

EGFR və HER2-nin Təkamüldə Qorunub Saxlanmış Farmokoloji Cəhətdən Mühüm Aminturşu Ardıcılıqlarının Kompüter Analizi

İlham Şahmuradov¹, Günay Əliyeva², Aysel Əliyeva³, Azad Əbdürəhimov⁴, Kərim Qasimov⁵

ETM Biofizika İnstitutu, Bakı, Azərbaycan

¹ilhambaku@gmail.com, ²aliyeva.gunay.1986@gmail.com, ³ayselaliyeva0130@gmail.com, ⁴aazadmed@gmail.com,

⁵gasimovk@yahoo.com

Annotasiya. Tirozinkinaza reseptorlarının ErbB ailəsinin iki üzvünün, təbii formalı EGFR (1210 qalıq, GenBank: NM_005228.5) və təbii formalı HER2 reseptorunun (125G Bankendu) hüceyrəxarici domeninin (ECD) təkamüldə qorunub saxlanmış aminturşu ardıcılığı (AAA75493.1), kompüter skaninqi ilə analiz edilmişdir. EGFR-in 633 və HER2-nin 640 qalıqdan ibarət olan ECD domenində yerləşən funksional domen ardıcılıqları üzərində təkrarlanan müxtəlif aminturşu ardıcılıqlarından ibarət olan motiflər qeyd edilmişdir. Verilənlər bazasından EGFR-in 3 splay variantı HER2-nin isə mövcud olan 2000-dən artıq splay və mutant variasiyasının 30-a qədər forması araşdırılmış və 10 nümunənin ECD domeninin müqayisəli analizi aparılmışdır. Bu zülalların ECD rayonunda çoxsaylı konservativ qalıqlardan ibarət olan motiflər uyğun nəhiyələrdə mühüm ardıcılığı təşkil edirlər. Bu ardıcılıqların böyük bir hissəsi digər, qeyri siqnal zülallarında da tapılmışdır ki, bu da ErbB reseptorlar ailəsinin təkamülcə daha qədim mənşəyə malik olduğuna dəlalat edir. Bu konservativ motif ardıcılıqları spesifik insanınkıləşdırılmış monoklonal anticismlərin hazırlanması zamanı mühüm epitop kimi istifadə oluna bilər.

Açar sözlər: ErbB reseptorlar ailəsi, tirozinkinaza, ECD kompüter skaninqi, MEME Suite, ScanProsite analizləri.

I. GİRİŞ

EGFR (HER1) və HER2 (insanın epidermal boy faktoru reseptoru – human epidermal growth factor Receptor) insanın tirozinkinaza reseptorlarının geniş öyrənilən ErbB ailəsinin dörd nümayəndəsindən ikisidir. Hər iki reseptor bu ailənin digər nümayəndələri kimi (N-sonluqlu) hüceyrəxarici domendən (ECD) transmembran spiraldan (heliks) (TMD) və hüceyrədaxili membrana yaxın domendən (JMD), kinaza domenindən (KD) və tirozin qalığı ilə zəngin C-sonluqlu quyruqdan (CTD) ibarətdir [1]. Bu ailənin üzvləri arasında HER2 yeganə reseptordur ki, onun məlum olan liqandı yoxdur, ona görə də, o liqandla induksiya olunan homodimeri əmələ gətirə bilmir. Amma, digər HER nümayəndələri liqandla birləşərkən və ya liqandsız dimerləşmə (anomaliya) zamanı onlarla asanlıqla heterodimeri əmələ gətirir və dimerdə hüceyrədaxili domendə olan tirozin qalıqlarını forsləşdirərək hüceyrədaxili siqnalın ötürülməsində mühüm rol oynayır [2–5]. HER2-nin daxil olduğu heterodimerlər arasında EGFR/HER2 və HER2/HER3 hüceyrə funksiyalarına olan təsirinə və xəstəliklərin yaranmasına görə ən uyğun dimerlərdir [6, 7].

HER ailəsinin bütün nümayəndələri yüksək dərəcədə tumorigenezlə əlaqələndirilir. Bunlardan EGFR (HER1) və HER2 şişlərin əmələ gəlməsində ən çox iştirak edən güclü onkozülallardır. Onların həddən artıq ekspressiyası (superekspressiya) süd vəzi, ağciyər və mədə-bağırsaq traktı da daxil olmaqla bir çox xərçəng növlərində iştirak edir.

HER2-nin həddindən artıq ekspressiyası süd vəzi xərçənginin və qeyri-kiçik hüceyrəli ağciyər xərçənginin (NSCLC) erkən mərhələlərində aşkar edilə bilər və metastatik xəstəliyə doğru irəliləyişdə [8–10] kritik rol oynayır, bu da HER2-nin süd vəzi xərçənginin və NSCLC karsinomasının inkişafında mühüm rol oynadığını göstərir. Nəticədə, HER2 bir çox süd vəzi və ağciyər xərçəngi xəstələrinin müalicəsində kritik bir terapevtik hədəfə çevrilə bilər.

Trastuzumab və Pertuzumab HER2-nin dörd funksional domendən (domen I, II, III və IV) ibarət olan hüceyrəxarici domeninə qarşı yönəlmiş monoklonal anticismlər olub [11] hal-hazırda HER2-müsbət süd vəzi xərçəngi xəstələri üçün müalicənin ilk seçimidir. Trastuzumab kimyaterapiya ilə birlikdə tətbiq edildikdə ümumi sağ qalma ehtimalını artırır və xəstəliyin təkrarlanma riskini azaldır. Pertuzumab isə HER2-nin hüceyrəxarici II domenində dimerləşmə çiyinə birləşir [12], onun EGFR ilə dimerləşməsinə mane olaraq siqnal ötürülməsini blok edir [13].

NSCLC karsinomasının müalicəsi zamanı trastuzumaba əsaslanan kimyaterapiyanın sadə (tək) kimyaterapiyadan üstün olduğu heç də aşkar edilməmişdi, orta sağqalma müddəti müvafiq olaraq 6,1 və 7 ay olmuşdur [14–16], trastuzumab və pertuzumabla isə ikili HER2 anticism blokadasının effektivliyi məhduddur (ORR 13%-21%). Bunun əksinə, poziotinib və pirotinib kimi yeni daha selektiv HER2 tirozinkinaza inhibitorları (TKI) HER2-mutanta qarşı müalicə olunmuş NSCLC xəstələrində müvafiq olaraq 38% və 44%-ə qədər cavab nisbətlərində perspektivli fəaliyyət göstərmişdir. Ən ümidverici məlumatlar HER2-mutant NSCLC olan xəstələrdə anticism-dərman konyuqatlarını (ADC) ado-trastuzumab-emptansin və trastuzumab-deruksitekanı qiymətləndirən II faza tədqiqatlarından əldə edilmişdir, bu zaman müsbət cavab müvafiq olaraq 50% və 62% təşkil etmişdir [10].

Bununla belə, bir sıra dəlillər HER2+ olan süd vəzi xərçənginin və NSCLC ağciyər xərçənginin uğurlu anti-HER2 terapiyadan sonra da HER2 siqnal şəbəkəsindən davamlı şəkildə asılı olduğunu göstərir [10, 17], bu da çox mərhələli

HER2 blokadasının mühümlüynə əsas verir. Digər tərəfdən Yeni Nəsil Ardıcılıq oxunmasının son nailiyyətləri indi HER2-nin hədsiz dərəcədə mutasiyaya məruz qaldığını, insan xərçənglərində 2000-dən çox unikal HER2 variantlarının müşahidə edildiyini ortaya qoyur [1]. Buna görə də, kliniki seçimi genişləndirmək və anti-HER2 müalicəsinin səmərəliliyini artırmaq üçün əlavə HER2 hədəflərinin, monoklonal anticism dizaynı üçün əlavə HER2 epitoplarnın axtarılması lazımdır. Hal-hazırda, pepscan, fag nümayişi və ya mutageniz skan edilməsi kimi bəzi eksperimental yanaşmalarla birlikdə üçölçülü (3D) quruluş məlumatlarının istifadəsi epitop əsaslı peyvənd dizaynının qızıl standartıdır [18, 19].

Bu araşdırmada EGFR və HER2-nin müxtəlif variantlarında EGFR və HER3 ilə HER2-nin heterodimerləşmə zonalarının qorunub saxlanan konservativ qalıqlarının axtarılmasının və trastuzumab və pertuzumabla yanaşı yeni alternativ monoklonal anticismlərin dizaynı üçün potensial yeni epitoplarn axtarışını həyata keçirilmişdir.

II. MATERIAL VƏ METODLAR

Tədqiqat materialı kimi EGFR (HER1) və HER2 ardıcılıqları haqqında məlumatların toplanması NCBI, RCSB-PDB, EMBL-EBI tərəfindən yaradılmış AlphaFold DB, EMBL-EBI UniProt və Protein Bioinformatics Databases and Resources – PMC kimi verilənlər bazasından istifadə edilmiş və analizlər NCBI Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), AlphaFold və UniProt kimi onlayn maşınlar vasitəsi ilə aparılmışdır.

Konservativ motif ardıcılıqların tapılması – identifikasiyasında üç əsas bioinformatik alət tətbiq edilmişdir:

MEME (Multiple EM for Motif Elicitation): Nukleotid ardıcılıqlarında statistik baxımdan əhəmiyyətli *de novo* motivlərin aşkarlanması üçün istifadə olunmuşdur. **Parametrlər:** Motiflərin sayı: 5 (10), uzunluq aralığı: 6–20 əç;

FIMO (Find Individual Motif Occurrences): MEME ilə aşkarlanmış motiflərin konkret ardıcılıqlarda və mövqələrdə yerləşməsini müəyyənəşdirmək üçün istifadə olunmuşdur. P-dəyəri kəsimi $1e-4$ olaraq seçilmişdir.

GLAM2: - qapalı motiflərin (insersiya və delesiyaları saxlayan) aşkarlanması məqsədilə tətbiq olunmuşdur. Bu metodla struktur variasiya göstərən, lakin funksional baxımdan əhəmiyyətli ola biləcək bölgələr müəyyən edilmişdir.

MEME Suite <https://meme-suite.org/meme/index.html> vasitəsilə aparılmışdır. MEME Suite motiflərin *de novo* aşkarlanması, məlum motiflərlə müqayisəsi və vizuallaşdırılması üçün geniş imkanlar verən bioinformatik platformadır.

Motif analizlərinin aparılması zamaqni Print və ScanProsite analizləri <https://prosite.expasy.org/scanprosite/> saytında aparılmışdır.

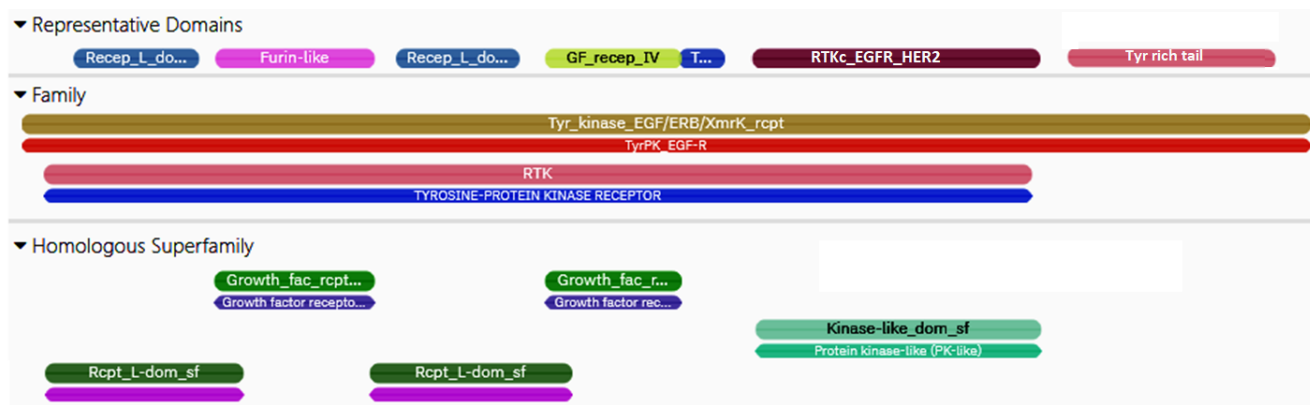
Tədqiqatlarda insanın 30-dan artıq HER2 zülal ardıcılığı (splays forma, mutasiya, insersiya və ya delesiyalı), 3 EGFR zülal ardıcılığı analiz olunmuşdur. Tədqiqat məqsədilə bu zülalların hüceyrəxarici domen (ECD) ardıcılıqlarının müqayisəli analizi aparılmışdır. Tədqiqatlarda həmçinin müqayisə üçün şimpanze, qorilla və siçanın HER2 zülalının ardıcılığı insanın HER2 zülalı ilə müqayisəli analiz edilmişdir.

III. NƏTİCƏLƏR VƏ ANALIZI

EGFR və HER2-nin kompüter skaninqi və konservativ qalıqlı motif analizi

Təbii formalı EGFR (HER1) kimi 1210 qalıqdan ibarət olan zülalın (GenBank: NM_005228.5) və HER2 zülalı kimi 1255 qalıqdan ibarət olan (GenBank: AAA75493.1) zülalın aminturşu ardıcılığı götürüldü. Analizlər EGFR-in 633 və HER2-nin 640 at qalığından ibarət olan hüceyrəxarici domeni (ECD) hissəsində yerləşən funksional domen ardıcılıqları üzərində aparıldı (şəkil 1).

Verilənlər bazasında EGFR-in yalnız 3 variantı tapılaraq müqayisəli analiz olundu. Bunlar NM_005228.5, 1210 aat; NM_001346900, 1157at; NM_001346899.2, 1165 at ibarət olan zülallardır. HER2-nin isə mövcud olan 2000-dən artıq variasiyasının [1] 30-dan artıq forması araşdırılmış və 10 nümunənin hüceyrəxarici domeninin müqayisəli analizi aparılmışdır.



Şəkil 1. ErbB ailəsi reseptor zülalları üçün ümumi funksional domən düzlənməsi. İki hüceyrəxarici L (liqand birləşdirən) domen, iki (furinəbənzər və GF) dimerləşmə domeni ECD-ni təşkil edir.

EGFR-ın 3 variantı arasında aparılan müqayisəli analiz göstərdi ki, bu variasiyaların təbii forma ilə arasında fərqlər 1157at-dan ibarət olan zülal (NM_001346900) üçün zülalın N-sonluğunda 53 amin turşusunun itməsi ilə, digər formada, 1165 at-dan ibarət olan (NM_001346899.2) formada isə təbii formanın N-sonluq rayonundakı 143-cü amin turşusundan 187-ci at-a qədər olan ardıcılığın itirilməsi ilə baş vermişdir. Birinci halda, NM_001346900 zülalı üçün itirilən aminturşu ardıcılığı mühüm funksional xarakter daşıyan hissə və ya motif deyildir (şəkil 2). Amma ikinci zülal, NM_001346899.2 üçün bu reseptorun bilobal liqand birləşdirən saytlarından birinci L domeni daxilindədir. Bu da reseptorun liqand birləşdirmə qabiliyyətində problemin yaranmasına səbəb ola bilər. İstənilən halda reseptorun dimerləşməsi üçün mühüm rol oynayan, dimerləşmə domeni adlanan sisteinlə zəngin furinə bənzər rayonunda, xüsusilə də dimerləşmə ilgəyində mutasiyalar müşahidə edilmir. Bu domen təkamül prosesində bir sıra məməlilər arasında da konservativ olaraq qorunub saxlanılmışdır. Bununla belə, EGFR-in homodimerləşməsi üçün dimerləşmə çiyində olan ardıcılıqlar dimerləşmənin əsas aparıcılarıdır, yəni dimerləşmənin aparıcı qüvvəsinin 90%-dən çox enerjisi bu çiyində olan qalıqlar hesabınadır [20]. Bu qalıqların dimerləşmə gücü müəlliflər tərəfindən bu qalıqlarda aparılan mutasiyalar nəticəsində dəyişilmə ilə yoxlanılmışdır.

Bu səbəbdən dimerləşmə çiyinin yerləşdiyi II domen (sisteinlə zəngin furinə-bənzər domen) ardıcılıqları fatal homodimerləşmənin qarşısının alınması üçün və ya mövcud dimerin ayrılması üçün ingibirləşdirici monoklonal anticism istehsalında epitop kimi istifadə edilə bilər.

Yuxarıda qeyd edildiyi kimi, HER2-də baş verən mutasiyaların, delesiyaların və insersiyaların daxil olduğu böyük sayda variasiyaların əksəriyyətində müşahidə olunan fərqlər hüceyrəxarici domendə (ECD) rast gəlinir (Ishiyama et al., 2023). Bizim apardığımız analizlərin demək olarki hamısında olan fərqlər ECD-də bilobal liqand birləşdirən domenlərdə (52-173 və 366-482 ardıcılıq rayonlarında) və boy faktoru reseptorunun IV hüceyrəxarici domeni ardıcılığı (511-643-cü aminturşu rayonu) daxilində müşahidə edilir (şəkil 2), daha stabil olan ikinci hüceyrəxarici domen – sisteinlə zəngin furinə-bənzər domen (189-338-ci aminturşu ardıcılığı) az dəyişikliyə məruz qalır.

HER2-nin hüceyrəxarici domeninin kompüter skaninqi və analizi çoxsaylı konservativ minturşu ardıcılıqlarından təşkil olunmuş motiflərin olduğunu aşkar edir (şəkil 3). Bu motiflərin bəziləri bir-birindən kənarda yerləşsə də bəziləri bir-birini örtür. Bəzi motiflər izə orqanizmdə olan qeyri reseptor zülallarında da müşahidə olunur. Bu da, bu zülallar arasında təkamülcə hansısa bağlılığın olduğuna dəlalət edir, hərçənd ki, bu zülallar heç də signal zülalları deyildir.

HER2-nin hüceyrəxarici domeninin kompüter skaninqi və analizi çoxsaylı konservativ minturşu ardıcılıqlarından təşkil olunmuş motiflərin olduğunu aşkar edir (şəkil 3). Bu motiflərin bəziləri bir-birindən kənarda yerləşsə də bəziləri bir-birini örtür. Bəzi motiflər izə orqanizmdə olan qeyri reseptor zülallarında da müşahidə olunur. Bu da, bu zülallar arasında təkamülcə hansısa bağlılığın olduğuna dəlalət edir, hərçənd ki, bu zülallar heç də signal zülalları deyildir.

NM_005228.5	1	MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKVKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEV	60
NM_001346899.2	1	MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKVKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEV	60
NM_001346900	1	-----MFNNCEV	7
NM_005228.5	61	VLGNLEITYVQRNYDLNFLKTIQEVAGYVLIANTVERIPLNQLIIRGNMYEENSIALA	120
NM_001346899.2	61	VLGNLEITYVQRNYDLNFLKTIQEVAGYVLIANTVERIPLNQLIIRGNMYEENSIALA	120
NM_001346900	8	VLGNLEITYVQRNYDLNFLKTIQEVAGYVLIANTVERIPLNQLIIRGNMYEENSIALA	67
NM_005228.5	121	VLSNYDANKTGLKELPMRNQLQEIHLGAVRFSNNPCLCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDF	180
NM_001346899.2	121	VLSNYDANKTGLKELPMRNQLQ-----	142
NM_001346900	68	VLSNYDANKTGLKELPMRNQLQEIHLGAVRFSNNPCLCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDF	127
NM_005228.5	181	QNHLSGSCQKCDPSPNGSCWGAGEENCQKLTKEICAQQCSGRGRGKSPSDCCHNQCAAGC	240
NM_001346899.2	143	-----QKCDPSPNGSCWGAGEENCQKLTKEICAQQCSGRGRGKSPSDCCHNQCAAGC	195
NM_001346900	128	QNHLSGSCQKCDPSPNGSCWGAGEENCQKLTKEICAQQCSGRGRGKSPSDCCHNQCAAGC	187
NM_005228.5	241	TGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPIMLYNPPTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYV	300
NM_001346899.2	196	TGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPIMLYNPPTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYV	255
NM_001346900	188	TGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPIMLYNPPTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYV	247
NM_005228.5	301	VTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHF	360
NM_001346899.2	256	VTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHF	315
NM_001346900	248	VTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHF	307
NM_005228.5	361	NCTSIGDLHLPLVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVEITGFLLIQAWPENRTDLHAF	420
NM_001346899.2	316	NCTSIGDLHLPLVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVEITGFLLIQAWPENRTDLHAF	375
NM_001346900	308	NCTSIGDLHLPLVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVEITGFLLIQAWPENRTDLHAF	367

Şəkil 2. EGFR-ın üç formasının ECD domeninin müqayisəli kompüter düzlənməsi. Qırıq xətlər hər bir formada itirilmiş ardıcılığın yerini göstərir. Təbii forma EGFR 1210 aminturşu qalıqından ibarətdir.

EGFR	1	MRPSGTAGAALLAALCPASRALEEKVKCGQTSNKLTLQGTFFEDHFLSLQRMFNNECVVLGNLEITYVQRNYDLSFLK	80
HER2	1	ME---LAALCRWGLLLALLPFGAA--STQVCTGTDMKRLRPASPTHLDMLRHLVQGCQVVGQGNLELTYPNTASLSFLQ	75
EGFR	81	TIQEVAGYVLIALNTVERIPIENLQIRGNMYEYNSYALAVLSNYD-----ANKTGLKELPMRNLQEIHLGAVRF	150
HER2	76	DIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTLQFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPTVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLI	155
EGFR	151	SNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLSGCGKCDPSCPNSSCWGAGEENCOKLTKEICAQQCSGRGRGKSPSD	230
HER2	156	QRNPQLCYQDTILWKDI FHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRGWGESSEDCQSLTRTV CAGGCA-RCKGFLPTD	234
EGFR	231	CCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPMLLYNPTTYQMDVNPPEGKYSFGATCVKCKPRNYVVTDHGSCVRA	310
HER2	235	CCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNFHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLV	314
EGFR	311	CGADSYEME-EDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFNCTSI SCDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDP	389
HER2	315	CPLHNQEVTAEDGTQRCCKSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANI QEFAGCKKI FGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQP	394
		VCYGLGMEHLREV	
EGFR	390	QELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSIAVVSINITSLSGLRSLKEISDGDVVISGNKNL	469
HER2	395	EQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPDLVSFQNLQVIRGRILHNGAYSILTQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNNTHL	474
EGFR	470	CYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPGECWGFPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRF	549
HER2	475	CFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDCEVGEGLACHQLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREY	554
EGFR	550	VENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTC PAGVMGE-NNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGC	628
HER2	555	VNARHCLPCHPECPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFFCVARCPSGVKPDLSPYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSC	634
EGFR	629	TGPGLEG	635
HER2	635	VDLDDKG	641

Şəkil 3. EGFR və HER2-nin MEME skaninqə görə aşkar edilən motifləri ECD ardıcılıqda parallel olaraq qeyd edilir. EGFR ECD-də tünd boz fonda, HER2 ECD-də isə altdan xətlə, qeyri siqnal zülalları ilə orta qalıqlar altdan ikiqat cızla vurğulanır.

Motif – CTGPGEECDIKCRKYSIDGATCVDKC (konsensus ardıcılıq NWTAEENVLPEAHFSCAPE-KKT) EGFR ECD-də 571-596, 515-540, 240-265, 199-224 və 271-296-ci ardıcılıqlarda təkrarlanır;

Motif – CWGPGPSQCACAHFKHPPFCVARC (konsensus ardıcılıq ·T·GHSD·LN·LQYLHPPF·EEH·) HER2 ECD-də 244-269, 520-545 və 576-601-ci qalıqlarda təkrarlanır;

Motif – CQQCHPNC (konsensus ardıcılıq ·IL· D· N·) EGFR ECD-də 617-625, 555-563, 187-195-ardıcılıqlarda təkrarlanır;

Motif ·YMPIAKFW (konsensus ardıcılıq C·PMV·FP) HER2 ECD-də 610-618-ci qalıqlarda yerləşir (iki təkrar hüceyrədaxili domendə 826 və 952-ci qalıqlarda);

Motif – PQQGFFSK (konsensus ardıcılıq P·HDQ·PL) EGFR ECD-də 431-439-cu qalıqlarda yerləşir (iki təkrar hüceyrədaxili domendə - 1119 və 1179-cu qalıqlarda);

Motif – LIQRNPQLCYKHTIPW (konsensus ardıcılıq ·KHRQHKIRQH·MPR) HER2 ECD-də 154-170 və 467-483-cü qalıqlarda təkrarlanır;

Motif – ITQLMTFG (konsensus ardıcılıq LWE·GP·E) EGFR ECD-də 38-46-cı qalıqlarda yerləşir (iki təkrar hüceyrədaxili domendə 789 və 904-cü qalıqlarda);

Motif – CQPCSPEC (konsensus ardıcılıq ·HK· ·HIM· ·) HER2 ECD-də 192-199, 331-338, 560-567 və 623-631-ci qalıqlarda təkrarlanır;

Motif – NNTJVKY (konsensus ardıcılıq HQSIN·SK) EGFR ECD-də 472-480 və 603-611-ci qalıqlarda təkrarlanır (bir təkrar hüceyrədaxili domendə, 893-cü qalıqda);

Motif – KDIFGSGG (konsensus ardıcılıq ·KV·GKLG) HER2 ECD-də 170-177 və 368-375-ci qalıqlarda təkrarlanır (bir təkrar hüceyrədaxili domendə 1182-ci qalıqda);

Motif – FLKTVREVAGYLLIQ (konsensus ardıcılıq IS·MIQDPQRFVV·A) EGFR ECD-də 78-93 və 394-411 qalıqlarda təkrarlanır (bir təkrar hüceyrədaxili domendə, 968-ci qalıqda);

Motif – GYVYIAAW (konsensus ardıcılıq ·TLLKGHN) HER2 ECD-də 82-89 və 468-415-ci qalıqlarda təkrarlanır (bir təkrar hüceyrədaxili domendə 732-ci qalıqda);

Motif – ENLEIIRG (konsensus ardıcılıq ·AQYL· V·) EGFR ECD-də 102-110 və 421-429-cu qalıqlarda təkrarlanır (bir təkrar hüceyrədaxili domendə, 1193-ci qalıqda);

Motif – FDGDPPEGAAP (konsensus ardıcılıq W·Q·LGMNG·K) HER2 ECD-də 381-391-ci qalıqlarda yerləşir (iki təkrar hüceyrədaxili domendə 1086 və 1223-cü qalıqlarda);

Motif – CGADEYLI (konsensus ardıcılıq VGI·S· LM) EGFR ECD-də 311-319-cu qalıqlarda yerləşir (iki təkrar hüceyrədaxili domendə, 939 və 1011-ci qalıqlarda);

Motif – VPYGVAJEHLREN (konsensus ardıcılıq MKIPLGLEVV· · VT) HER2 ECD-də 341-355-ci qalıqlarda yerləşir (iki təkrar hüceyrədaxili domendə 746 və 801-ci qalıqlarda);

Motif – QKLFNNVCV (konsensus ardıcılıq IRLKWK · T) EGFR ECD-də 52-60 və 356-364-cü qalıqlarda təkrarlanır (bir təkrar hüceyrədaxili domendə, 812-ci qalıqda);

Motif – ACHEQCAR (konsensus ardıcılıq C·AGL· · A) HER2 ECD-də 219-227, 235-243 və 510-517-ci qalıqlarda təkrarlanır.

ScanProsite verilənlər bazasında aparılan kompüter analizləri bu reseptor zülallarının, xüsusilə də HER2-nin ECD rayonunda digər, qeyri siqnal zülallarında rast gəlinən konservativ qalıqları aşkar etdi (şəkil 3).

Məsələn, HER2-də 439-GAYSLTLQGLGIS-451 və 600-CPSGVKPDLSYMPI-664 alfa-tubulində, 79-EVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIV-103 qalıqları anantransferazada, 125-NTTPVTGASPGGLRELQ-141

fmoksigenazada rast gəlinən qalıqlardır. Bu zülallar heç də siqnal zülallarına aid edilmir, amma HER2 (və EGFR) kimi reseptor zülalları ilə bəzi konservativ qalıqları bölüşürlər.

Baxmayaraq ki, süd vəzi xərçəngi və ağciyər xərçəngi zamanı istifadə edilən əksər kimya terapiya agentləri xüsusilə I və IV ECD rayonlarına spesifik olur, onun bu rayonlarından 140-600 amin turşuları ardıcılığında olan ECD hissəsi daha çox mutasiyalara məruz qalır. Bu səbəbdən HER2 spesifik süd

vəzi və ağ ciyər karsinomalarına qarşı kimya terapiya zamanı və hədəfli müalicə zamanı HER2-nin II domeninin konservativ qalıqlarından (və motiflərdən) epitop kimi istifadə edərək dizayn və sintez olunmuş insanınkıləşdırılmış monoklonal anticismlərin yaradılması tələb olunan mühüm istiqamətdir.

NƏTİCƏ

Yekun olaraq, EGFR və HER2 ECD zülallarının təkamülə qorunb saxlanılmış motivlərinin analizi artıq mövcud olan insanınkıləşdırılmış monoklonal anticismlərə (trastuzumab və pertuzumab kimi) alternativ olan daha mükəmməl anticismlər üçün epitopları ortaya qoyur. Bu tədqiqatlar, xüsusilə də, HER2 ECD zülalının təkamülə qorunub saxlanılmış motivlərinin gələcəkdə süd vəzi və ağ ciyər karsinomalarının potensial dərman hədəfi ola bilən rayonlarını (epitopları/hədəfləri) təsdiqləyir. Biz həmçinin bu araşdırma ilə epitop əsaslı vaksinlərin və dərmanların dizaynına töhfə verə biləcək zülallarda potensial epitopları və ya əsas hədəf sahələrini proqnozlaşdırmaq və ya axtarmaq üçün yeni proseduru təqdim edirik.

İSTİNADLAR

- [1] N. Ishiyama, M. O'Connor, A. Salomatov, D. Romashko, S. Thakur, A. Montes, J.F. Hopkins, G.M. Frampton, L.A. Albacker, A. Kohlmann, C. Roberts, E. Buck. Computational and Functional Analyses of HER2 Mutations Reveal Allosteric Activation Mechanisms and Altered Pharmacologic Effects. *Cancer Research | Computational Cancer Biology and Technology*, 2023, 83(9), 1531-1542, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-0940
- [2] Hudziak, R. M., Schlessinger, J., Ullrich, A. Increased expression of the putative growth factor receptor p185HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 7159–7163.
- [3] Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127–137 (2001).
- [4] 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).
- [5] Peckys, D. B., Korf, U., de Jonge, N. Local variations of HER2 dimerization in breast cancer cells discovered by correlative fluorescence and liquid electron microscopy. *Sci. Adv.* 1, e1500165 (2015).
- [6] Yarden, Y. and Pines, G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat. Rev. Cancer* 12, 553–563 (2012).
- [7] Bai X, Sun P, Wang X, Long C, Liao S, Dang S, Zhuang S, Du, Zhang X, Li N, He K, Zhang Z. Structure and dynamics of the EGFR/HER2

- heterodimer. *Cell Discovery*, 2023, 9:18, doi: <https://doi.org/10.1038/s41421-023-00523-5>
- [8] Latta EK, Tjan S, Parkes RK, O'Malley FP. The role of HER2/neu overexpression/amplification in the progression of ductal carcinoma in situ to invasive carcinoma of the breast. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 2002, 15: 1318–1325.
- [9] Carlsson J, Nordgren H, Sjöström J, Wester K, Villman K, et al. HER2 expression in breast cancer primary tumours and corresponding metastases. Original data and literature review. *British journal of cancer*, 2004, 90: 2344–2348.
- [10] Riudavets M, Sullivan I, Abdayem P, Planchard D. Targeting HER2 in non-small-cell lung cancer (NSCLC): a glimpse of hope? An updated review on therapeutic strategies in NSCLC harbouring HER2 alterations. *European Society for Medical Oncology*, 2021, V. 6 (5), doi: <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2021.100260>
- [11] Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 4285–4289.
- [12] Harbeck N, Beckmann MW, Rody A, Schneeweiss A, Müller V, et al. HER2 Dimerization Inhibitor Pertuzumab - Mode of Action and Clinical Data in Breast Cancer. *Breast Care (Basel)*, 2013, 8: 49–55.
- [13] Franklin MC, Carey KD, Vajdos FF, Leahy DJ, de Vos AM, et al. Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer cell*, 2004, 5: 317–328
- [14] Cappuzzo F, Liguori C, Toschi L, et al. EGFR and HER2 gene copy number and response to first-line chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Thorac Oncol.* 2007, 2(5):423-429.
- [15] Kuyama S, Hotta K, Tabata M, et al. Impact of HER2 gene and protein status on the treatment outcome of cisplatin-based chemoradiotherapy for locally advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2008, 3(5):477-482.
- [16] Graziano SL, Tatum A, Herndon JE, et al. Use of neuroendocrine markers, p53, and HER2 to predict response to chemotherapy in patients with stage III non-small cell lung cancer: a Cancer and Leukemia Group B study. *Lung Cancer*. 2001, 33(2-3):115-123.
- [17] Garrett JT. and Arteaga CL. Resistance to HER2-directed antibodies and tyrosine kinase inhibitors: mechanisms and clinical implications. *Cancer Biol Ther*, 2011, 11: 793–800.
- [18] Gershoni JM, Roitburd-Berman A, Siman-Tov DD, Tamovitski Freund N, Weiss Y. Epitope mapping: the first step in developing epitope-based vaccines. *BioDrugs*, 2007, 21: 145–156.
- [19] Clementi N, Mancini N, Castelli M, Clementi M, Burioni R. Characterization of epitopes recognized by monoclonal antibodies: experimental approaches supported by freely accessible bioinformatic tools. *Drug Discov Today*, 2013, 18: 464–471.
- [20] Dawson JP, Berger MB, Lin CC, Schlessinger J, Lemmon MA, and Ferguson KM. Epidermal Growth Factor Receptor Dimerization and Activation Require Ligand-Induced Conformational Changes in the Dimer Interface/ *Mol. Cell. Biol.*, 2005, v. 25, No. 17p. 7734–7742