شرمین شادفر، دکتر ناجی
دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی

جهش های سرطانزای ERBB3 در سرطان های انسانی

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 اینجاپژوهشگران 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– EGFR/ERBB1/HER1، ERBB2/HER2، ERBB3/HER3، و ERBB٤/HER٤ ((Baselga and Swain, ۲۰۰۹; Hynes and Lane, ۲۰۰۵). 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 سیستیین (IV و II) است. (Ferguson, ۲۰۰۸; Burgess et al., ۲۰۰۳). 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, ۲۰۰۱). 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 یII 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 یII 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., ۲۰۱۲). برای درک بیشتر رابطه موتاسیون ERBB3 در تومورهای انسانی، همه ی اگزون های ERBB3 در همه ی نمونه های توموری اولیه در برگیرنده ی ۱۰۰ نمونه رودهای (۷۰ نمونه از مجموع پایش [Seshagiri et al., ۲۰۱۲] و ۳۰

نمونه روده بزرگ)، ۹۲ نمونه معده، ۷۱ نمونه مربوط به آدنوکارسینومای (adeno) ریه سلول-غیر کوچک (NSCLC)، ٦٧ نمونه NSCLC (سنگفرشی)، ٤٥ نمونه کارسینومای کلیوی، ۳۷ نمونه سرطان پوستی، ۱۱ مورد سلول کبدی (HCC)، ۳۲ نمونه تخمدان، ١٦ سلول بزرگ شش، ۱۵ مورد مری، ۱۲ مورد سرطان ریوی سلول-کوچک، و ۹ مورد از سرطانهای دیگر (٤ مورد سرطان ریه، ۲ مورد سکوم، یک مورد ریه (غدد عصبی، یک مورد پانکراس و یک مورد سرطان رکتوم) تعیین شد (جدولهای S۱ آنلاین). پژوهشگران پروتیین موتاسیون های ERBB3 در حال تغییری در۱۲٪ موارد معدی (۱۱/۹۲)، ۱۱٪از موارد روده بزرگ (۱۱/۱۰۰)، ۱٪ از NSCLC (آدنو؛ ۱/۷۱)، و ۱٪ از سرطان های NSCLC (۱/٦٧؛ 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] ۰/۵٪ TCGA،۲۰۰۸)،گلیوبلاسما (TCGA، ۲۰۰۸؛[۹۱/۱] ۱٪)، سرطان سینه مثبت-هورمونی (Kan et al.، [۱٤٤/٦] ٤٪) (Stephens et al.، ۲۰۱۲; ۲۰۱۰، روده بزرگ؛[۱۰۰/۱] ۱٪) (Jeong et al. ۲۰۰٦، تخمدان Greenman؛[۳۳۹/۳] ۱٪) (et al.، ۲۰۰۷; TCGA، ۲۰۱۱، معده Wang؛[۲۲/۲] ۱۰٪) (et al.، ۲۰۱۱) را گزارش می کند و سرطان سر و گردن (Stransky et al.، ۲۰۱۱؛[۷٤/۱] 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 ERBB۳ را در در سرطان های روده بزرگ (TCGA، a۲۰۱۲؛[۲۱۲/۱٤] ۷٪) و سینه (TCGA، b۲۰۱۲؛[٤۸٤/۸] ۲٪) گزارش می کند. همه ی موتاسیون ها را در این بررسی از نظر سوماتیک بودن توسط تستی که حضور آنها را در DNAی 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 ERBB۳ نقشه برداری شده است. جالب آنکه، در میان جهش های ECD، هفت موقعیت وجود دارد، V104، 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 ۱۰٤، اغلب فراوان بوده و در بررسی های زیادی دیده شده است (Stephens et al., 2012; TCGA, 202a, 2012b) که بیانگر رابطه عملکردی است. افزون براین، بیشتر جایگزین های بی معنی در موقعیت های نقاط داغ، در تغییر اسیدآمینه های مشابه، نشان دهنده نقش نهانی در این موتاسیون ها است. در مجموع نقاط داغ ECD، دادههای موتاسیونی آنالیز متا، دو موتاسیون، S۸٤٦I 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،پژوهشگراان 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 B۱-D۱؛ شکل B۱S).نمایان کرده اند. جالب آنکه، موتاسیون های نقطه داغ، در V104، A232 و G284 در کنش دامنه ی I/II 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 سیستیین 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 V104/A232/G284، یک یا تعداد بیشتری از این مدولها را تغییر میدهند و باعث تغییر فنوتیپ میشود. موتاسیون P262 اساس دامنه یII، 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 هترودایمریزاسیون 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 ۸٤ 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 E۹۲۸ 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 هترودایمری، تغییرات ساختار فضایی عظیم، یا سیگنالینگ احتمالی از در میان مدول های دامنه یII نقش دارند. جزییات 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 شاختار 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، در۶۰٪ نمونه ها، موتاسیون های ERBB3 مستقل از ژن های مسیر تیروزینکینازی پذیرنده هستند (شکل S1C).

موتاسیون های ERBB۳ رشد مهاری 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 ERBB۳ 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 (WT) ERBB3 یا موتاسیون ها روی خودشان بیان نمی شود، رشد لنگرگاه–مستقل تقویت نمی شود (شکل های A۲؛ B۲).

به هرروی، بیشتر جهش های ERBB3، برخلاف ERBB۳-WT، هنگامی که با ERBB۲ بیان می شوند، رشد مستقل از لنگرگاه را تقویت می کنند (اشکال A۲ و B۲). همگام با نمود رشد مستقل از لنگرگاه، بیشتر سلول های IMCE موتان های ERBB۳ در حال بیان همراه با ERBB۲، نشان می دهد که pERBB۳ و/یا pERBB۲ افزایش یافته و افزایش همزمان Pakt و یا pERK نیز مشاهده می شود (شکل هایC۲ و D۲). اگرچه برخی موتان های ERBB۳ بر روی خودشان pERBB۳ افزایشی را نشان می دهند (شکل C۲)، اما رشد مستقل از لنگرگاه یا سیگنالینگ پایینندست افزایش نمی یابد. پژوهشگران دریافتند که این امر موجب افزایش فعالیت اتوفسفریلاسیونی موتان ها در یک روش کینازی در شیشه، با استفاده از پروتیین های ERBB۳ نوترکیب خالص میشود. برپایه گزارش ها (Shi et al. 2010)،پژوهشگراان دریافتند که ERBB۳ تیپ وحشی بیانگر فعالیت کینازی میباشد (شکل S۲A). به هر روی ، تحت شرایط مشابه در شیشه، افزایشی در فعالیت موتان های کینازی ERBB۳ وابسته به پروتیینکیناز ERBB۳–WT دیده نشد(شکل های S۲A). گویا که تنها سطح افزایشی pERBB۳ در سلول های موتانی که تنها ERBB۳ در آنها در حال بیان است، برهمکنشی با دیگر اعضای آندوژن خانواده ERBB۳ در سلول های IMCE یافت می شود. برای تایید فعالیت انکوژنی موتان های ERBB۳،پژوهشگراان چندین موتان ECD نقاط داغ را در سلول های در حال بیان، برای توانایی آنها برای افزایش رشد توموری درشیشه مورد آزمایش قرار دادند. همگام با توانایی آنها برای رشد مستقل از لنگرگاه و سیگنالینگ، سلول های IMCE بطور همزمان ERBB۳ V۱۰٤M، P۲٦۲H، یا G۲۸٤، را همراه با ERBB۲ بیان می کند، که نشاندهنده افزایش رشد توموری (شکل E۲) در مقایسه با ERBB۳–WT یا ERBB۲ به تنهایی یا ERBB۳–WT و ERBB۲ ترکیبی، است. همزمان با نیاز به ERBB۲ در سیگنالینگ موتان ERBB۳،پژوهشگران بیان موتان های ERBB۳ و بیان ERBB۲ (شکل S۲) با استفاده از داده های RNA–seq، در هر دو تومور معده و روده بزرگ، را تایید کردند (Seshagiri et al., ۲۰۱۲). همچنین، نمونه های توموری اولیه موتان ERBB۳ انسانی در هم در ERBB۲ و هم در ERBB۳ در سطح بالا بیان میشود (شکل های F۲ و S۲B–S۲D).

بیان ERBB۲ و ERBB۳ به طور قابل توجهی (p value برابر $۱۰^{-۵}$*۱۰۲/٤ و $۱۰^{-٦}$*۲/۰۵ به ترتیب برای ERBB۲ و ERBB۳) در مقایسه با هفتاد و پنجمین درصد بیان همه ژن های کد کننده پروتیین که در نمونه های توموری بیان می

شوند، زیادتر است (شکل های S۲F، S۲C، و S۲D). همچنین، پژوهشگران دریافتند که بیان ERBB۲ و ERBB۳ به طور معناداری (p value ۱/۱٤۳ * ۱۰^-۳)در مجموعه داده های تومور رودهای TCGA زیاد است (شکل TCGA, ۲۰۱۲a; S۲E). همچنین ERBB۳ و هم ERBB۲ در CW-۲ و DV-۹۰ بیان می شوند، دو مورد اخیر در لاین سلول های سرطانی جهش یافته های ERBB۳ شناخته شده اند (Garnett et al., ۲۰۱۲) که مشابه یا قابل مقایسه با تومورهای ERBB۳ است (شکل S۲F). همچنین سطوح نابجای بیان ERBB۳ و ERBB۲ در سطوح پروتیینی در سلول های IMCE قابل مقایسه یا کمتر از سطوح مشاهده شده در لاین های سلولی جهش یافته ERBB۳، CW۲ و DV-۹۰ است که حمایت کننده ارتباط موتان های ERBB۳ در سیگنالینگ انکوژنی است.

در آزمایش بیشتر، موتان های ERBB۳ را برای فعالیت انکوژنیشان، با استفاده از سلول های اپیتلیال سین های MAF10A مورد آزمایش قرار گرفت. با توجه به موتاسیون های ERBB۳، همچنین در تومورهای پستان آنها نیز یافت شد. سلول های MCF۱۰A برای تکثیر به EGF نیاز دارد (Petersen et al., 1992; Soule et al., 1990) و می تواند مستقل از EGF به بیان انکوژنی بپردازد (Debnath et al, ۲۰۰۳; Muthuswamy et al, ۲۰۰۱). همچنین، MCF۱۰A برای ارزیابی توان نهانی انکوژنی اعضای خانواده ERBB نیز استفاده می شود. (Muthuswamy et a., ۲۰۰۱; Wang et al., ۲۰۰٦)

برای تأیید بیشتر فعالیت انتقالی موتان های ERBB۳، پژوهشگران مجموعه ای از موتان های ERBB۳ را برای فعالیتشان جهت افزایش رشد مستقل EGF، تشکیل acinar، سیگنالینگ، رشد مستقل از از لنگر و مهاجرت توسط بیان آنها بتن هایی یا در ترکیب با ERBB۲ در سلول های MCF۱۰A مورد آزمایش قرار گرفتند (شکل های ۳A-۳F و S۳). پژوهشگراان دریافتند که وقتی موتان های ERBB۳ به تنهایی در MCF۱۰A بیان می شوند و در فقدان NRG۱ لیگاند اگزوژن و EGF، شکلگیری کولنی وجود نخواهد داشت (شکل ۳A). درحالی که، بیان موتان های ERBB۳ در ترکیب با ERBB۲، افزایش قابل توجهی در تشکیل کلونی، در مقایسه با سلول های ERBB۳-WT/ERBB۲، نشان می دهند (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 سلول هایی که ERBB۳-WT/ ERBB۲ در آنها بیان می شود، نشان می دهد (شکل ۳C). در مجموع پژوهشگران افزایش در pERBB۳، pAKT، را در سلول های موتان ERBB، در هنگام مقایسه با سلول های ERBB۳-WT دیده شد (شکل D۳). افزایش در سیگنالینگ در سلول های MCF۱۰A به تنهایی در ERBB۳ در حال بیان، در مقایسه با سلول هایی که هم ERBB۳ و هم ERBB۲ را بیان می کنند، متوسط است و احتمالاً موجب ظهور اندوژن EGFR در سلول های MCF۱۰A (شکل ۳D) می شود. به علاوه، موتان های ERBB۳ در مقایسه با ERBB۲ موجب افزایش سطح pERBB۳، pERBB۳، pAKT، یا pERK می شود (شکل ۳D).

سلولهای MCF ۱۰A اسفرویدهای کیس های را در هنگام کشت روی پایه ژل غشایی سه بعدی (۳D) بازسازی-شده، در حضور EGF، تشکیل می دهند (Muthuswamy et al., ۲۰۰۱; Muthuswamy, ۲۰۱۱). به هر حال، بیان برخی انکوژن ها ممکن است مستقل از egf باشد و همچنین ساختارهای چندکیسه ای پیچیده ای را تشکیل می دهند (Brummer et al., ۲۰۰٦; Bundy et al., ۲۰۰۵; Debnath et al., ۲۰۰۳). در بررسی های کشت سه-بعدی فاقد سرم، EGF و NRBB۲ در سلول های MCF۱۰A، ساختارهای کیسه ای را در مقایسه با سلولهای MCF۱۰A-ای ایجاد میکند که همزمان ERBB۳-WT و ERBB۲ را بیان میکند (شکل ۳E). علیرغم افزایش بیان ERBB۲ در سلول های MCF۱۰A که در محیطی حاوی سرم و EGF کشت شده و موجب اختلال در تشکیل کیسه ها می شود (Muthuswamy et al., ۲۰۰۱)، پژوهشگران این را با ERBB۲ مشاهده نکردند، زیرا بررسی های فاقد سرم، EGF، و NRG۱ بودند. رنگ آمیزی برای Ki٦۷، یک مارکر برای تکثیر، در کیسه های مشتق از موتان ERBB۲/ERBB۳ که همزمان در سلولهای MCF۱۰A نیز بیان می شود، افزایش میزان تکثیر در همه موتان های مورد آزمایش را نشان دادند (شکل ۳F). به علاوه، در سلول های MCF۱۰A که مجموعه ای از موتان های ERBB۳ و ERBB۲ بیان می شود، نیز در مقایسه با سلول های ERBB۳-WT/ERBB۲، مهاجرت افزایش می یابد (شکل های S۳A و S۳B). این نتایج موید آنست که موتان های ERBB۳ در حضور ERBB۲ قادرند سیگنالینگ انکوژنیک داشته باشند.