغ را در سلول های در حال بیان، برای توانایی آنها برای افزایش رشد توموری در شیشه مورد آزمایش قرار دادند. همگام با توانایی آنها برای رشد مستقل از لنگرگاه و سیگنالینگ، سلول های IMCE بطور همزمان M7104، ERBB3، P262H، یا G284، را همراه با ERBB2 بیان می کند، که نشاندهنده افزایش رشد توموری (شکل E2) در مقایسه با ERBB3-WT یا ERBB2 به تنهایی یا ERBB3-WT و ERBB2 ترکیبی، است. همزمان با نیاز به ERBB2 در سیگنالینگ موتان ERBB3، پژوهشگران بیان موتان های ERBB3 و بیان ERBB2 (شکل S2) با استفاده از داده های RNA-seq، در هر دو تومور معده و روده بزرگ، را تایید کردند (Seshagiri et al., 2012). همچنین، نمونه های توموری اولیه موتان ERBB3 انسانی در هم در ERBB2 و هم در ERBB3 در سطح بالا بیان میشود (شکل های F2 و S2B-S2D).

بیان ERBB2 و ERBB3 به طور قابل توجهی (p value) برابر ۱۰^{-۱۰} و ۱۰^{-۲/۴} و ۱۰^{-۲/۵} به ترتیب برای ERBB2 و ERBB3 (ERBB3) در مقایسه با هفتاد و پنجمین درصد بیان همه ژن های کد کننده پروتیین که در نمونه های توموری بیان می

شوند، زیاده‌تر است (شکل های ۲۴، ۲۵، ۲۶ و ۲۷). همچنین، پژوهشگران دریافته‌اند که بیان ERBB۲ و ERBB۳ به طور معناداری (p value 10^{-3} * ۱/۱۴۳) در مجموعه داده‌های تومور روده‌های TCGA زیاد است (شکل ۲۵a; ۲۰۱۲a, TCGA). همچنین ERBB۳ و ERBB۲ در CW-۲ و DV-۹۰ بیان می‌شوند، دو مورد اخیر در لاین سلول‌های سرطانی جهش یافته‌های ERBB۳ شناخته شده‌اند (Garnett et al., ۲۰۱۲) که مشابه یا قابل مقایسه با تومورهای ERBB۳ است (شکل ۲۶). همچنین سطوح نابجای بیان ERBB۳ و ERBB۲ در سطوح پروتئینی در سلول‌های IMCE قابل مقایسه یا کمتر از سطوح مشاهده شده در لاین‌های سلولی جهش یافته ERBB۳، ERBB۲ و CW۲ DV-۹۰ است که حمایت‌کننده ارتباط موتان‌های ERBB۳ در سیگنالینگ انکوژنی است.

در آزمایش بیشتر، موتان‌های ERBB۳ را برای فعالیت انکوژنشان، با استفاده از سلول‌های اپیتلیال سین‌های MAF10A مورد آزمایش قرار گرفت. با توجه به موتاسیون‌های ERBB۳، همچنین در تومورهای پستان آنها نیز یافت شد. سلول‌های MCF۱۰A برای تکثیر به EGF نیاز دارد (Petersen et al., 1992; Soule et al., 1990) و می‌تواند مستقل از EGF بماند (Debnath et al., ۲۰۰۳; Muthuswamy et al., ۲۰۰۱). همچنین MCF۱۰A برای ارزیابی توان‌نهنی انکوژنی اعضای خانواده ERBB نیز استفاده می‌شود (Muthuswamy et al., ۲۰۰۱; Wang et al., ۲۰۰۶). برای تأیید بیشتر فعالیت انتقالی موتان‌های ERBB۳، پژوهشگران مجموعه‌ای از موتان‌های ERBB۳ را برای فعالیتشان جهت افزایش رشد مستقل EGF، تشکیل acinar، سیگنالینگ، رشد مستقل از از لنگر و مهاجرت توسط بیان آنها بتن‌هایی یا در ترکیب با ERBB۲ در سلول‌های MCF۱۰A مورد آزمایش قرار گرفتند (شکل های ۳A-۳F و ۳G). پژوهشگران دریافته‌اند که موتان‌های ERBB۳ به تنهایی در MCF۱۰A بیان می‌شوند و در فقدان NRG۱ لیگاند آگروژن و EGF، شکلگیری کولنی وجود نخواهد داشت (شکل ۳A). در حالی که، بیان موتان‌های ERBB۳ در ترکیب با ERBB۲، افزایش قابل توجهی در تشکیل کولنی، در مقایسه با سلول‌های ERBB۳-WT/ERBB۲، نشان می‌دهند (شکل های ۳A و ۳B). به طور مشابهی، در هنگام بیان موتان ERBB۳ به تنهایی بیانگر تکثیر مستقل از لیگاند، در حضور ERBB۲ است که افزایشی را در مقایسه با سلول‌هایی که ERBB۳-WT/ERBB۲ در آنها بیان می‌شود، نشان می‌دهد (شکل ۳C). در

مجموع پژوهشگران افزایش در ERBB۳، pAKT، را در سلول‌های موتان ERBB، در هنگام مقایسه با سلول‌های ERBB۳-WT دیده شد (شکل ۳D). افزایش در سیگنالینگ در سلول‌های MCF۱۰A به تنهایی در ERBB۳ در حال بیان، در مقایسه با سلول‌هایی که هم ERBB۳ و هم ERBB۲ را بیان می‌کنند، متوسط است و احتمالاً موجب ظهور اندوژن EGFR در سلول‌های MCF۱۰A (شکل ۳D) می‌شود. به علاوه، موتان‌های ERBB۳ در مقایسه با ERBB۲ موجب افزایش سطح ERBB۳، pERBB۳، pAKT، یا pERK می‌شود (شکل ۳D).

سلول‌های MCF ۱۰A اسفرویدهای کیس‌های را در هنگام کشت روی پایه ژل غشایی سه بعدی (۳D) بازسازی شده، در حضور EGF، تشکیل می‌دهند (Muthuswamy et al., ۲۰۱۱; Muthuswamy et al., ۲۰۰۱). به هر حال، بیان برخی انکوژن‌ها ممکن است مستقل از egf باشد و همچنین ساختارهای چندکیسه‌ای پیچیده‌ای را تشکیل می‌دهند (Bundy et al., ۲۰۰۵; Brummer et al., ۲۰۰۶). در بررسی‌های کشت سه بعدی فاقد سرم، EGF و NRB۲ در سلول‌های MCF۱۰A، ساختارهای کیسه‌ای را در مقایسه با سلول‌های MCF۱۰A-WT ایجاد می‌کند که همزمان ERBB۳-WT و ERBB۲ را بیان می‌کند (شکل ۳E). علیرغم افزایش بیان ERBB۲ در سلول‌های MCF۱۰A که در محیطی حاوی سرم و EGF کشت شده و موجب اختلال در تشکیل کیسه‌ها می‌شود (Muthuswamy et al., ۲۰۰۱)، پژوهشگران این را با ERBB۲ مشاهده نکردند، زیرا بررسی‌های فاقد سرم، EGF، و NRG۱ بودند. رنگ آمیزی برای Ki۶۷، یک مارکر برای تکثیر، در کیسه‌های مشتق از موتان ERBB۲/ERBB۳ همزمان در سلول‌های MCF۱۰A نیز بیان می‌شود، افزایش میزان تکثیر در همه موتان‌های مورد آزمایش را نشان دادند (شکل ۳F). به علاوه، در سلول‌های MCF۱۰A که مجموعه‌ای از موتان‌های ERBB۳ و ERBB۲ بیان می‌شود، نیز در مقایسه با سلول‌های ERBB۳-WT/ERBB۲، مهاجرت افزایش می‌یابد (شکل های ۳A و ۳B). این نتایج موید آنست که موتان‌های ERBB۳ در حضور ERBB۲ قادرند سیگنالینگ انکوژنیکی داشته باشند.