



受体酪氨酸激酶ErbB2靶向治疗策略和内吞降解调控的研究进展

张迎秋, 刘书言, 刘晗*

大连医科大学肿瘤干细胞研究院, 大连 116044

* 联系人, E-mail: liuhan@dmu.edu.cn

收稿日期: 2021-10-15; 接受日期: 2021-11-02; 网络版发表日期: 2021-12-13

国家自然科学基金(批准号: 82073315)资助

摘要 受体酪氨酸激酶ErbB2/HER2是人类表皮生长因子受体家族成员之一, 在乳腺癌、胃癌、卵巢癌等多种肿瘤中过表达并与患者不良预后密切相关. 过表达的ErbB2受体通过与家族成员形成同源或异源二聚体发挥激酶活性, 激活下游信号转导通路, 进而促进肿瘤细胞的生长和增殖. ErbB2已经成为肿瘤治疗的重要靶标, 目前临床应用的靶向ErbB2的治疗方案主要包括单克隆抗体、抗体偶联药物、小分子酪氨酸激酶抑制剂等, 但是原发或继发耐药现象时常发生并危及患者生命. 研究表明, 通过诱导ErbB2的泛素化和内吞降解, 可以显著降低细胞表面ErbB2蛋白水平并有靶向治疗的效果. 该策略新颖, 因此有助于开发出新型ErbB2靶向治疗方案. 本文通过介绍受体酪氨酸激酶ErbB2及其当前靶向治疗策略的原理和代表性药物, 结合最新科研进展着重探讨ErbB2的内吞降解调控机制, 并评述该新颖策略的潜在应用价值, 希望为新型ErbB2靶向治疗方案开发提供思路和理论基础.

关键词 受体酪氨酸激酶, ErbB2, HER2, 泛素化, 内吞降解, 靶向治疗

1 受体酪氨酸激酶与肿瘤

1.1 受体酪氨酸激酶

受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinases, RTKs)是酪氨酸激酶家族的一类, 迄今在人类中发现的RTKs有58种^[1]. RTKs通常定位于细胞膜上且具有相似的结构, 主要包括3个结构域: (i) 胞外配体结合域, 主要负责与配体结合和接收外部信号; (ii) 酪氨酸激酶结构域, 主要负责调整生物信号反应和向胞内传输信号; (iii) 跨膜结构域, 通过单次跨膜方式连接胞内和胞外

区域^[2,3]. RTKs可进一步划分为20个亚种类, 具体包括: 表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)家族, 胰岛素受体(insulin receptor, INSR)家族, 血小板衍生生长因子受体(platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)家族, 血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)家族, 成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)家族, 缩胆囊素受体(protein tyrosine kinase 7/colon carcinoma kinase 4, PTK7/CCK4)家族, 神经生长因子受体家族, 受体酪氨酸激酶样孤儿受体

引用格式: 张迎秋, 刘书言, 刘晗. 受体酪氨酸激酶ErbB2靶向治疗策略和内吞降解调控的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2021, 51: 1668–1680
Zhang Y Q, Liu S Y, Liu H. Advances in understanding the therapeutic targeting of ErbB2 by regulating endocytic degradation (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2021, 51: 1668–1680, doi: 10.1360/SSV-2021-0410

(receptor tyrosine kinase-like orphan receptor, Ror)家族, 肌肉特异性受体酪氨酸激酶(muscle-specific tyrosine kinase, MuSK), 肝细胞生长因子受体(Met)家族, Axl, Tie, EphA/B, Ret, Ryk, DDR1/2, Ros, LMR, ALK, SuRTK106/STYK1^[4]. 人类EGFR酪氨酸激酶家族又称ErbB家族, 包括EGFR(ErbB1/HER1), ErbB2(neu/HER2), ErbB3(HER3)和ErbB4(HER4)^[5].

RTKs介导细胞间交流通讯并调控多种复杂的生物学功能, 包括细胞生长、运动、分化和代谢等^[6]. RTKs信号通路调节异常与多种人类疾病有关, 尤其是肿瘤. 正常生理条件下, RTKs在复杂的调控机制下处于平衡状态, RTKs的异常持续性活化会激活下游级联反应并赋予正常细胞致癌特性^[7]. 人类肿瘤中导致RTKs组成性激活的原因主要包括4种: 功能获得性突变、基因扩增、染色体重排和自分泌激活^[4]. 大量证据表明, EGFR在包括肺癌在内的多种肿瘤中发生突变, 通过异常提高激酶活性促进肿瘤发生和发展^[8]. 肺癌细胞中19号外显子缺失的EGFR致癌突变体可以通过发动蛋白依赖和非依赖的方式发生内吞降解^[9], 并且发动蛋白的抑制剂dysfemore能显著引起19号外显子缺失的EGFR突变体发生泛素化, 进而抑制细胞迁移和增殖^[10]. 多种肿瘤中都存在RTKs过表达的现象, 例如胶质瘤、肺癌、食管癌和甲状腺癌中存在EGFR过表达; 肺癌、膀胱癌、乳腺癌和胃癌中存在ErbB2过表达; 胃癌和肺癌中存在MET过表达. 肿瘤中基因扩增是RTKs过表达的主要机制, 并且研究发现, RTKs过表达与多种肿瘤的不良预后紧密相关^[7,11]. 另外, 多种肿瘤相关融合基因涉及RTKs, 例如, 在白血病患者中发现BCR-ABL融合癌蛋白^[12,13], 大约50%的间变性大细胞淋巴瘤中存在NPM-ALK融合癌蛋白^[14]. 再如, 包括TGF α -EGFR等RTKs自分泌通路的过度激活, 也可以作为有效的治疗靶标^[15]. Folkman^[16]通过“肿瘤的生长和转移均依赖于新生血管的形成”观点提出大多数新生血管丰富的实体瘤都会过表达VEGF和其受体VEGFR, 目前已有多种靶向VEGF/VEGFR通路的抑制剂应用于临床肿瘤的治疗^[17].

1.2 表皮生长因子受体家族与肿瘤

对生长因子的研究最早开始于1952年, Rita Levi-Montalcini发现, 鼠肉瘤细胞移植到鸡胚胎神经系统会加速神经纤维的生长. 5年后, 她与Stanley Cohen合作

从鼠肿瘤中分离出NGF^[18], 1972年Cohen又分离出EGF^[19], 1982年Cohen等人从正常的鼠肝细胞中分离鉴定了EGFR的功能^[20]. 基于在生长因子领域做出的杰出贡献, Rita Levi-Montalcini和Stanley Cohen获得了1986年诺贝尔生理学或医学奖.

配体和ErbB受体结合导致受体形成同源或异源二聚体进而发生自磷酸化和激酶活性激活, 从而激活下游多种信号转导因子, 包括MAPK、PI3K、磷脂酶C、STATs等^[21]. 每个受体有相应的配体与之结合, 目前为止只有ErbB2的配体尚未被发现. 但ErbB2能与其他被配体激活的ErbB家族受体结合形成异源二聚体, 在ErbB2过表达的情况下不需要配体激活, 可以直接形成同源或异源二聚体而激活下游信号通路. 另外, ErbB3虽然不具有激酶活性, 但是能结合神经调节蛋白家族成员, 继而与ErbB家族其他受体结合形成异源二聚体来激活下游信号通路^[22]. 重要的是ErbB2与ErbB3可以有效地结合在一起, 并且在所有ErbB家族受体组合类型中展示出最强信号转导功能^[23].

1984年, 分别在脑肿瘤和鳞状细胞肺癌中发现EGFR的过表达^[24,25], 揭示了EGFR与肿瘤的关系. 早在1987年, Slamon等人^[26]发现, 在189例原发性乳腺癌患者中有30%患者存在2~20倍的*ErbB2*扩增, 分析后发现*ErbB2*的扩增变化是乳腺癌患者的总体生存期和复发时间判断的一个重要预测因素. ErbB家族受体的致癌作用是通过病毒学研究发现的, 病毒携带的致癌基因*V-erbB*和*neu*编码发生突变的EGFR和ErbB2受体^[27]. 至今已有很多关于ErbB家族与肿瘤发生发展相关的机制研究, 并以此为基础研发相关抗肿瘤药物, 如西妥昔单抗、帕尼单抗、来那替尼、曲妥珠单抗等^[28]. 我国靶向非小细胞肺癌EGFR的药物研发也取得了显著成就, 上市的第三代EGFR激酶抑制剂有阿美替尼和伏美替尼, 在临床研究阶段的药物包括FHND9041和艾维替尼等^[29].

1.3 ErbB2与肿瘤

*ErbB2*位于染色体17q12, 编码一个分子量为185 kD的具有酪氨酸激酶活性的跨膜蛋白. ErbB2是ErbB家族的一员, ErbB2最初在大鼠神经母细胞瘤中被发现, 跨膜区的点突变可以使其具有致癌活性^[30,31]. 所有的ErbB家族受体都由N端胞外区、跨膜区和C端胞内区组成. 胞外区由I~IV部分组成: I和III为配体结

合域; II 是二聚体臂; IV 靠近细胞膜外侧。EGFR/ErbB3/ErbB4 的 IV 与 II 区域相互作用使二聚体臂埋藏起来, 抑制二聚体形成。但是 ErbB2 的 IV 与 II 区域不发生相互作用, 一直是开放构型, 二聚体臂暴露在外面, 这可能是尚无配体的 ErbB2 作为首选家族成员形成二聚体的主要原因。ErbB 蛋白通常依靠配体结合使胞外区开放和二聚体臂暴露, 从而形成二聚体^[22,32,33]。受体胞内区包括近膜区、激酶区和 C 端调节区。激酶区又分为 N 和 C 端叶, 形成二聚体时一个受体的 N 端叶和另一个受体的 C 端叶相互作用^[34]。ErbB2 形成同源或异源二聚体后, 激活激酶活性进行自磷酸化, 进而修饰 C 端的磷酸化位点。其中 ErbB 家族受体都有多个酪氨酸位点可以被磷酸化, 并且发生修饰的磷酸化位点同样可以被多个胞内信号分子识别, 继而将信号递送到下游信号通路, 其中包括两条经典通路: ErbB 家族受体可以通过自身的磷酸化位点招募 Shc 蛋白和 Grb2 蛋白来激活 RAS-RAF-MEK-ERK 通路, 通过 ELK1, MYC, JUN/FOS 等转录因子传递信号到细胞核内, 调控细胞的增殖、分化和迁移; ErbB3 含有多个 PI3K 调节组分 p85 的结合位点, 因此包含 ErbB3 的异源二聚体针对 PI3K 通路的激活效率最高, 进而活化下游重要信号转导分子 AKT 从而扩增信号转导, 具体包括激活 mTOR 等下游通路, 促进细胞生长, 以及引起其下游 BAD 蛋白和转录因子 FKHR1 的磷酸化, 从而抑制细胞凋亡等^[28]。

ErbB2 在乳腺癌和多种恶性肿瘤中高表达, 并且与不良预后显著相关^[35]。20%~30% 的乳腺癌中发生 *ErbB2* 基因扩增或者 ErbB2 蛋白过表达。临床实践证明, 靶向 ErbB2 是治疗 ErbB2 阳性乳腺癌的一个有效策略^[36]。1998 年美国食品药品监督管理局 (U.S. Food and Drug Administration, FDA) 批准曲妥珠单抗 (赫赛汀, trastuzumab) 应用于 ErbB2 阳性的乳腺癌治疗, 改变了 ErbB2 阳性乳腺癌的治疗历史^[37]。截至目前的研究成果充分证实了曲妥珠单抗和帕妥珠单抗 (pertuzumab) 等 ErbB2 靶向性药物的疗效, 显著提升了 ErbB2 阳性乳腺癌患者的生存时间, 但研究相继发现, 相应耐药现象的发生为 ErbB2 靶向治疗提出新的挑战^[38]。除了 20%~30% 的乳腺癌发生野生型 ErbB2 过表达, 研究发现大概 2% 的乳腺癌患者携带 *ErbB2* 突变^[39]。ErbB2 突变可以发生在胞外结构域、C 端胞内区域, 其中更多出现在激酶结构域^[39]。泛癌种的数据库分析显示, *ErbB2* 突

变在膀胱癌、乳腺癌、子宫颈癌等多达 15 个癌种中都可以被检测, 表明 *ErbB2* 突变同样可以作为一个潜在的肿瘤生物标志物^[40]。

2 ErbB2 靶向治疗研究策略

从 1985 年 Drebin 等人^[41]报道发现单克隆抗体能下调 ErbB2 表达并逆转表型转化开始, ErbB2 的单抗靶向治疗开发经历了漫长的研究过程。1996 年, Baselga 等人^[42]报道的临床试验数据证明, 曲妥珠单抗能用于治疗 ErbB2 过表达的转移性乳腺癌。近年来, Denkert 等人^[43]提出通过标准化 IHC 分析结果可以将 ErbB2 弱阳性的肿瘤作为乳腺癌的一个亚组, 与 ErbB2 表达为零的肿瘤区分开, ErbB2 弱阳性的肿瘤具有特定的生物学特性。ErbB2 抗体-药物偶联物 (如 trastuzumab derux-tecan 和 trastuzumab duocarmazine) 的开发为包括 ErbB2 低表达在内的乳腺癌患者提供了新的治疗选择。目前已经有多种 ErbB2 靶向性策略处于临床应用或临床前研究阶段, 具体包括: (i) 单克隆抗体; (ii) 抗体-药物偶联物 (antibody-drug conjugates, ADC); (iii) 小分子酪氨酸激酶抑制; (iv) 热休克蛋白 HSP90 抑制剂 (促 ErbB2 泛素化及内吞降解); (v) 脱落酶抑制剂等。本文先行介绍这五种 ErbB2 靶向性治疗策略, 之后着重评述 ErbB2 泛素化以及继发的受体内吞和溶酶体降解途径的相关科研进展。

2.1 单克隆抗体

曲妥珠单抗是由 Genetech 公司研发 (后被罗氏收购), 于 1998 年 9 月美国 FDA 批准上市, 中国 2002 年 9 月上市。曲妥珠单抗是一种重组人源化靶向 ErbB2 单克隆抗体, 能增强抗体依赖性的细胞毒性, 抑制 ErbB2 活性和下游信号转导, 引发细胞死亡。另外, 曲妥珠单抗与 ErbB2 胞外区域 IV 表位结合, 区域 IV 接近 ErbB2 的胞外切割位点, 所以曲妥珠单抗也可能使 ErbB2 脱离细胞膜表面, 经由金属蛋白酶作用使胞外区脱落。曲妥珠单抗的结合可导致 ErbB2 信号复合物的分解, 阻滞 ErbB2 介导的细胞增殖、浸润性生长、血管生成、DNA 修复和抗凋亡等下游信号通路, 使肿瘤细胞对放化疗等常规治疗手段敏感^[21]。但是多数 ErbB2 高表达的乳腺癌患者接受单一曲妥珠单抗治疗一年内, 治疗效果会减退并出现耐药现象。曲妥珠单抗结合表位缺

失和ErbB2下游信号通路解偶联都会导致ErbB2耐药^[44]。与其他常规治疗方法联合能增强曲妥珠单抗的治疗效果,例如,抗血管生成药物或第二代靶向ErbB2单抗帕妥珠单抗。帕妥珠单抗经由罗氏公司研发,2012年6月美国FDA批准上市,中国于2018年12月上市。帕妥珠单抗同样是人源化靶向ErbB2单克隆抗体,不同的是它结合在ErbB2胞外区域II表位,阻止ErbB2与其他ErbB家族受体结合,并且能招募免疫细胞杀伤肿瘤。在曲妥珠单抗治疗效果不好的ErbB2,帕妥珠单抗的治疗效果并不突出,但是二者联合能明显增强临床治疗效果^[45]。

2.2 抗体-药物偶联物

抗体偶联药物由人源化或人的单克隆抗体和细胞毒性小分子通过一个合适的化学连接体组成。ADC识别细胞表面抗原内吞进入细胞内,复合物通过溶酶体分解释放出活性的细胞毒物,细胞毒物结合靶位点导致细胞死亡^[46]。ADC的内吞和溶酶体分解在其发挥功能过程中起到至关重要的作用。

T-DM1由罗氏公司研发,2013年2月美国FDA批准上市,2020年1月在中国上市。T-DM1是代表性ADC,通过不可断裂的硫醚连接物将曲妥珠单抗和小分子微管抑制剂DM1(美登素maytansine衍生物)共价偶联而成。ErbB2-T-DM1复合物通过受体介导的细胞内吞进入细胞后,溶酶体水解抗体部分释放DM1,DM1代谢物抑制微管组装导致细胞死亡^[47]。DS-8201是阿斯利康和第一三共公司共同研发,2019年12月FDA批准上市,中国目前未上市。DS-8201是继T-DM1后的新一代ADC类药物,由曲妥珠单抗通过酶促剪切的四肽接头连接一种新型的拓扑异构酶I抑制剂(Dxd,伊立替康衍生物)。I期临床试验表明,DS-8201在既往接受过抗体治疗和其他常规靶向ErbB2治疗策略的乳腺癌患者中具有很好的治疗效果^[48]。与T-DM1相比,DS-8201有更高的药物-抗体比率,具有稳定并特异性切割的连接分子。DS-8201能运输更多的药物到细胞内,Dxd具有很高的细胞毒性。得益于DS-8201的高渗透率,释放到细胞内的Dxd不仅作用于靶细胞还作用于周围的细胞,因此DS-8201对不同种类的肿瘤表现出很好的治疗效果。并且Dxd的半衰期很短,能减少毒副作用的产生^[49]。SYD985(trastuzumab duocarmazine)是荷兰Synthon公司研发,在美国和中国都还未获批上市。

SYD985通过可剪切的肽基将曲妥珠单抗和杜卡霉素类似物偶联起来,药物进入细胞后与DNA结合发生不可逆烷基化,破坏核酸结构进而导致细胞死亡^[50]。SYD985在经过包括T-DM1治疗后的ErbB2表达转移性乳腺癌患者中已经取得了很好的临床试验效果,针对ErbB2低表达乳腺癌和其他癌种的临床试验都在进行中^[51]。

2.3 小分子酪氨酸激酶抑制

拉帕替尼(lapatinib)由葛兰素史克公司研发,2007年3月美国FDA批准上市,中国于2013年1月上市。拉帕替尼是针对EGFR和ErbB2的酪氨酸激酶抑制剂,结合在激酶结构域的核苷酸结合处,是阻断EGFR/ErbB2催化活性的高特异性、可逆的抑制剂。体外和动物实验证明,拉帕替尼能抑制ErbB2的完整形式和不能被曲妥珠单抗识别的截短的胞内形式(p95-ErbB2)^[52]。另外,拉帕替尼可通过抑制IGF-1信号转导诱导曲妥珠单抗耐药的乳腺癌细胞发生凋亡^[53],还可阻断NRG引起的p95-ErbB2/ErbB3异二聚体的形成^[54]。多种拉帕替尼耐药机制已经被报道,包括ErbB2继发性突变,补偿性信号通路的异常激活,雌激素受体活性增强,Ras激活引起的MEK活化等^[21]。来那替尼(neratinib)由Puma公司研发,2017年7月美国FDA批准上市,中国于2020年4月上市。来那替尼是不可逆的泛ErbB1/2/4受体酪氨酸激酶抑制剂,其通过与ATP结合位点的半胱氨酸残基形成共价结合抑制受体的自磷酸化和下游信号转导,导致细胞周期阻滞和肿瘤生长抑制^[55,56]。妥卡替尼(tucatinib)由西雅图遗传学公司研发,2020年4月美国FDA批准上市,并已经在中国上市。妥卡替尼可逆地结合于ErbB2的ATP结构域并抑制下游的MAPK和PI3K/AKT通路^[57]。阿法替尼(afatinib)由勃林格殷格翰公司研发,2013年7月美国FDA批准上市,中国于2017年2月批准。阿法替尼是第二代EGFR靶向药,以不可逆的方式共价结合ErbB受体家族成员并抑制受体的激酶活性^[58]。达克替尼(dacomitinib)由辉瑞公司研发,2018年9月美国FDA批准上市,中国于2019年5月上市。达克替尼是唑啉类不可逆的泛ErbB受体家族酪氨酸激酶抑制剂^[59]。

2.4 热休克蛋白HSP90抑制剂

1996年,Neckers团队^[60]报道了HSP90抑制剂格

尔德霉素可以有效的促进ErbB2泛素化和降解,从而开启了通过抑制热休克蛋白HSP90来靶向ErbB2的一系列研究. 因为认识到格尔德霉素的毒副作用,一系列衍生物或新型HSP90抑制剂被研发并进行了多项研究. 代表性的HSP90抑制剂包括格尔德霉素类似物17-AAG,也称为坦螺旋霉素(tanespimycin),是一种高效的HSP90抑制剂并可以促进ErbB2的泛素化修饰和降解. 有报道称,肿瘤中HSP90与17-AAG的结合率比在正常细胞中高100倍^[61]. 前列腺癌中17-AAG能引起ErbB2、AKT、野生型和突变型激素受体降解^[62]. ErbB2过表达的乳腺癌细胞中,曲妥珠单抗和17-AAG都被报道促进ErbB2的溶酶体降解,曲妥珠单抗和17-AAG联合用药引起不同泛素E3连接酶(Cbl和CHIP)的协同效应,从而增加ErbB2泛素化和溶酶体途径降解,有效切断细胞增殖和生存的信号^[63]. IPI-504,又称瑞他霉素(retaspimycin hydrochloride),是一种水溶性的HSP90抑制剂,对多种实体和血液肿瘤具有抑制作用. IPI-504在ErbB2阳性的乳腺癌细胞中能明显下调ErbB2水平,抑制细胞生长. 实验表明,在曲妥珠单抗耐受的细胞中,IPI-504能明显降低总的ErbB2和AKT以及pAKT等关键信号转导分子的表达水平^[64]. 17-DMAG,也称作阿螺旋霉素(alvespimycin),是格尔德霉素的半合成衍生物,比17-AAG展示出更好的水溶性、生物稳定性、降低新陈代谢和抗肿瘤能力^[65].

2.5 脱落酶抑制剂

ErbB家族受体会被去整合素金属蛋白酶(a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein, ADAM)家族锌依赖的金属蛋白酶切割,该过程被称为胞外域脱落,对ErbB受体生物学功能至关重要. 并且ADAM家族金属蛋白酶参与调控ErbB相关配体的形成过程,研究表明,提高ErbB配体水平会影响ErbB靶向治疗的效果. Fridman等人^[66]发现,INCB3619可以作为ADAM10/17的抑制剂,阻断ErbB脱落. 第二代脱落酶抑制剂INCB7839比INCB3619具有更好的药代动力学效果,体内移植瘤实验证明,INCB7839联合拉帕替尼能明显抑制ErbB2阳性乳腺癌细胞的生长^[67]. 研究表明,脱落酶抑制剂联合拉帕替尼或曲妥珠单抗具有协同抗肿瘤效应,可以作为潜在的ErbB2靶向治疗策略.

3 ErbB2内吞降解的调控机制

3.1 受体酪氨酸激酶的内吞调控

细胞膜受体的内吞和跨膜转运对受体酪氨酸激酶的表达和活性调控具有重要作用. 配体与受体酪氨酸激酶的胞外段结合常引起受体及配体的快速内吞和降解,从而降低通过细胞表面产生的信号. 细胞膜受体介导的内吞通常可以分为3个阶段^[68]: (i) 膜受体与特异配体结合; (ii) 激发细胞内部信号,细胞膜表面结构的识别和质膜凹陷形成内吞泡,这一阶段一般对温度敏感且需要能量代谢; (iii) 内吞囊泡在细胞内的运输以及所运载货物的分选,根据细胞调控决定所运载物的去向,包括投递到溶酶体进行降解. 泛素连接酶Cbl蛋白在EGF受体及PDGF受体降解过程中起到重要的作用. Cbl含有SH2结构域,可以与活化的受体结合,它还具有泛素连接酶活性的指状结构,介导受体的泛素化降解^[69]. EGFR受体内吞不但动态调控受体酪氨酸激酶的细胞膜表达水平,并且通过调节EGFR的细胞内定位影响其信号输出特征. 因此,受体酪氨酸激酶的内吞降解调控在肿瘤发生发展中发挥着非常重要的作用,内吞调控异常也被认为是一类重要致癌因素并具备潜在干预和靶向治疗潜力.

3.2 ErbB2内吞特征

由于未鉴定到特异的配体与ErbB2结合,早期的ErbB2内吞研究利用EGFR胞外区和ErbB2胞内区嵌合体,标记EGF来追踪这些嵌合体的内吞情况. 与野生型EGFR相比,嵌合体的内吞速率显著降低,同时导致降解速率下降. ErbB2羧基端替换EGFR的相应区域引起相似的受体内吞效率降低, ErbB2酪氨酸激酶区域替换EGFR的相应区域没有影响受体的内吞和下调,说明EGF刺激能引起嵌合体的内吞,但ErbB2不具备快速内吞的信号,或者带有抑制快速内吞的信号^[70]. Wang等人^[71]在4种不同的乳腺癌细胞中发现,EGF刺激引起的ErbB2或EGFR-ErbB2异源二聚体内吞受损, ErbB2的胞外区和EGFR胞内区嵌合体显微注射到BT20细胞后,EGF刺激能引起正常的受体内吞,说明ErbB2的内吞缺陷是由胞内区造成的. Shen等人^[72]研究发现, ErbB2内吞抑制依赖于F1030和L1075之间的区域,并且c-Cbl催化的单泛素化不参与受体介导的ErbB2内吞. 另外有观点认为, ErbB2内吞受损不依赖

于脂筏和肌动蛋白细胞骨架, ErbB2定位在细胞膜凸起上, 对网格蛋白包被小泡缺乏亲和力^[73]. ErbB2锚定ErbB2相互作用蛋白(ErbB)等含有PDZ(PSD95/DLG/ZO-1)结构域蛋白不能完全解释ErbB2内吞受损, EGFR-ErbB2异源二聚体在细胞质膜上的滞留与ErbB2对EGF诱导的网格蛋白包被小泡形成的抑制作用有关^[74]. 目前研究表明, 多种机制参与ErbB2内吞缺陷的调控, 主要原因可能包括ErbB2在细胞膜上的滞留, 缺少参与网格蛋白包被小泡形成的内吞信号, ErbB2抑制网格蛋白包被小泡形成, ErbB2从早期内体到细胞膜的高效回收等^[75]. 因此, 对ErbB2内吞调控的进一步深入研究能继续拓宽人们对ErbB2的生物学特征的理解并据此设计新型的靶向性治疗方案.

3.3 HSP90抑制剂对ErbB2内吞的调控

如上文所述, 从Neckers等人报道HSP90抑制剂对包括ErbB2在内的多种重要肿瘤相关蛋白稳定性的调控开始, 相关研究领域受到逐步关注, 研究人员深入探索了HSP90抑制剂的具体机制. Tikhomirov和Carpenter^[76]报道在HSP90抑制剂格尔德霉素诱导的ErbB2降解过程中ErbB2激酶区是必需的, 并且至少在激酶区发生一次切割, 成为135 kD和23 kD两个片段, 同时观察到在细胞内形成ErbB2囊泡. Lerdrup等人^[77]发现, 格尔德霉素处理使细胞内游离的ErbB2增多并促进ErbB2的质膜重分配, 诱导ErbB2发生内吞. 进一步研究发现, 全长的ErbB2以蛋白酶体依赖的方式通过溶酶体进行降解. 2007年, Lerdrup等人^[78]又报道, 格尔德霉素使ErbB2的羧基端发生切割, 羧基端断裂后通过内体-溶酶体途径降解. 此外, Pedersen等人^[79]报道, 乳腺癌SKBR3细胞中格尔德霉素诱导细胞膜ErbB2的内吞降解依赖于网格蛋白, 而不依赖于蛋白酶体的活性, 但蛋白酶体抑制剂又会延缓ErbB2降解, 指出蛋白酶体的活性对分选内化的ErbB2到溶酶体中的过程是必需的. 另外, Barr等人^[80]用氯丙嗪处理SKBR3细胞, 发现格尔德霉素诱导的ErbB2内吞是非网格蛋白依赖的. 而Cortese等人^[81]提出, 格尔德霉素不影响ErbB2内吞而是通过影响内体分选进而抑制ErbB2的循环利用. 由此可见, 一系列研究表明, HSP90抑制剂促进ErbB2降解的过程是比较复杂的, 领域内目前仍存在争议并有待进一步深入探索ErbB2内吞调控的具体机制.

3.4 动态泛素化对ErbB2内吞的调控

泛素化修饰在受体酪氨酸激酶的内吞调控中发挥重要作用. 通过K48位连接的多聚泛素链修饰通常被认为是诱导蛋白酶体降解的经典信号^[82], 而通过K63位连接的多聚泛素化修饰在膜蛋白转运和多囊体分选中充当特殊信号^[83]. 实验表明, 蛋白酶体抑制剂PS-341和HSP90抑制剂格尔德霉素可通过介导K48和K63位的多聚泛素化修饰增强而促进ErbB2降解^[84]. Vuong等人^[85]研究结果表明, ErbB2泛素嵌合体可发生K48和K63位多聚泛素化, 并以网格蛋白包被依赖的方式运输到溶酶体进行降解. 格尔德霉素引起的ErbB2降解过程中, 分子伴侣蛋白HSP70通过招募泛素E3连接酶CHIP促进ErbB2发生泛素化^[86]. 泛素E3连接酶主要组分CUL5也被报道参与调控ErbB2的多聚泛素化和继发性降解^[87].

在明确泛素化修饰在ErbB2内吞调控和降解中发挥的关键作用后, 其动态可逆过程(去泛素化)也得到了比较深入的研究. 去泛素化酶POH1做为蛋白酶体盖子的组成部分, 能调控ErbB2的泛素化水平及稳定性, 但是该功能不一定与蛋白酶体降解有关^[88]. 研究人员利用EGFR-ErbB2嵌合体研究发现, USP8参与ErbB2内体转运途径, ErbB2可做为去泛素化酶USP8的一个底物^[89]. 本课题组^[90]通过系统性筛选内体相关去泛素化酶, 发现去泛素化酶USP2参与调控ErbB2的泛素化修饰, 并通过拮抗HSP90抑制剂所诱导的泛素化修饰稳定乳腺癌细胞中ErbB2的表达水平. 抑制HSP90可以通过典型的内体溶酶体途径诱导有效的ErbB2泛素化和内吞降解. USP2能与内化的ErbB2相互作用, 发挥其去泛素化酶活性防止ErbB2的溶酶体途径降解过程. USP2抑制剂ML364能诱导ErbB2泛素化并加速其降解. ML364可增强HSP90抑制剂对ErbB2的促降解作用并提高ErbB2阳性乳腺癌细胞对抑制HSP90的敏感性. USP2与HSP90抑制剂联合可有效抑制ErbB2阳性乳腺癌移植瘤的生长. 该研究成果揭示了去泛素化酶USP2通过拮抗泛素化介导的受体内吞来维持细胞表面的ErbB2水平, 同时表明, USP2与HSP90抑制剂的联合应用可成为潜在的靶向ErbB2受体酪氨酸激酶的新颖策略, 并用于开发新型肿瘤治疗方案.

3.5 来那替尼对ErbB2内吞的调控

来那替尼是2017年于美国获批的用于治疗ErbB2

阳性乳腺癌的小分子抑制剂。对来那替尼的作用机制研究主要集中于其对ErbB家族成员蛋白激酶活性以及相应的下游信号转导通路的抑制作用。本课题组研究发现, 乳腺癌细胞中来那替尼有效增强ErbB2的泛素化修饰, 从而促进ErbB2的内吞和溶酶体降解^[91]。进一步拓展研究发现, 来那替尼也可以通过促进ErbB2内吞降解有效地抑制ErbB2阳性卵巢癌的增殖和迁移^[92]。因为ErbB2的继发突变可产生对小分子抑制剂拉帕替尼的耐药现象, 来那替尼的促降解作用有助于拮抗ErbB2突变体驱动的耐药性发生并提供临床治疗选择。

3.6 细胞膜流动性对ErbB2内吞的调控

在研究应激状态下ErbB2内吞降解调控过程中, 本课题组^[93]研究发现, 在AU565, SKBR3和HCC1954不同ErbB2阳性细胞系中, 三种不同细胞形态的细胞中ErbB2的细胞内分布与定位也不尽相同, 提示细胞膜的特征可能参与调控ErbB2的膜定位和细胞内分布。在HCC1954细胞中, ErbB2除了定位于细胞膜还在细胞内呈点状分布。通过菲律宾菌素染色发现, HCC1954细胞膜上的胆固醇含量明显低于AU565和SKBR3细胞, 油酸和菲律宾菌素处理进一步加强HCC1954细胞的迁移能力, 说明细胞膜中胆固醇的含量与ErbB2定位和细胞迁移有关。细胞膜中胆固醇含量降低导致细胞膜的刚性降低和流动性增加, 有助于ErbB2内吞发生。使用降低胆固醇药物洛伐他汀显著增强了ErbB2靶向抑制剂拉帕替尼和来那替尼对乳腺癌细胞生长的抑制作用。洛伐他汀和抑制剂联合使用通过促进ErbB2泛素化和内吞降解, 降低ErbB2的表达水平并抑制下游致癌信号转导通路。洛伐他汀和拉帕替尼联合用药有效抑制ErbB2阳性乳腺癌细胞在裸鼠体内的生长。该研究表明, ErbB2的细胞表面分布受胆固醇含量控制的膜物理性质的密切调控。因此, 可以利用降胆固醇药物与ErbB2激酶抑制剂进行潜在的组合治疗, 用于临床治疗ErbB2阳性乳腺癌。

3.7 其他因素对ErbB2内吞的调控

因为促进ErbB2内吞降解研究的潜在临床应用价值, 本领域研究得到多数学者的关注和深入探索并取得了多项进展。Bailey等人^[94]应用激酶抑制剂筛选发现蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)是ErbB2表达下

调的潜在调节因子, 活化的PKC通过促进ErbB2进入内吞循环小泡, 调控ErbB2介导肿瘤产生新的正反馈环。Dietrich等人^[95]报道, PKC活化引起ErbB2的内吞但并不诱导降解, 并且该过程不依赖于HSP90解离和网格蛋白功能。Klapper等人^[96]认为, 一些抑制肿瘤生长的抗体对ErbB2的抑制作用是通过招募c-Cbl和加强ErbB2的泛素化修饰和降解来实现的。Szymanska等人^[97]发现, 联合识别ErbB2不同表位的抗体mAb4517和mAb4384可促进ErbB2的磷酸化和泛素化, 并且以发动蛋白依赖的方式介导ErbB2的内吞和继发降解。Paris等人^[98]报道, 在ErbB2过表达的细胞中, 磷脂酰胆碱的特异性磷脂酶C(phosphatidylcholine-specific phospholipase C, PC-PLC)选择性地积聚在质膜上并在脂筏区域与ErbB2相互作用, 并且抑制PC-PLC导致ErbB2的内吞降解增强, 从而引起针对肿瘤细胞的抗增殖效应。Ma等人^[99]通过设计将抗ErbB2适配体锚定在一个四面体框架核酸上形成DNA纳米机器人(HApt-tFNA), 其能靶向ErbB2阳性乳腺癌细胞, 促使ErbB2经溶酶体发生高效降解, 进而引起细胞凋亡和细胞生长阻滞, 为通过诱导ErbB2内吞降解来靶向治疗乳腺癌提供了一个崭新的方案。

4 展望

多年的临床实践已经证实, ErbB2是肿瘤治疗的一个关键用药靶点。目前的ErbB2靶向治疗策略已经取得了显著的治疗效果, 因此激励我们继续开发新型的ErbB2靶向治疗方案。目前积累的研究成果表明, 通过促进ErbB2的内吞降解可以提供一个潜在有效的靶向治疗策略。对于受体酪氨酸激酶的内吞调控目前比较一致的观点是, 通过不同途径内化的受体酪氨酸激酶被运输到早期内体(early endosome)再进行下一步分选, 包括可以经由循环内体(recycling endosome)重新返回到细胞膜表面; 或者经过一系列内体分选复合物(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)蛋白的传递作用经过晚期内体最后运输到溶酶体中进行水解; 还有的经由多囊泡内体与细胞膜融合, 导致腔内小泡以外泌体的形式释放到胞外, 这些外泌体保留了酪氨酸激酶的腔内集合并将配体结合区域暴露在胞外环境中^[100~102]。虽然关于ErbB2内吞降解的调控机制研究已经取得了显著进展(图1), 但对该过

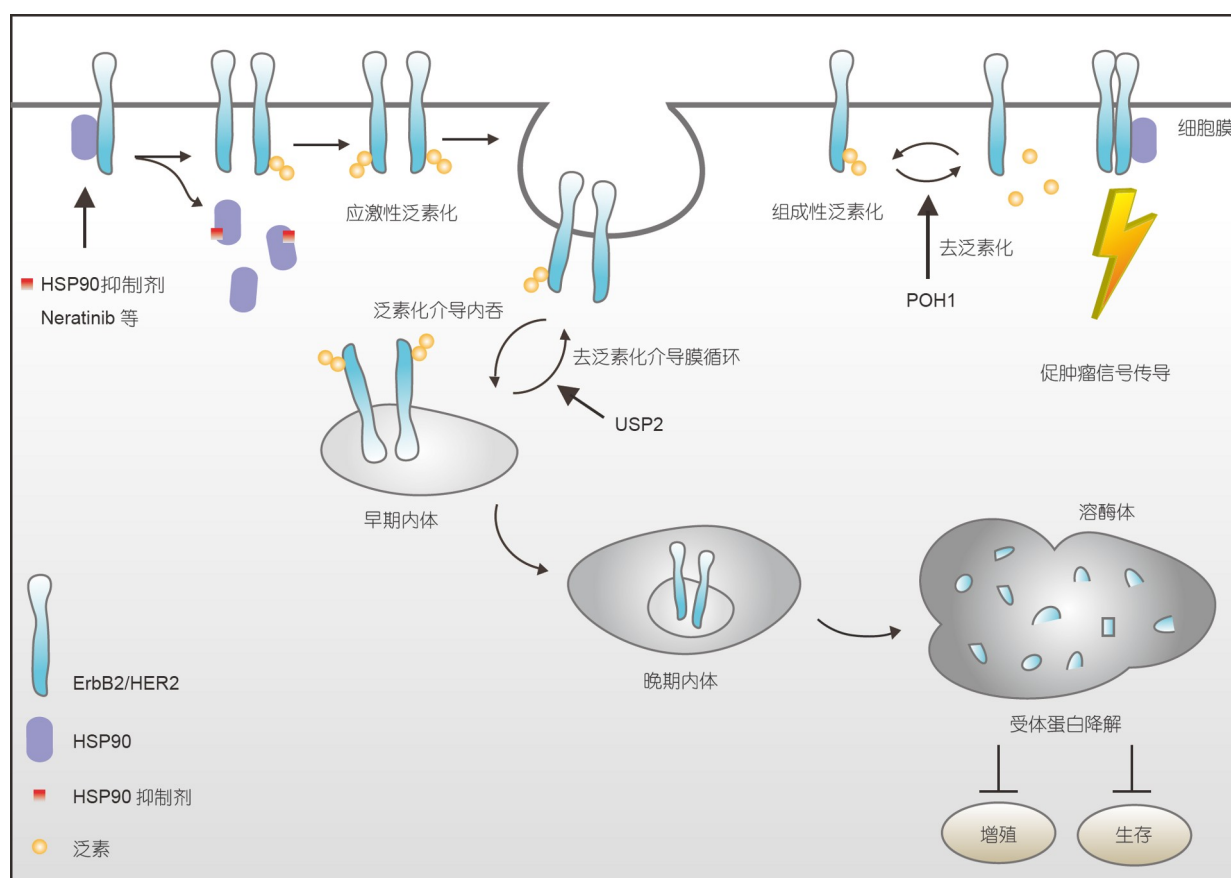


图 1 ErbB2内吞调控基本模式图。细胞中ErbB2泛素化可诱导受体内吞和内体分选，并通过促进ErbB2的溶酶体降解抑制肿瘤增殖和生存等表型。去泛素化酶可拮抗ErbB2泛素化水平来稳定其细胞膜表达。POH1主要抑制ErbB2组成性泛素化，而USP2主要抑制其应激性泛素化从而限制内吞降解

Figure 1 Working model of the endocytic regulation of ErbB2. The ubiquitination of ErbB2 induces its internalization and subsequent endocytic sorting for lysosomal degradation, which effectively represses ErbB2 signaling-driven cell proliferation and survival. Deubiquitylases antagonize the ErbB2 ubiquitylation and maintain its abundance on the cell surface. The deubiquitylase POH1 functions to suppress the constitutive ubiquitylation of ErbB2, while USP2 is capable of counteracting the stress-incurred ErbB2 ubiquitylation to inhibit its endocytic degradation

程调控的分子机制的了解尚不完整。进一步深入探索ErbB2内吞降解的作用效果与具体机制会帮助我们设计更加合理和高效的ErbB2靶向性治疗方案。ErbB2的分子伴侣蛋白HSP90在维持ErbB2的稳定性、二聚体形成和信号转导方面发挥至关重要的调节作用，因此仍然是靶向治疗方案设计的关键蛋白。泛素化修饰是调控ErbB2内吞和分选的核心方式，因此靶向ErbB2泛素化修饰预期会提供有效的促进降解效果。再有，其他调控方式和参与蛋白质的靶向干预效果也有待进一步探索，以及不同治疗靶点的

联合应用也有潜力提供更有有效的抑制效果。研究数据证实，ErbB2的内吞降解依赖一个复杂的调控机制，目前文献报道的调控方式仍然存在明显差异和疑问。临床治疗中ErbB2靶向药物的主要挑战仍然是耐药现象的产生，具体机制包括ErbB2过度表达和突变等。因此，通过进一步研究ErbB2的内吞降解调控有助于设计应对耐药现象的治疗措施，本领域的研究预期会为开发新型的ErbB2靶向治疗方案提供理论基础，并为提高ErbB2靶向治疗效果提供依据。

参考文献

- 1 Robinson D R, Wu Y M, Lin S F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, 2000, 19: 5548–5557

- 2 Hubbard S R. Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog Biophys Mol Biol*, 1999, 71: 343–358
- 3 Lemmon M A, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 2010, 141: 1117–1134
- 4 Butti R, Das S, Gunasekaran V P, et al. Receptor tyrosine kinases (RTKs) in breast cancer: signaling, therapeutic implications and challenges. *Mol Cancer*, 2018, 17: 34
- 5 Ferguson K M, Berger M B, Mendrola J M, et al. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell*, 2003, 11: 507–517
- 6 Du Z, Lovly C M. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer*, 2018, 17: 58
- 7 McDonnell L M, Kernohan K D, Boycott K M, et al. Receptor tyrosine kinase mutations in developmental syndromes and cancer: two sides of the same coin. *Hum Mol Genet*, 2015, 24: R60–R66
- 8 da Cunha Santos G, Shepherd F A, Tsao M S. EGFR mutations and lung cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2011, 6: 49–69
- 9 Wang T, Zhang J, Wang S, et al. The exon 19-deleted EGFR undergoes ubiquitylation-mediated endocytic degradation via dynamin activity-dependent and -independent mechanisms. *Cell Commun Signal*, 2018, 16: 40
- 10 Wang T, Wang D, Zhang Y, et al. Dynasore-induced potent ubiquitylation of the exon 19 deletion mutant of epidermal growth factor receptor suppresses cell growth and migration in non-small cell lung cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 105: 1–12
- 11 Wang F, Hou Y S, Yang D. Molecular evolutionary mechanisms underlying tumorigenesis, tumor development, and metastasis (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2020, 50: 1418–1426 [王斐, 侯雨杉, 杨冬. 肿瘤发生发展和转移过程中的分子进化机制. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 1418–1426]
- 12 Diamond J, Goldman J M, Melo J V. BCR-ABL, ABL-BCR, BCR, and ABL genes are all expressed in individual granulocyte-macrophage colony-forming unit colonies derived from blood of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*, 1995, 85: 2171–2175
- 13 Melo J V, Gordon D E, Cross N C, et al. The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 1993, 81: 158–165
- 14 Morris S W, Kirstein M N, Valentine M B, et al. Fusion of a kinase gene, *ALK*, to a nucleolar protein gene, *NPM*, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*, 1994, 263: 1281–1284
- 15 Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res*, 2001, 7: 2958–2970
- 16 Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med*, 2006, 57: 1–18
- 17 Yang X, Yang Z H, Zhou T, et al. Research progress of tumor angiogenesis inhibitors (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2020, 50: 1055–1067 [杨霞, 杨中汉, 周侗, 等. 肿瘤血管新生抑制因子的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 1055–1067]
- 18 Cohen S, Levi-Montalcini R. Purification and properties of a nerve growth-promoting factor isolated from mouse sarcoma 180. *Cancer Res*, 1957, 17: 15–20
- 19 Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem*, 1962, 237: 1555–1562
- 20 Cohen S, Fava R A, Sawyer S T. Purification and characterization of epidermal growth factor receptor/protein kinase from normal mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79: 6237–6241
- 21 Emde A, Köstler W J, Yarden Y. Therapeutic strategies and mechanisms of tumorigenesis of HER2-overexpressing breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2012, 84: e49–e57
- 22 Citri A. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res*, 2003, 284: 54–65
- 23 Yarden Y, Sliwkowski M X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2: 127–137
- 24 Libermann T A, Razon N, Bartal A D, et al. Expression of epidermal growth factor receptors in human brain tumors. *Cancer Res*, 1984, 44: 753–760
- 25 Hendler F J, Ozanne B W. Human squamous cell lung cancers express increased epidermal growth factor receptors. *J Clin Invest*, 1984, 74: 647–651
- 26 Slamon D J, Clark G M, Wong S G, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/*neu* oncogene. *Science*, 1987, 235: 177–182
- 27 Wang X X, Gu S W, Mi L Z. Structural basis for EGFR transmembrane signaling and its implications in therapeutic development (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2018, 48: 735–744 [王星星, 谷少伟, 米立志. EGFR家族受体的分子结构与药物作用机制. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 735–744]
- 28 Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12: 553–563

- 29 Tan X Q, Xiong J C, Zhu T F, et al. Development of drug design in China: 40 years of achievements (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2019, 49: 1375–1394 [谭小芹, 熊嘉诚, 朱亭霏, 等. 中国药物分子设计40年发展成就. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 1375–1394]
- 30 Shih C, Padhy L C, Murray M, et al. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature*, 1981, 290: 261–264
- 31 Bargmann C I, Hung M C, Weinberg R A. Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell*, 1986, 45: 649–657
- 32 Burgess A W, Cho H S, Eigenbrot C, et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell*, 2003, 12: 541–552
- 33 Garrett T P J, McKern N M, Lou M, et al. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell*, 2003, 11: 495–505
- 34 Zhang X, Gureasko J, Shen K, et al. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, 2006, 125: 1137–1149
- 35 Yu D, Hung M C. Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *Oncogene*, 2000, 19: 6115–6121
- 36 Wang Z. ErbB receptors and cancer. In: Wang Z, ed. ErbB Receptor Signaling. Methods in Molecular Biology. New York: Humana Press, 2017. 1652: 3–35
- 37 Slamon D J, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 2001, 344: 783–792
- 38 Arteaga C L, Sliwkowski M X, Osborne C K, et al. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011, 9: 16–32
- 39 Bose R, Kavuri S M, Searleman A C, et al. Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer. *Cancer Discov*, 2013, 3: 224–237
- 40 Subramanian J, Katta A, Masood A, et al. Emergence of *ERBB2* mutation as a biomarker and an actionable target in solid cancers. *Oncol*, 2019, 24: e1303
- 41 Drebin J A, Link V C, Stern D F, et al. Down-modulation of an oncogene protein product and reversion of the transformed phenotype by monoclonal antibodies. *Cell*, 1985, 41: 695–706
- 42 Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 1996, 14: 737–744
- 43 Denkert C, Seither F, Schneeweiss A, et al. Clinical and molecular characteristics of HER2-low-positive breast cancer: pooled analysis of individual patient data from four prospective, neoadjuvant clinical trials. *Lancet Oncol*, 2021, 22: 1151–1161
- 44 Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99: 628–638
- 45 Portera C C, Walshe J M, Rosing D R, et al. Cardiac toxicity and efficacy of trastuzumab combined with pertuzumab in patients with trastuzumab-insensitive human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 2710–2716
- 46 Tsuchikama K, An Z. Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries. *Protein Cell*, 2018, 9: 33–46
- 47 Barok M, Joensuu H, Isola J. Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance. *Breast Cancer Res*, 2014, 16: 209
- 48 Doi T, Shitara K, Naito Y, et al. Safety, pharmacokinetics, and antitumour activity of trastuzumab deruxtecan (DS-8201), a HER2-targeting antibody-drug conjugate, in patients with advanced breast and gastric or gastro-oesophageal tumours: a phase 1 dose-escalation study. *Lancet Oncol*, 2017, 18: 1512–1522
- 49 Nakada T, Sugihara K, Jikoh T, et al. The latest research and development into the antibody-drug conjugate, [fam-] trastuzumab deruxtecan (DS-8201a), for HER2 cancer therapy. *Chem Pharm Bull*, 2019, 67: 173–185
- 50 Xu Z, Guo D, Jiang Z, et al. Novel HER2-targeting antibody-drug conjugates of trastuzumab beyond T-DM1 in breast cancer: trastuzumab deruxtecan(DS-8201a) and (Vic-)trastuzumab duocarmazine (SYD985). *Eur J Med Chem*, 2019, 183: 111682
- 51 Banerji U, van Herpen C M L, Saura C, et al. Trastuzumab duocarmazine in locally advanced and metastatic solid tumours and HER2-expressing breast cancer: a phase 1 dose-escalation and dose-expansion study. *Lancet Oncol*, 2019, 20: 1124–1135
- 52 Xia W, Bacus S, Husain I, et al. Resistance to ErbB2 tyrosine kinase inhibitors in breast cancer is mediated by calcium-dependent activation of RelA. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9: 292–299

- 53 Nahta R, Yuan L X H, Du Y, et al. Lapatinib induces apoptosis in trastuzumab-resistant breast cancer cells: effects on insulin-like growth factor I signaling. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6: 667–674
- 54 Xia W, Liu L H, Ho P, et al. Truncated ErbB2 receptor (p95ErbB2) is regulated by heregulin through heterodimer formation with ErbB3 yet remains sensitive to the dual EGFR/ErbB2 kinase inhibitor GW572016. *Oncogene*, 2004, 23: 646–653
- 55 Jerez Y, Herrero B, Arregui M, et al. Neratinib for the treatment of early-stage, hormone receptor-positive, HER2-overexpressed breast cancer. *Future Oncol*, 2020, 16: 1165–1177
- 56 Rabindran S K, Discafani C M, Rosfjord E C, et al. Antitumor activity of HKI-272, an orally active, irreversible inhibitor of the HER-2 tyrosine kinase. *Cancer Res*, 2004, 64: 3958–3965
- 57 Kulukian A, Lee P, Taylor J, et al. Preclinical activity of HER2-selective tyrosine kinase inhibitor tucatinib as a single agent or in combination with trastuzumab or docetaxel in solid tumor models. *Mol Cancer Ther*, 2020, 19: 976–987
- 58 Dziadziuszko R, Smit E F, Dafni U, et al. Afatinib in NSCLC with HER2 mutations: results of the prospective, open-label phase II NICHE trial of european thoracic oncology platform (ETOP). *J Thorac Oncol*, 2019, 14: 1086–1094
- 59 Mok T S, Cheng Y, Zhou X, et al. Improvement in overall survival in a randomized study that compared dacomitinib with gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer and *EGFR*-activating mutations. *J Clin Oncol*, 2018, 36: 2244–2250
- 60 Mimnaugh E G, Chavany C, Neckers L. Polyubiquitination and proteasomal degradation of the p185c-B-2 receptor protein-tyrosine kinase induced by geldanamycin. *J Biol Chem*, 1996, 271: 22796–22801
- 61 Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, et al. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature*, 2003, 425: 407–410
- 62 Solit D B, Zheng F F, Drobnjak M, et al. 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin induces the degradation of androgen receptor and HER-2/neu and inhibits the growth of prostate cancer xenografts. *Clin Cancer Res*, 2002, 8: 986–993
- 63 Raja S M, Clubb R J, Bhattacharyya M, et al. A combination of Trastuzumab and 17-AAG induces enhanced ubiquitinylation and lysosomal pathway-dependent ErbB2 degradation and cytotoxicity in ErbB2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7: 1630–1640
- 64 Scaltriti M, Serra V, Normant E, et al. Antitumor activity of the Hsp90 inhibitor IPI-504 in HER2-positive trastuzumab-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10: 817–824
- 65 Mellatyar H, Talaei S, Pilehvar-Soltanahmadi Y, et al. Targeted cancer therapy through 17-DMAG as an Hsp90 inhibitor: overview and current state of the art. *Biomed Pharmacother*, 2018, 102: 608–617
- 66 Fridman J S, Caulder E, Hansbury M, et al. Selective inhibition of ADAM metalloproteases as a novel approach for modulating ErbB pathways in cancer. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 1892–1902
- 67 Witters L, Scherle P, Friedman S, et al. Synergistic inhibition with a dual epidermal growth factor receptor/HER-2/neu tyrosine kinase inhibitor and a disintegrin and metalloprotease inhibitor. *Cancer Res*, 2008, 68: 7083–7089
- 68 Michl J. Receptor mediated endocytosis. *Am J Clin Nutr*, 1980, 33: 2462–2471
- 69 Clague M J, Liu H, Urbé S. Governance of endocytic trafficking and signaling by reversible ubiquitylation. *Dev Cell*, 2012, 23: 457–467
- 70 Sorkin A, Di Fiore P P, Carpenter G. The carboxyl terminus of epidermal growth factor receptor/erbB-2 chimerae is internalization impaired. *Oncogene*, 1993, 8: 3021–3028
- 71 Wang Z, Zhang L, Yeung T K, et al. Endocytosis deficiency of epidermal growth factor (EGF) receptor-ErbB2 heterodimers in response to EGF stimulation. *Mol Biol Cell*, 1999, 10: 1621–1636
- 72 Shen F, Lin Q, Childress C, et al. Identification of the domain in ErbB2 that restricts ligand-induced degradation. *Cell Signal*, 2008, 20: 779–786
- 73 Hommelgaard A M, Lerdrup M, van Deurs B. Association with membrane protrusions makes ErbB2 an internalization-resistant receptor. *Mol Biol Cell*, 2004, 15: 1557–1567
- 74 Haslekås C, Breen K, Pedersen K W, et al. The inhibitory effect of ErbB2 on epidermal growth factor-induced formation of clathrin-coated pits correlates with retention of epidermal growth factor receptor-ErbB2 oligomeric complexes at the plasma membrane. *Mol Biol Cell*, 2005, 16: 5832–5842
- 75 Bertelsen V, Stang E. The mysterious ways of ErbB2/HER2 trafficking. *Membranes*, 2014, 4: 424–446
- 76 Tikhomirov O, Carpenter G. Geldanamycin induces ErbB-2 degradation by proteolytic fragmentation. *J Biol Chem*, 2000, 275: 26625–26631
- 77 Lerdrup M, Hommelgaard A M, Grandal M, et al. Geldanamycin stimulates internalization of ErbB2 in a proteasome-dependent way. *J Cell Sci*, 2006, 119: 85–95

- 78 Lerdrup M, Bruun S, Grandal M V, et al. Endocytic down-regulation of ErbB2 is stimulated by cleavage of its C-terminus. *Mol Biol Cell*, 2007, 18: 3656–3666
- 79 Pedersen N M, Madhus I H, Haslekås C, et al. Geldanamycin-induced down-regulation of ErbB2 from the plasma membrane is clathrin dependent but proteasomal activity independent. *Mol Cancer Res*, 2008, 6: 491–500
- 80 Barr D J, Ostermeyer-Fay A G, Matundan R A, et al. Clathrin-independent endocytosis of ErbB2 in geldanamycin-treated human breast cancer cells. *J Cell Sci*, 2008, 121: 3155–3166
- 81 Cortese K, Howes M T, Lundmark R, et al. The HSP90 inhibitor geldanamycin perturbs endosomal structure and drives recycling ErbB2 and transferrin to modified MVBs/lysosomal compartments. *Mol Biol Cell*, 2013, 24: 129–144
- 82 Grice G L, Nathan J A. The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73: 3497–3506
- 83 Lauwers E, Jacob C, André B. K63-linked ubiquitin chains as a specific signal for protein sorting into the multivesicular body pathway. *J Cell Biol*, 2009, 185: 493–502
- 84 Marx C, Held J M, Gibson B W, et al. ErbB2 trafficking and degradation associated with K48 and K63 polyubiquitination. *Cancer Res*, 2010, 70: 3709–3717
- 85 Vuong T T, Berger C, Bertelsen V, et al. Preubiquitinated chimeric ErbB2 is constitutively endocytosed and subsequently degraded in lysosomes. *Exp Cell Res*, 2013, 319: 32–45
- 86 Xu W, Marcu M, Yuan X, et al. Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 12847–12852
- 87 Ehrlich E S, Wang T, Luo K, et al. Regulation of Hsp90 client proteins by a Cullin5-RING E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 20330–20335
- 88 Liu H, Buus R, Clague M J, et al. Regulation of ErbB2 receptor status by the proteasomal DUB POH1. *PLoS ONE*, 2009, 4: e5544
- 89 Meijer I M J, van Leeuwen J E M. ERBB2 is a target for USP8-mediated deubiquitination. *Cell Signal*, 2011, 23: 458–467
- 90 Zhang J, Liu S, Li Q, et al. The deubiquitylase USP2 maintains ErbB2 abundance via counteracting endocytic degradation and represents a therapeutic target in ErbB2-positive breast cancer. *Cell Death Differ*, 2020, 27: 2710–2725
- 91 Zhang Y, Zhang J, Liu C, et al. Neratinib induces ErbB2 ubiquitylation and endocytic degradation via HSP90 dissociation in breast cancer cells. *Cancer Lett*, 2016, 382: 176–185
- 92 Wang S, Zhang J, Wang T, et al. Endocytic degradation of ErbB2 mediates the effectiveness of neratinib in the suppression of ErbB2-positive ovarian cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 2019, 117: 105640
- 93 Zhang J, Li Q, Wu Y, et al. Cholesterol content in cell membrane maintains surface levels of ErbB2 and confers a therapeutic vulnerability in ErbB2-positive breast cancer. *Cell Commun Signal*, 2019, 17: 15
- 94 Bailey T A, Luan H, Tom E, et al. A kinase inhibitor screen reveals protein kinase C-dependent endocytic recycling of ErbB2 in breast cancer cells. *J Biol Chem*, 2014, 289: 30443–30458
- 95 Dietrich M, Malik M S, Nikolaysen F, et al. Protein kinase C mediated internalization of ErbB2 is independent of clathrin, ubiquitination and Hsp90 dissociation. *Exp Cell Res*, 2018, 371: 139–150
- 96 Klapper L N, Waterman H, Sela M, et al. Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2. *Cancer Res*, 2000, 60: 3384–3388
- 97 Szymanska M, Fosdahl A M, Nikolaysen F, et al. A combination of two antibodies recognizing non-overlapping epitopes of HER2 induces kinase activity-dependent internalization of HER2. *J Cell Mol Med*, 2016, 20: 1999–2010
- 98 Paris L, Cecchetti S, Spadaro F, et al. Inhibition of phosphatidylcholine-specific phospholipase C downregulates HER2 overexpression on plasma membrane of breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, 2010, 12: R27
- 99 Ma W, Zhan Y, Zhang Y, et al. An intelligent DNA nanorobot with *in vitro* enhanced protein lysosomal degradation of HER2. *Nano Lett*, 2019, 19: 4505–4517
- 100 Goh L K, Sorkin A. Endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*, 2013, 5: a017459
- 101 McCann A P, Scott C J, Van Schaebroeck S, et al. Deubiquitylating enzymes in receptor endocytosis and trafficking. *Biochem J*, 2016, 473: 4507–4525
- 102 Bergeron J J M, Di Guglielmo G M, Dahan S, et al. Spatial and temporal regulation of receptor tyrosine kinase activation and intracellular signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 2016, 85: 573–597

Advances in understanding the therapeutic targeting of ErbB2 by regulating endocytic degradation

ZHANG YingQiu, LIU ShuYan & LIU Han

Institute of Cancer Stem Cell, Dalian Medical University, Dalian 116044, China

ErbB2/HER2 belongs to the ErbB/EGFR family of receptor tyrosine kinases (RTKs), which are overexpressed in diverse cancer-types, such as breast, ovarian, gastric cancers, etc., and are frequently associated with adverse clinical outcomes. ErbB2 forms homodimers or heterodimers with EGFR family members on the plasma membrane. It can activate a series of downstream signaling pathways to promote the proliferation and survival of cancer cells. Current ErbB2-targeted therapies include monoclonal antibodies, antibody-drug conjugates, and small-molecule kinase inhibitors. However, in most cases, drug resistance seems inevitable and threatens patients' lives. Recent advances suggest that the induced ubiquitylation and endocytic degradation of ErbB2 effectively diminish its surface presence and, thus, successfully suppress the growth of cancer cells. Herein, we briefly introduce ErbB2 and targeted therapies against this RTK before focusing on recent advances in the understanding of the dynamic regulation of its ubiquitylation and endocytic degradation. We aim to shed light on the development of novel ErbB2-targeted therapeutic strategies in the treatment of human cancers.

RTK, ErbB2, HER2, ubiquitylation, endocytic degradation, targeted therapy

doi: [10.1360/SSV-2021-0410](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0410)