

Konformacijske promjene receptora za epidermalni faktor rasta uzrokovane vezanjem različitih liganada

Jukica, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:534702>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Tea Jukica
1411/MB

**KONFORMACIJSKE PROMJENE
RECEPTORA ZA EPIDERMALNI
FAKTOR RASTA UZROKOVANE
VEZANJEM RAZLIČITIH
LIGANADA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za istraživanje raka na katedri za Imunologiju i medicinsku genetiku na Medicinskom fakultetu u Splitu pod voditeljstvom doc.dr.sc. Jasminke Omerović, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu i mentorstvom izv.prof.dr.sc. Igora Slivac, PBF.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

KONFORMACIJSKE PROMJENE RECEPTORA ZA EPIDERMALNI FAKTOR RASTA UZROKOVANE VEZANJEM RAZLIČITIH LIGANADA

Tea Jukica, 1411/MB

Sažetak:

Receptor za epidermalni faktor rasta je jedan u nizu tirozin kinaznih receptora stanične membrane koji vezanjem specifičnih liganada inducira aktivaciju nizvodnih signalnih puteva koji za rezultat imaju proliferaciju diferencijaciju, migraciju i supresiju apoptoze u stanici. Znajući da se strukturna konformacija receptora mijenja ovisno o vezanom ligandu tijekom procesa internalizacije receptora, cilj ovog rada je ispitati razlike u konformaciji kinaznih domena u sklopu homo/heterodimera inducirane dvjema čimbenicima rasta, tj. izvanstaničnim ligandima EGF i TGF-alfa, te sa i bez pristunosti negativnog regulatora iz citosola, Mig6. Ispitivanje se provodilo na transfektiranim CHO-K1 stanicama iz kojih su se izolirani proteini analizirali pomoću Western blot metode. Istraživanje je pokazalo da se kontakti u kinaznim domenama homodimera razlikuju ovisno o vezanom ligandu te da su kontakti u heterodimerima različiti od onih u homodimerima.

Ključne riječi: EGFR, fosforilacija, Mig6, ligand, konformacija

Rad sadrži: 53 stranica, 19 slika, 7 tablica, 53 literaturnih navoda, 1 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Izv.prof.dr.sc. Igor Slivac*

Pomoć pri izradi : *Jasminka Omerović, doc.dr.sc., Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. *Izv.prof.dr.sc. Igor Slivac, PBF, Sveučilište u Zagrebu*
2. *Doc.dr.sc. Jasminka Omerović, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu*
3. *Prof.dr.sc. Višnja Gaurina Srček, PBF, Sveučilište u Zagrebu*
4. *Prof.dr.sc. Ksenija Durgo (zamjena), PBF, Sveučilište u Zagrebu*

Datum obrane: 24. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of biochemical engineering
Laboratory for Cell technology and application and biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

CONFORMATIONAL CHANGES OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR INDUCED BY BINDING OF DIFFERENT LIGANDS

Tea Jukica, 1411/MB

Abstract:

The epidermal growth factor receptor is one in a series of transmembrane tyrosine kinase receptors that, by binding specific ligands, induce the activation of downstream signaling pathways that result in proliferation, differentiation, migration, and apoptosis suppression of the cell. Knowing that the structural conformation of the receptor changes depending on the bound ligand during the receptor internalization process, the aim of this study is to examine differences in the conformation of kinase domains within homo / heterodimers induced by different growth factors, i.e. extracellular ligands EGF and TGF- α , and with or without the presence of a negative regulator from cytosol, Mig6. The assay was performed on transfected CHO-K1 cells from which isolated proteins were analyzed using the Western blot method. The study showed that the contacts in the kinase domains of homodimers differ depending on the bound ligand and that the contacts in heterodimers are different from those in homodimers.

Keywords: EGFR, phosphorylation, Mig6, ligand, conformation

Thesis contains: 53 pages, 19 figures, 7 tables, 53 references, 1 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD Igor Slivac, Associate professor*

Technical support and assistance: *PhD Jasminka Omerović, Assistant professor*

Reviewers:

1. *PhD. Igor Slivac, Associate professor*
2. *PhD. Jasminka Omerović, Assistant professor*
3. *PhD. Višnja Gaurina Srček, Full professor*
4. *PhD. Ksenija Durgo, Full professor (substitute)*

Thesis defended: 24. September 2021.

Sadržaj

1	UVOD.....	1
2	TEORIJSKI DIO.....	2
2.1	ErbB RECEPTORI	2
2.1.1	Struktura	2
2.1.2	Aktivacija	4
2.1.3	Ligandi	6
2.1.4	Linkeri.....	10
2.1.5	Endocitoza	10
2.1.6	Nizvodni signalni putevi	11
2.1.7	Negativna regulacija EGFR.....	14
2.1.8	ErbB i tumori.....	15
3	EKSPERIMENTALNI DIO.....	20
3.1	MATERIJALI.....	20
3.1.1	Stanična linija.....	20
3.1.2	Bakterijski soj.....	20
3.1.3	DNA konstrukti	20
3.1.4	Medij.....	20
3.1.5	Kemikalije	21
3.1.6	Puferske otopine.....	22
3.1.7	Uređaji i programi.....	22

3.1.8	Protutijela.....	23
3.1.9	Ligandi.....	24
3.1.10	Kompleti.....	24
3.2	METODE.....	25
3.2.1	Transformacija kompetentnih bakterija soja DH5 α <i>heat shock</i> metodom.....	25
3.2.2	Izolacija plazmidne DNA.....	25
3.2.3	Transfekcija CHO-K1 stanica.....	25
3.2.4	Stimulacija sa različitim ligandima.....	25
3.2.5	Imunoprecipitacija i priprema uzorka za proteinsku elektroforezu.....	26
3.2.6	Western blot.....	27
4	REZULTATI I RASPRAVA.....	29
4.1	REZULTATI.....	29
4.1.1	EGFR homodimeri s vezanim različitim ligandima.....	29
4.1.2	EGFR homodimeri s vezanim različitim ligandima uz prisutnost inhibitora Mig631.....	31
4.1.3	EGFR i ErbB2 heterodimeri s vezanim različitim ligandima.....	33
4.1.4	Povezivanje različitih liganada fleksibilnim linkerom.....	35
4.2	RASPRAVA.....	39
5	ZAKLJUČCI.....	45
6	Literatura.....	46
7	PRILOZI.....	52

1 UVOD

Tirozin kinaze su proteini koji kataliziraju fosforilaciju tirozinskih ostataka, gdje je donor fosfata ATP. Ova post-translacijska modifikacija važna je za unutarstaničnu komunikaciju i signalizaciju. Stanična signalizacija je iznimno bitan čimbenik za normalno odvijanje fizioloških procesa. Glavnu ulogu u komunikaciji između stanica imaju signalne molekule, od kojih se većina veže za receptore eksprimirane na staničnoj površini (Cooper, 2000). Mreža unutarstaničnih biokemijskih reakcija koje prevode vanjske signale u specifičan odgovor, poput proliferacije, supresije apoptoze, diferencijacije, sekrecije ili migracije stanica, poznata je kao transdukcija signala (Torres i Forman, 2006). U skupinu receptorskih tirozin kinaza spada obitelj ErbB receptora, od kojih je najpoznatiji član EGFR. Ovi receptori na sebe vežu 12 različitih čimbenika rasta. Mehanizam aktivacije tirozin kinaznih receptora objašnjen je formiranjem asimetričnih dimera, a dimerizacija je uzrokovana vezanjem čimbenika rasta, odnosno liganda. Jedan od mehanizama negativne regulacije je internalizacija receptora koja se odvija pomoću klatrin posredovane endocitoze, a receptor je unutar stanice osuđen na dvije sudbine, reciklacije na plazma membranu ili degradacije u lizosomu. U još jedan mehanizam negativne regulacije uključen je protein Mig6. Promjene u signalnom putu koje su najčešće rezultat mutacije u genu ili prekomjerne ekspresije samog receptora vrlo često uzrokuju nastanak i razvoj tumora. Lijekovi koji se trenutno koriste, za tumore ovisne o ErbB signalizaciji, su tirozin kinazni inhibitori (TKI), no većina tumora razvije rezistencije na postojeće TKI. Potrebno je razviti nove mehanizme inhibicije, a potencijalno rješenje leži u alosteričkim inhibitorima.

Znajući da čimbenici rasta EGF i TGF- α , vezani za receptor, uzrokuju različitu strukturnu konformaciju vanstanične domene EGF-receptora (EGFR), cilj ovog rada je ispitati utječu li te razlike na strukturnu konformaciju kinaznih domena u homo/heterodimerima EGFR. Također ispitat će se utjecaj negativnog regulatora Mig6 koji djeluje kao inhibitor EGFR i njegove dimerizacije. Koristit će se različite varijante receptora, divlji tip te dvije varijante s mutacijom u kinaznoj domeni. Koristit će se stanice koje ne eksprimiraju endogeni EGFR i biti će transfektirane navedenim varijantama receptora i tretirane različitim čimbenicima rasta, a rezultat će se analizirati pomoću Western blot metode.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 ErbB RECEPTORI

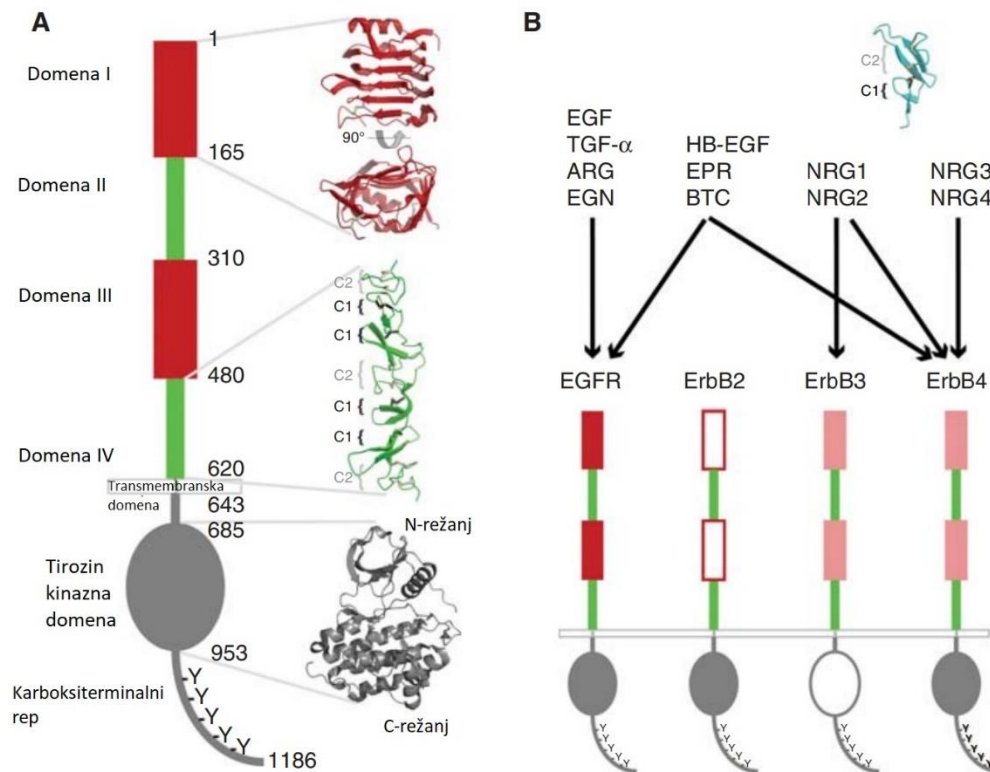
ErbB obitelj proteina klasificira se kao tirozin kinazni receptori koji sadrže SH2 domenu i fosfotirozin vezujuću domenu PTB. U ljudskom ErbB obitelj proteina klasificira se kao tirozin kinazni receptori genomu postoji oko 60 tirozin kinaznih receptora (Wang, 2017). Protein kinaze imaju ulogu u mnogim staničnim procesima uključujući diferencijaciju, regulaciju apoptoze, razvoj citoskeleta, živčani sustav, imunološki odgovor i sl. Zbog njihovog širokog područja djelovanja često se pronalaze pogreške u regulaciji samih kinaza u mnogim bolestima poput tumora, autoimunih, kardiovaskularnih i neuroloških poremećaja (Roskoski, 2014).

U obitelj humanih receptora epidermalnih faktora rasta spadaju 4 člana EGFR/ERBB1/HER1, ERBB2/HER2, ERBB3/HER3 i ERBB4/HER4 (Wang, 2017). Naziv ErbB se koristi zbog v-erbB onkogeno kodiranog avian eritroblastozom virusom s kojim dijeli homologiju. Svi geni za humani ErbB nalaze se na istim kromosomima. Gen koji kodira za ErbB1 nalazi se na kromosomu 7p11, duljine 110 kb i molekulske mase od 170 kDa. N-terminalni kraj vanstanične domene je glikoziliran, a na C-terminalnom kraju kinazne unutarstanične domene nalaze se tirozini koji podliježu autofosforilaciji kao rezultat dimerizacije receptora. Gen koji kodira za ErbB2 nalazi se na kromosomu 17q21. Iako ne veže nikakav do sada poznati ligand, ErbB2 je preferirani partner za heterodimerizaciju s ostalim članovima ErbB obitelji. Često je prekomjerno eksprimiran u tumorima dojke. ErbB3 je član obitelji koji nema funkcionalnu kinaznu domenu, gen koji ga kodira se nalazi na kromosomu 12q13. Gen za ErbB4 nalazi se na kromosomu 2q33 (Kuemmerle i sur, 2012). Od poznatih liganda za ErbB receptore njih 7 se veže za ErbB1, 2 za ErbB3 i 7 za ErbB4 (Slika 1. B) (Roskoski, 2019).

2.1.1 Struktura

Strukturno EGFR se sastoji od 3 domene. Vanstanična domena, koja se sastoji od 4 dijela: leucinom bogate regije I i III koje su odgovorne za vezanje liganda te regije koje sadrže cisteine važne za formiranje disulfidnih veza, odnosno regija II i IV. Transmembranska hidrofobna domena sastavljena od 19-25 aminokiselina. Unutarstanična domena koja nosi

kinaznu aktivnost može se podijeliti na jukstamembranski segment, protein kinaznu domenu i karboksiterminalni rep (Slika 1. A) (Wang, 2017).



Slika 1. Građa receptora ErbB obitelji (A) i njihovi ligandi (B) (Lemmon i sur., 2014)

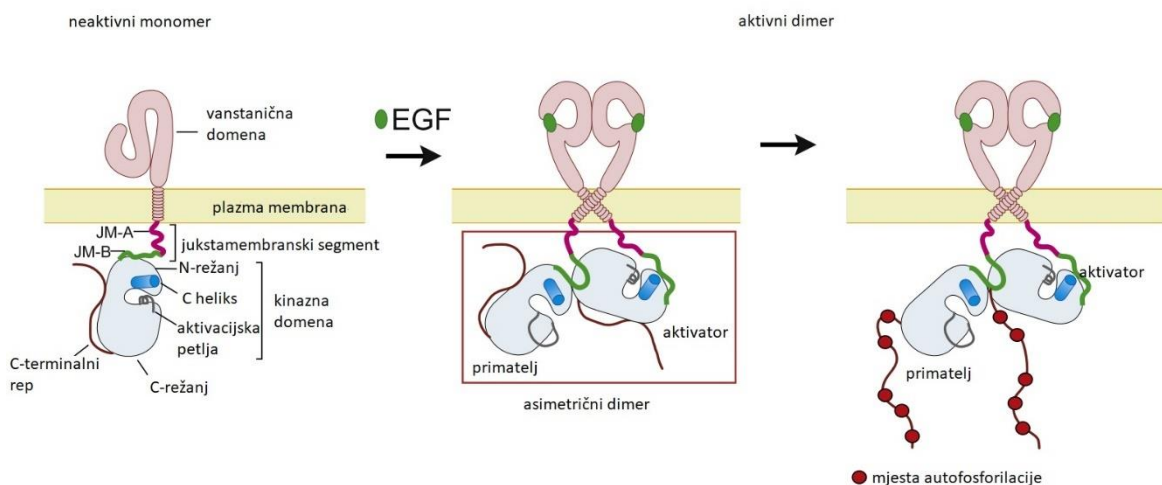
C-terminalni rep sadrži 20 tirozinskih ostataka od kojih se 12 može fosforilirati i aktivirati nizvodne signalne puteve (Purba i sur, 2017). Prekursor EGFR koji se cijepa na N-terminalnom kraju sadrži 1210 aminokiselina, a zreli protein 1186 od čega 621 aminokiselina otpada na vanstaničnu domenu, 23 aminokiseline na transmembransku domenu i 542 aminokiseline na unutarstaničnu kinaznu domenu u koju spada i jukstamembranski segment od oko 40 aminokiselina.

N i C-režanj su sastavni dio kinazne domene, između kojih se nalazi ATP vezujuće mjesto. Njihova interakcija ključna je za trans-autofosforilaciju receptora, odnosno interakcija N-režnja jednog i C-režnja drugog receptora (Wee i Wang, 2017).

2.1.2 Aktivacija

Receptori na staničnoj membrani postoje u monomernom obliku. Kada se na receptor veže ligand, odnosno čimbenik rasta, konformacija samog receptora se mijenja i dolazi do formiranja dimera. Važnu ulogu u formiranju dimera ima "vezna ruka" koja je u "spuštenoj" konformaciji u domeni IV prije vezanja liganda (Wang, 2017). Domena II i njena struktura " β -ukosnice" je u zatvorenoj konformaciji i vezana je za domenu IV odnosno njenu "veznu ruku". Kada se ligand veže konformacija se mijenja (Purba i sur, 2017), uslijed pucanja intramolekulskih veza (Wang, 2017), domena I i II se udaljavaju od domene IV, β -ukosnica domene II stupa u interakciju sa istom domenom drugog receptora, isto kao i domena IV (Purba i sur, 2017). ErbB1/3/4 su slični po strukturi, sva 3 člana imaju zatvorenu konformaciju prije vezanja liganda, dok ErbB2 ima otvorenu konformaciju te mu je dimerizacijska ruka ispružena što mu omogućava formiranje dimera bez vezanja liganda, no tako nastali homodimeri nisu aktivni, osim u slučaju kada postoji prekomjerna ekspresija. Razlika između ErbB2 i ErbB1/3/4 je u mjestu kontakta dimerizacijske ruke u domeni IV. ErbB2 sadrži prolin i fenilalanin, a ErbB1/3/4 sadrže glicin, histidin i asparagin. Ukoliko se deletira dimerizacijska ruka EGF receptora neće doći do formiranja dimera, autofosforilacije ni aktiviranja nizvodnih signalnih puteva, stoga se može zaključiti da je dimerizacijska ruka presudna stavka za aktivaciju ErbB receptora (Wang, 2017). Interakcije između dva receptora su hidrofobne i vodikove. Tyr246, Pro248 i Tyr25 u jednoj molekuli (A) hidrofobno se vežu s Phe230, Phe263, Ala265, Tyr275 i Arg285 u drugoj molekuli receptora (B). Vodikove veze nalaze se između Tyr251 u molekuli A i Arg285 u molekuli B, Gln252 molekule A i Ala286 molekule B te između Tyr246 molekule A i Cys283 molekule B (Ogiso i sur., 2002). Receptor se aktivira vezanjem čimbenika rasta na vanstaničnu domenu svakog od dva receptora. Kinazna domena je odgovorna za fosforilaciju tirozinskih ostataka od kojih su neki važni za vezanje proteina adaptora i E3 ubikvitin ligaze koji sudjeluju u nizvodnoj signalizaciji. Svaka od dvije kinaze ima svoju ulogu, jedna ima ulogu aktivatora, a druga primatelja. Kada se kinaza primatelja aktivira, promjenom strukturne konformacije, katalizira fosforilaciju tirozin kinaznih ostataka C-terminalnog repa aktivatora (Wang, 2017). Udaljenost između 2 C-terminalna kraja transmembranske domene je oko 20 Å. Interakcijom dva receptora nastaje transmembranski dimer koji je zapravo zavojnica. Ovisno o aktivnom ili neaktivnom stanju, transmembranske zavojnice postoje u dva oblika, kada su N-terminalni krajevi blizu jedan drugom te kada su C-terminalni krajevi blizu. Kada receptor ima vezan ligand N-terminalni krajevi su blizu, a kada je receptor bez vezanog liganda struktura je

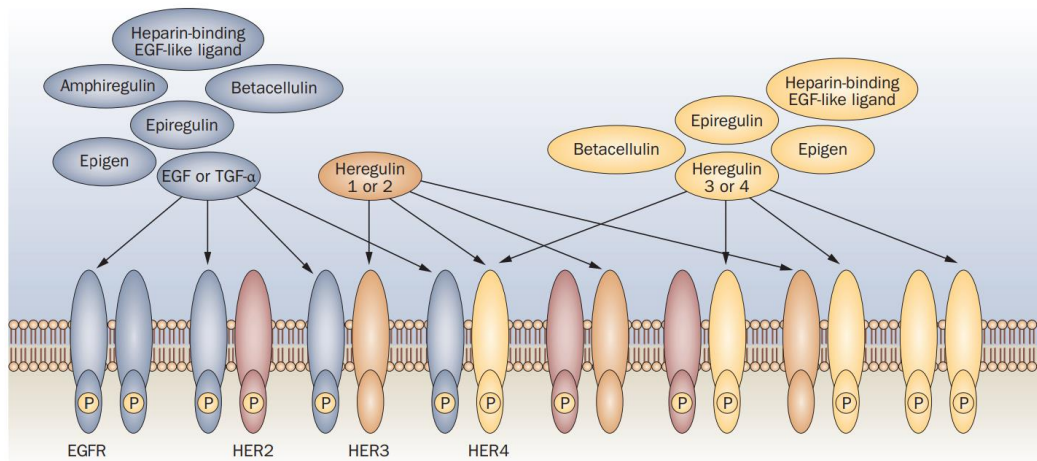
takva da su C-terminalni krajevi transmembranske zavojnice blizu (Kovacs i sur, 2015). Uvođenjem mutacija na C-terminalnom dijelu jukstamembranske domene ustanovljeno je da ta domena ima ulogu u aktivaciji receptora zbog toga što su uvedene mutacije onemogućile aktivaciju (Wang, 2017). Kada za receptor nije vezan ligand, on se nalazi u autoinhibiranom stanju. Ligand se veže između domene I i III. Vezanje liganda će uzrokovati reorijentaciju simetričnog neaktivnog dimera, u kojem je α C zavojnica N-režnja kinaze okrenut prema van, tako da kinaza aktivator potakne konformacijske promjene u kinazi primatelj čime je i aktivira, a α C zavojnica je sada okrenuta prema aktivnom mjestu. Ovakav dimer se sada naziva asimetrični aktivni dimer. Reorijentacija uzrokovana vezanjem liganda je zapravo rotacija transmembranske domene za oko 140° što dovodi do reorijentacije kinaza te nastaje asimetrična aktivna konformacija (Purba i sur, 2017). Jukstamembranski segment može se podijeliti na dva dijela, N-terminalni ili JM-A i C-terminalni ili JM-B. Konformacija koja nastane nakon dimerizacije receptora je ta da JM-B dio jednog receptora stupa u interakciju sa C-režnjem drugog receptora, koji je u ovom slučaju aktivator (Slika 2.). Ova interakcija je ključna u aktivaciji dimera. Protein EGFR Mig6 se veže između dviju kinaza, aktivatora i primatelja, čime blokira formiranje asimetričnih dimera, odnosno sprječava interakciju JM-B sa C-režnjem susjednog receptora (Jura i sur., 2009).



Slika 2. Ligandom posredovana aktivacija ErbB receptora (Jura i sur., 2009)

Poznato je da receptori mogu stvarati i heterodimere, a pošto nema vezanog liganda, ErbB2 je najčešći dimerizacijski partner. Stvaranje heterodimera znatno proširuje signalizaciju

ErbB receptora. Signal proizveden od strane heterodimera može se pripisati jedinstvenim značajkama koje stječe heterodimer, a ne zbroju svojstava pojedinih dimerizacijskih partnera. Pokazano je da dimerizacijski partneri utječu na fosforilaciju receptora (Olayioye, 2000). Na Slici 3 prikazane su sve mogućnosti heterodimerizacije ErbB receptora te odgovarajući ligandi.



Slika 3. ErbB heterodimeri i njihovi ligandi (Olayioye, 2000)

2.1.3 Ligandi

Svi dolje navedeni ligandi prvo se sintetiziraju kao transmembranski prekursori sadržavajući vanstaničnu, transmembransku i citoplazmatsku domenu. Vanstanična domena liganda procesira se metaloproteinazom TACE odnosno ADAM17, točnije TGF, amfiregulin i HB-EGF, dok se EGF i betacelulin procesiraju s ADAM10 (Kuemmerle i sur, 2012). EGFR ligandi imaju sposobnost autoinduciranja ili križnog induciranja jedni drugih (Singh i sur, 2016).

2.1.3.1 *Epidermalni faktor rasta (EGF)*

Glavni član skupine liganada koji se vežu za EGF receptor je epidermalni faktor rasta EGF (Singh i sur, 2016). EGF je protein od 6 kDa sastavljen od 53 aminokiseline (Wee i Wang, 2017), a gen za EGF nalazi se na kromosomu 4q25-27 i dužine 120 kb (Kuemmerle i sur., 2012). Može ga se pronaći u tjelesnim tekućinama u visokim koncentracijama, važan je u razvoju reproduktivnog i gastrointestinalnog trakta, zubiju, mozga, kože (Wee i Wang, 2017). Dokazano je da aktivacija EGFR vezanjem EGF-a potiče unutarstaničnu proizvodnju

reaktivnih kisikovih spojeva ROS (Singh i sur., 2016), te stanične odgovore poput proliferacije, diferencijacije i migracije (Zeng i Harris, 2014).

2.1.3.2 *Transformirajući faktor rasta alfa (TGF- α)*

Gen koji kodira za transformirajući faktor rasta- α nalazi se na kromosomu 2p13, dužine je oko 107kb. Prije nastanka zrelog proteina TGF- α postoji kao prekursor pro-TGF- α . To je membranski protein tipa 1 od 160 aminokiselina. N-terminalni dio podliježe glikozilaciji. Pro-TGF- α iz endoplazmatskog retikuluma odlazi do Golgija te se smješta na površinu polariziranih epitelnih stanica gdje se proteolizom oslobađa zreli TGF- α , a za to je odgovoran ADAM17 (disintegrin i metaloproteaza 17). Većina aminokiselinskih ostataka TGF- α je odgovorna za kontakt sa EGF receptorom (Hsuan, 2004).

2.1.3.3 *Amfiregulin*

Dva gena koja kodiraju za amfiregulin nalaze se na kromosomu 4q13.3. S jedne strane gena nalazi se gen za betacelulin, a s druge za epiregulin i epigen. Zreli protein amfiregulin nastaje nakon proteolize prekursora pro-areg. Za proteolizu je odgovoran protein koji je dio obitelji ADAM17, TACE. Amfiregulin ima ulogu u proliferaciji, apoptozi i migraciji stanica. (Berasain i Avila, 2014).

2.1.3.4 *Heparin vezujući-EGF (HB-EGF)*

Gen za heparin vezujući epidermalni faktor rasta se nalazi na kromosomu 5q21. isto kao i ostali članovi EGFR liganada, HB-EGF prolazi proteolizu ADAM obitelji metaloproteinaza. Molekulska masa zrelog proteina je oko 20 kDa, a veže se samo na EGFR i ErbB4 što uzrokuje njihovu aktivaciju i fosforilaciju. Zaslužan je za proliferaciju i preživljenje stanica (Kuemmerle i sur, 2012). HB-EGF najduže se zadržava na staničnoj površini (Singh i sur., 2016).

2.1.3.5 *Epiregulin*

Gen se nalazi na kromosomu 4q13.3. epiregulin nema N-terminalnu sekvencu te se ne veže za heparin (Kuemmerle i sur., 2012), a može aktivirati ErbB1 i ErbB4 (Singh i sur, 2016).

2.1.3.6 *Epigen*

Gen za epigen se nalazi na kromosomu 4q13.3. Zreli protein se sastoji od 152 aminokiselina, a prekursor mu je transmembranski glikoprotein koji se cijepa na dva mjesta (Kuemmerle i sur., 2012). Epigen ima mali afinitet za EGFR (Singh i sur., 2016).

2.1.3.7 *Betacelulin*

Gen za betacelulin nalazi se na kromosomu 4q13-q21, a molekulska masa zrelog proteina iznosi oko 32 kDa. Betacelulin se može vezati na ErbB2/3 heterodimere (Kuemmerle i sur., 2012).

2.1.3.8 *Neuregulini*

Neuregulini su ligandi koji se vežu na ErbB3/4, kodiraju ih 4 gena. Svi sadrže domenu koja nalikuje onoj u EGF-u. Važni su za živčani sustav i njegov razvoj te su neki povezani sa schizofrenijom (Lemmon i sur., 2014).

Vežanje liganda za vanstaničnu domenu receptora šalje signal preko 200 aminokiselina kako bi se aktivirao asimetrični dimer. Za EGFR veže se 7 različitih čimbenika rasta te svaki od njih inducira različitu strukturu receptora, a samim time i različitu aktivaciju nizvodnih signalnih puteva. Struktura jukstamembranskog segmenta zavojnice može se podijeliti u dvije skupine, onu koju uzrokuju EGF i HB-EGF, a bogata je leucinom (namotana zavojnica EGF tipa) i onu koju uzrokuju TGF- α , amfiregulin, epiregulin i epigen te je polarna (namotana zavojnica TGF- α tipa). Osim toga ligandi se razlikuju i po afinitetu za EGFR te su tako EGF i TGF- α ligandi koji imaju visok afinitet te formiraju čvrste dimere, a epigen i epiregulin formiraju slabe dimere jer imaju nizak afinitet. Iako pripada ligandima visokog afiniteta, TGF- α ipak uzrokuje stanični odgovor i konformaciju receptora sličnu onoj kakvu uzrokuju ligandi slabog afiniteta. Receptori koji imaju vezan TGF- α , amfiregulin ili epiregulin se recikliraju, odnosno nakon endocitoze se vraćaju na površinu stanice, za razliku od EGF, HB-EGF i betacelulina koji se, nakon endocitoze, degradiraju. Jukstamembranski segment (JM) sadrži mnoga mjesta važna za nizvodnu regulaciju EGFR. Kao rezultat različitih konformacija JM može doći do drukčije fosforilacije na C-terminalnom kraju uslijed konformacijskih promjena u kinaznoj domeni. ErbB2 u JM segmentu podudara se 68% sekvence sa EGFR, dok je u

transmembranskoj domeni podudarnost tek 20%. Razlika između ErbB2 i EGFR je u aminokiselini valinu umjesto glicina na mjestu 635. Potvrđeno je da je upravo ta aminokiselina odgovorna za formiranje namotane zavojnice TGF- α tipa u JM segmentu kod homodimera ErbB2. Kako bi se potvrdilo da zaista različiti ligandi uzrokuju različite konformacije proveden je eksperiment u kojem je korištena bis-arsenična boja ReAsH te se u EGFR uvela supstitucija sa dva cisteina na poziciji 648 i 649. Ova boja fluorescira crveno kada se veže za 4 cisteina. Stanice koje su eksprimirale navedenu varijantu EGFR su stimulirane sa svih 7 poznatih liganada. Stanice koje nisu tretirane čimbenikom rasta te one tretirane EGF pokazale su istu fluorescenciju. Rezultati su pokazali da stanice stimulirane TGF- α , amfiredulinom, epiregulinom, epigenom i betacelulinom imaju smanjenu fluorescenciju u odnosu na ne tretirane stanice i stanice tretirane s EGF, dok je kod stanica tretiranih HB-EGF primjećena fluorescencija (Sinclair i sur., 2018). Kako bi se potakla stabilizacija receptora, ligandi se vežu na mjesto koje je udaljeno od mjesta gdje dimeri stupaju u kontakt. EGF se veže između prve i treće domene EGFR. Struktura EGF podijeljena je u 3 petlje, A, B i C koje su odvojene disulfidnim vezama. Postoje mjesta za koja se EGF veže u molekuli receptora, jedno se nalazi u domeni I, a drugo i treće u domeni III. Na mjestu 1 receptora aminokiseline Leu14, Tyr45, Leu69 i Leu98 stupaju u hidrofobnu interakciju s aminokiselinama Met21, Ile23 i Leu26 od EGF. Vodikove veze nalaze se između ostataka 16-18(EGFR) i 31-33 (EGF) također i Gln16 (EGFR) i Asn32 (EGF). Na mjestu 2 hidrofobne interakcije nalaze se između Val350 i Phe357 (EGFR) s Leu15 i Tyr13 (EGF), te Asp355 veže Arg41 (EGF). Arg41 (EGF) van der Waalsovima interakcijama veže Tyr13 (EGF) i Phe357 (EGFR). Na mjestu 3 hidrofobne interakcije su između Leu382, Phe412, i Ile438 (EGFR) i Leu47 (EGF) te vodikove veze između Gln384 (EGFR) Gln43 i Arg45 (EGF). Iako spada u porodicu EGF čimbenika rasta, B-petlja TGF- α drukčije je konformacije te neće stupiti u kontakt sa mjestom 1 u receptoru, dok će interakcije s mjestom 2 i 3 biti veoma slične. Kako bi ipak došlo do kontakta B-petlje i mjesta 1, TGF- α potrebne su konformacijske promjene uslijed vezanja za receptor (Ogiso i sur., 2002). Veze koje ostvaruje EGF s vanstaničnom domenom EGFR drukčije su od onih koje ostvaruje TGF- α čime se da zaključiti da će konformacija vanstanične domene biti drukčija. Asn12 (EGFR) veže se s Gly40 (TGF- α), vodikova veza nalazi se između Thr15 (EGFR) i Ala42 (TGF- α). Niz hidrofilnih i elektrostatskih interakcija između Tyr45, Tyr89, Glu90, Tyr101, Arg125, Asn 128 (EGFR) i His4, Arg22, Gln26, Glu27 i Lys29 (TGF- α). Vezno mjesto liganda i receptora isprepliće se hidrofilnim i hidrofobnim interakcijama, Phe357 (EGFR) i Phe15 (TGF- α), Phe15 i Phe17 (EGFR) s Arg42 (TGF- α), Leu325, Leu328, Val350

(EGFR) i Phe17 i Glu24 (TGF- α) te 4 histidina vezana hidrofilnim interakcijama His409, His346 (EGFR) i His18, His45 (TGF- α) (Garret i sur., 2002).

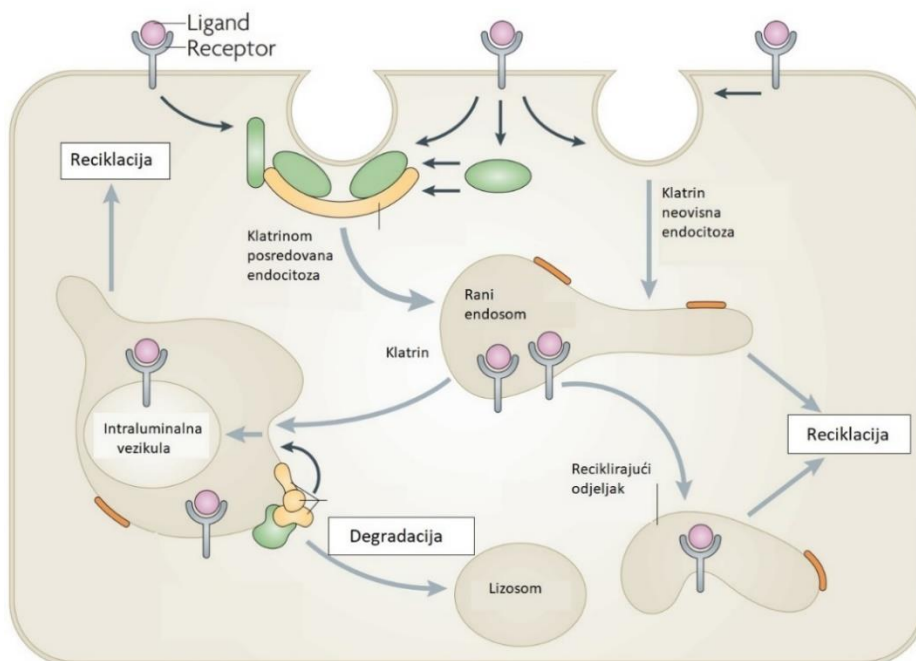
2.1.4 Linkeri

Fuzioniranje različitih proteina odvija se sa svrhom kreiranja molekule s novim, multifunkcionalnim, svojstvima. Ovakve fuzionirane molekule imaju primjenu u mnogim biološkim područjima. Dvije su važne stavke pri kreiranju fuzioniranih proteina, a to su linker i proteini od interesa. Važno je odabrati odgovarajući linker kako bi protein imao ispravnu biološku aktivnost i konformaciju. Kako bi struktura linkera ostala fleksibilna, preferira se korištenje malih aminokiselina poput glicina i serina. Ove aminokiseline ostvaruju vodikove veze s vodom čime daju stabilnost linkeru. Fleksibilni linkeri najčešće se sastoje od (GS)_n slijedova, ovisno o tome kolika dužina linkera je potrebna (Chen i sur., 2013).

2.1.5 Endocitoza

Način na koji EGFR ulazi u stanicu je klatrin posredovanom endocitozom. Receptor se smješta u specifična područja na membrani zvana klatrinom obavijeni mjehurići (*engl. clatrin coated pits*). Nastaje vezikula obložena klatrinom koja ulazi u stanicu i fuzionira sa ranim endosomom. Receptor se nakon ulaska u stanicu može reciklirati natrag na plazma membranu ili degradirati u lizosomu (Slika 4.). Važan protein za endocitozu i sortiranje EGF receptora je ubikvitin. Pomisao na ubikvitinaciju asocira na degradiranje u proteasomima, no ova post-translacijska modifikacija ima ulogu i u endocitozi. Cbl je ubikvitin ligaza važna za endocitozu EGFR vežući se na fosforilirani Y1045 ili preko Grb2. Receptor iz ranog endosoma prelazi u kasni, pri čemu dolazi do promjene pH, od same plazma membrane preko endosoma pa do lizosoma. Receptori sa vezanim različitim ligandima nakon endocitoze imaju različitu sudbinu sortiranja. Receptor sa vezanim EGF je stabilan pri promjeni pH te se takav receptor degradira, no kad je vezan TGF- α , receptor je osjetljiviji na smanjeni pH te dolazi do disocijacije liganda, defosforilacije i deubikvitinacije te se receptor reciklira (Roepstorff i sur, 2008). pH pri kojem TGF- α disocira je 6.8, što odgovara pH u ranom endosomu, dok je za disocijaciju EGF potreban pH 5.9. Kako receptor više nema vezan ligand, vraća se u neaktivnu konformaciju te se na njega ne može vezati ubikvitin ligaza koja bi mu omogućila transport do lizosoma i degradaciju (Ceresa, 2011). Receptor stimuliran EGF zadržava se na plazma membrani 5-10 minuta, dok se u endosomu zadržava oko 1 sat (Wang, 2017). Osim klatrin posredovanom

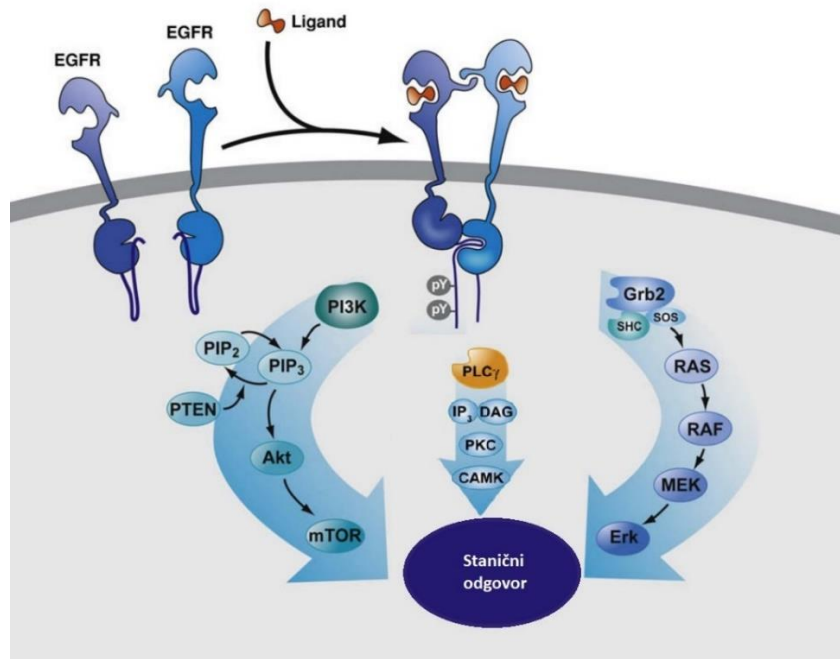
endocitozom, EGF receptor u stanicu može ući i neovisnom endocitozom uz pomoć kaveola (Roepstorff i sur, 2008). Kaveole su područja u membrani bogata kolesterolom i glikosfingolipidima koja su uvučena u obliku boce. Receptor iz kaveola izlazi tijekom 3-30 minuta, a za to je potrebna autofosforilacija barem jednog od pet tirozinskih ostataka (Waterman i Yarden, 2001). Ukoliko je receptor stimuliran većom koncentracijom EGF dio endocitoze će se odviti preko kaveola. Ipak većina dokaza upućuje na to da receptor u stanicu primarno ulazi klatrin posredovanom endocitozom (Roepstorff i sur, 2008). Signaliziranje receptora odvija se i iz kaveolinskih vezikula, ali i iz endosoma što ukazuje na to da se signalizacija nastavlja i nakon internalizacije (Waterman i Yarden, 2001).



Slika 4. Klatrinom posredovana endocitoza i klatrin neovisna endocitoza receptora (Sorkin i von Zastrow, 2009)

2.1.6 Nizvodni signalni putevi

Signalni putevi koji se aktiviraju kao rezultat dimerizacije ErbB receptora su fosfatidilinozitol 3-kinazni (PI3K)/Akt, Ras/Raf/MEK/ERK1/2 i fosfolipaza C (Slika 5). Aktivacija ovih puteva ima ulogu u proliferaciji, angiogenezi, adheziji stanica, razvoju i organogenezi (Roskoski, 2014).



Slika 5. Nizvodni signalni putevi ErbB receptora (Pines i sur., 2010)

2.1.6.1 RAS-RAF-MEK-ERK MAPK

Grb2 sadrži SH2 domenu pomoću koje se veže na fosforilirane tirozinske ostatke aktiviranog EGFR, točnije na Y1068 i Y1086. Shc veže se na Y1148 i Y1173 aktiviranog EGFR pomoću SH2 domene ili PTB domene. Grb2 se veže na fosforilirani Shc i na Sos1 koji je faktor odgovoran za izmjenu nukleotida gvanina za Ras čime ga i aktivira gdje pritom iz GDP-a nastaje GTP. Ras stupa u interakciju sa Raf-1 koji aktivira MEK1/2 koji potom fosforilira ERK1/2. Mjesto za vezanje proteina adaptora Grb2 i Shc otkriva se uslijed transfosforilacije receptora. Grb2 također ima i ulogu u dovođenju Sos proteina do plazma membrane te veže proteine Cbl E3 ligazu i Cin85 koji su uključeni u transport EGFR, a imaju ulogu u internalizaciji i sortiranju u lizosomu. Sos je odgovoran za izmjenu GTP-a u GDP čime se konformacija Ras proteina mijenja te on postaje aktivan, a inaktivirati se može GTPaznom aktivnošću Nfl proteina te fosforilacijom na Y32 koja je posredovana Src kinazom, a onemogućuje vezanje Ras na Raf-1. Mogućnost defosforilacije pY32 ima fosfataza Shp2 te se smatra aktivatorom Ras. Osim aktivacije Raf-1, Ras aktivira i PI3K i RalGDS. Pošto Ras ima mogućnost aktivacije mnogih nizvodnih efektor, mutacije u genima koji kodiraju za Ras su česta pojava u mnogim tumorima te je Ras protein meta mnogih istraživanja za razvoj protutumorskih lijekova. Raf je protein koji se u signalnom putu MAPK nalazi nizvodno od

Ras. Na C-terminalnom kraju ima kinaznu domenu, a na N-terminalnom kraju regulatornu domenu. Raf se translocira na plazma membranu uslijed djelovanja Ras proteina. Kada se Raf aktivira dolazi do fosforilacije S338 i Y341. Nizvodno od Raf-1 nalaze se MEK1 i MEK2 koje on aktivira, a oni aktiviraju ERK1/2 koji se najčešće aktiviraju zajedno. ERK ima više nizvodnih supstrata, dio ih se nalazi u citosolu, a za dio se transportira u jezgru (Wee i Wang, 2017).

2.1.6.2 *PI3K-Akt-mTOR*

Ulogu u kontroli metabolizma, proliferacije i preživljenja stanice ima signalni put PI3K-Akt-mTOR. Promjene u ovom signalnom putu česta su pojava u tumorima, ali i dijabetesu i autizmu. PI3K se sastoji od 2 podjedinice, regulatorne p85 i katalitičke p110. p85 podjedinica ima ulogu u vezanju na receptor, a p110 fosforilira 3-OH skupinu membranskog lipida PIP₂ čime nastaje PIP₃. PI3K se može vezati sa sva 4 člana ErbB obitelji, ali sa ErbB3/4 se veže direktno, gdje p85 podjedinica prepoznaje motiv prisutan samo u ErbB3/4, dok kod ErbB1/2 postoji dodatni protein adaptor Gab1 preko kojeg se veže PI3K. Preko p110 podjedinice PI3K se može vezati i sa Ras proteinom. Akt je serin/treonin kinaza koja se aktivira pomoću 2 mehanizma i jedan je od nizvodnih efektora PI3K. Prvo ga je potrebno translocirati na plazma membranu gdje ulogu ima aktivirani EGFR, a potom dolazi do fosforilacije na T308 i S473. Obe fosforilacije su potrebne kako bi došlo do potpune aktivacije. Akt ima ulogu u proliferaciji, metabolizmu, migraciji, sintezi proteina i preživljenju stanice. Akt ima 3 izoforme, Akt1, Akt2 i Akt3, od kojih su Akt1/2 široko eksprimirani i bolje proučeni nego Akt3. Akt2 je važan za metabolizam glukoze, no gubitak jedne izoforme se ne može kompenzirati s ostale dvije. Prekomjerna ekspresija nekih od izoformi pronađena je u različitim tipovima tumora. Akt ima ulogu u signaliziranju mTOR, a mTOR dobiva signale i od Ras i PI3K. mTOR se sastoji od dva kompleksa: mTORC1 i mTORC2. mTORC1 fosforilira 4E-BP koji je inhibitor translacijske inhibicije i S6K (p70 S6 kinazu) koji je aktivator translacije (Wee i Wang, 2017).

2.1.6.3 *PLC- γ 1-PKC signalni put*

PLC- γ 1 ima SH2 domenu pomoću koje se veže na aktivni EGFR na Y992 i Y1173. može vezati i PIP₃ kako bi došao do plazma membrane. Za aktivnost PLC- γ 1 odgovorna je fosforilacija 5 tirozina. PLC- γ 1 hidrolizira PIP₂ do unutarstaničnog 1,4,5-trifosfata i

diacilglicerola. DAG i oslobođeni kalcij, nastao uslijed vezanja IP3 na receptor na endoplazmatskom retikulumu, aktiviraju protein kinazu C (PKC). PKC ima mnoge supstrate, EGFR, RAF-1, H-RAS, fosfolipazu D (Wee i Wang, 2017).

2.1.7 Negativna regulacija EGFR

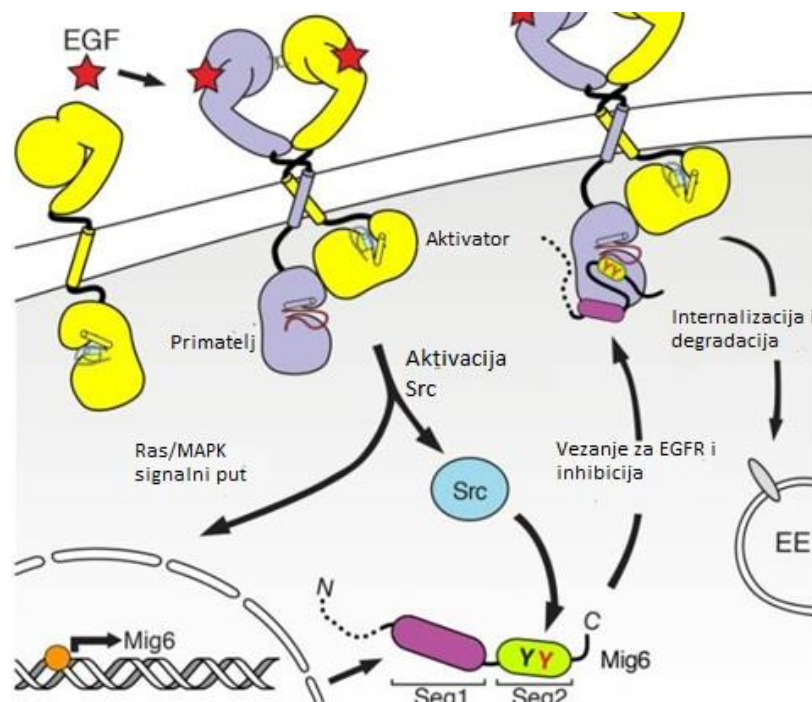
Negativni regulator EGFR je c-CBL i odgovoran je za degradaciju receptora, no ujedno i endocitozu (Wee i Wang, 2018). Pokazalo se da cbl djeluje kao negativni regulator nizvodne signalizacije aktiviranog receptora (Mohapatra i sur., 2013), djelujući kao ubikvitin protein ligaza -E3 (Burke i sur, 2001), te ukoliko je deletiran, signalni putevi su znatno duže aktivni. Gašenje signala rezultat je degradacije receptora u lizosomu, suprotno od toga, njegova reciklacija na površinu membrane će produžiti signalizaciju (Mohapatra i sur., 2013).

Još jednu skupinu negativnih regulatora čine tirozin fosfataze koje defosforiliraju EGFR. TCPTP se aktivira interakcijom s integrinom te je rezultat smanjena fosforilacija receptora nakon stimulacije s EGF (Mattila i sur., 2004).

2.1.7.1 Mig6

Za negativni regulator EGFR, Mig6, kodira mitogen inducirajući gen 6, odnosno *ERRFII*, koji se nalazi na 1p36 kromosomu, a eksprimira se zahvaljujući Ras/MAPK signalnom kinaznom putu. To je protein koji se nalazi u citosolu i veže se na receptore ErbB obitelji te djeluje kao inhibitor katalitičke aktivnosti. Sastoji se od N i C terminalne domene, od kojih je C-terminalna domena odgovorna za vezanje na ErbB receptore. Dijeli se na dva segmenta, aminokiselinski ostaci 336-364 nazivaju se segment 1, koji se veže na EGFR i onemogućava formiranje aktivnog dimera, dok se za segment 2, aminokiselinski ostaci 365-412, zna da doprinosi kompletnoj inhibiciji, no točan mehanizam još nije poznat. Mig6 se fosforilira na dva mjesta, Y394 i Y395, oba se nalaze u segmentu 2. Y395 je prvo mjesto fosforilacije, a vrši je kinaza Src, koju aktivira EGFR, što dovodi do ubrzane fosforilacije Y394 od strane EGFR za koji Mig6 ostaje vezan. Ukoliko se aktivnost Src smanji, npr. korištenjem shRNA, primjećena je smanjena fosforilacija Y394. Postoji mogućnost da osim Src kinaze postoje i druge kinaze koje utječu na ovu fosforilaciju. Fosforilacijom u segmentu 2 dolazi do vezanja Mig6 na peptid supstrat-vezno mjesto uslijed formiranja strukture β -ukosnice segmenta 2, a segment 1 stupa u interakciju s C-režnjem kinaze aktivnog receptora. Mig6 se

veže na kinazu receptora primatelja čime mu spjerečava mogućnost da postane aktivator (Slika 6.) (Park i sur, 2015). Zbog postojanja konzerviranih ostataka EGFR na mjestu vezanja Mig6 omogućuje ovom inhibitoru vezanje i za druge članove ErbB obitelji (Zhang i sur, 2007). Neki tumori, najčeće glioblastomi, imaju deletiran *ERFFII* gen, što u konačnici rezultira većom aktivnošću EGFR pogotovo u tumorima sa njegovom prekomjernom ekspresijom. Zanimljivo je spomenuti da je u jednom istraživanju, 27% tumora sadržavalo deleciju *ERFFII* i amplifikaciju EGFR. Pojava mutacija dva gena istog signalnog puta nije česta pojava (Park i sur, 2015).



Slika 6. Inhibicija EGF receptora proteinom Mig6 (Park i sur, 2015)

2.1.8 ErbB i tumori

Različiti tipovi tumora favoriziraju različite mutacije u domenama EGFR. Mutacije u kinaznoj domeni najčešće su prisutne u tumoru pluća nemalih stanica (*engl. non small cell lung cancer NSCLC*) uz prekomjernu ekspresiju. Aberacije u vanstaničnoj domeni vidljive su kod glioblastoma, najčešće je to delecija egzona 2-7, takav mutant izražava signaliziranje neovisno o ligandu. Kod brojnih tumora primjećena je prekomjerna ekspresija EGFR, posljedica toga je amplifikacija *EGFR* gena. Prekomjerno eksprimirani receptori imaju sposobnost aktivacije bez prisustva liganda. U stanici postoje fosfataze koje defosforiliraju autofosforilirane tirozine,

ukoliko je receptor prekomjerno eksprimiran fosfataze neće defosforilirati svaki receptor te je onda rezultat povećana aktivacija i fosforilacija (Purba i sur., 2017). Regulatorne regije poput α C heliksa, aktivacijske petlje i ATP vezujuće petlje su meta mutacija koje su onkogeno aktivne i uzrokuju pojačanu aktivaciju receptora ili destabilizaciju inaktivnog receptora (Roskoski, 2019). Amplifikacija gena receptora za epidermalni faktor rasta rezultira prekomjernom ekspresijom, mutacijama u kinaznoj domeni i delecijama. 10-40% tumora pluća imaju mutirani EGFR, dok je prekomjerna ekspresija EGFR prisutna u 60% tumora pluća nemalih stanica, a kod tumora dojke to je slučaj sa ErbB2 u 20-30%. Prekomjerna ekspresija ErbB3 pronađena je u mnogih tumorima poput tumora prostate, cerviksa, glave i vrata (Wang, 2017). U Tablici 1 naveden je postotak prekomjerne ekspresije EGFR u određenim tumorima.

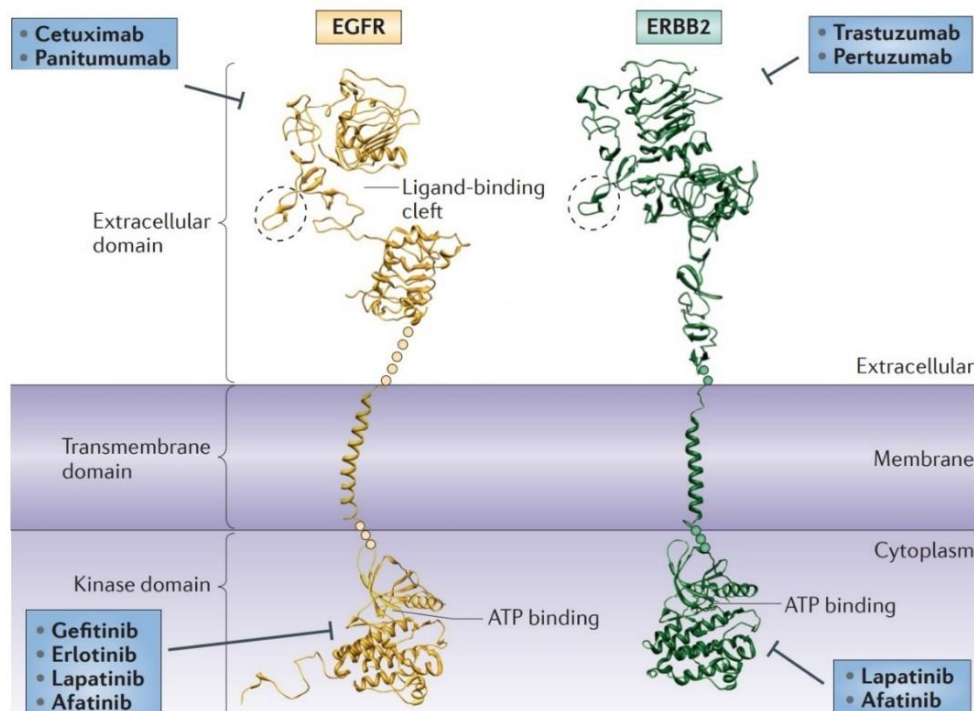
Tablica 1. Povećana ekspresija EGFR u tumorima (Bonner i sur., 2000).

Tip tumora	% prekomjerne ekspresije EGFR
Gliom	40-60
Kolon	50
Glava i vrat	90-100
Pluća	45-84
Gušterača	22-60
Prostata	60-89

Najčešća ErbB2 mutacija u tumorima je L834R u kinaznoj domeni što čini receptor konstitutivno aktivnim te potiče dimerizaciju. Pojava druge mutacije T766M u kinaznoj domeni povećava afinitet već postojećeg mutanta EGFR L834R za ATP u odnosu inhibitore koji se koriste kao lijekovi što rezultira pojavom rezistencije. Ove onkogene forme EGF receptora u oboljelih od tumora uz prisutnost receptora divljeg tipa najčešće zauzimaju poziciju primatelja (Kovacs i sur, 2015).

Razvijeni su lijekovi koji djeluju kao tirozin kinazni inhibitori od kojih su najpoznatiji Gefinitib i Erlotinib (Slika 8.), no većinom pacijenti nakon 10-13 mjeseci razviju rezistenciju. (Roskoski, 2019). Ova dva lijeka spadaju pod tirozin kinazne inhibitore prve generacije, vežu se reverzibilno za kinaznu domenu mutiranih varijanti EGFR, ali dijelom i divljeg tipa. Inhibiraju autofosforilaciju tako što se natječu za vezno mjesto s ATP-om. Jedna od češćih mutacija koja je odgovorna za rezistenciju je T790M jer povećava afinitet EGFR za ATP-om.

Druga generacija lijekova poput Afatiniba i Dacomitiniba ireverzibilno se vežu te mogu djelovati kao inhibitori za više ErbB receptora (Slika 7.). No i ovi lijekovi podliježu razvoju rezistencija. Osmertinib je treća generacija tirozin kinaznih inhibitora koji nadilazi najčešću T790M mutaciju, no ipak neke rezistencije postoje (Shah i Lester, 2019). Dokazi pokazuju da kod pacijenata koji imaju prekomjerno ekspimirani divlji tip EGFR dolazi do aktivacije receptora uslijed visoke koncentracije, osim toga prisutnost liganada u fiziološkim uvjetima također pridonosi aktivaciji receptora. Tirozin kinazni inhibitori su se pokazali djelotvorni kod ovakvih tumora, a to su prvenstveno tumori pluća (Xu i sur., 2016). Monoklonalna protutijela još su jedna vrsta inhibitora EGFR čime se blokira stanična migracija i invazija, a samim time i metastaze tumora. Monoklonalna protutijela koja se koriste u liječenju ErbB tumora su Cetuximab i Panitumumab (Slika 7.). Ovi lijekovi imaju protu-tumorsku aktivnost tako da se vežu na receptor sa visokim afinitetom i sprječavaju vezanje liganda, a potiču internalizaciju receptora. Herceptin, odnosno Trastuzumab je još jedno monoklonalno protutijelo koje inhibira nizvodnu signalizaciju i dovodi do apoptoze tumorskih stanica (Appert-Collin i sur., 2015). Kako bi se povećala uspješnost terapije i nadilaženje rezistencija koristi se kombinacija tirozin kinaznih inhibitora i monoklonalnih protutijela zbog njihovog različitog mehanizma djelovanja. Vezanje protutijela može smanjiti ponovnu aktivaciju receptora do koje može doći ako reverzibilno vezan tirozin kinazni inhibitor zamjeni mjesto s ATP što će u konačnici rezultirati manjom fosforilacijom i aktivacijom nizvodnih signalnih puteva. Također ovakva kombinacija TKI i protutijela smanjuje heterodimerizaciju receptora, no smatra se da kombinacija dva protutijela bolje utječe na sprječavanje heterodimerizacije, samim time i fosforilacije i aktivacije receptora (Tebbutt i sur., 2013).



Slika 7. Mjesta vezanja tirozin kinaznih inhibitora i monoklonalnih protutijela (Tebbutt i sur., 2013)

Najnovija generacija lijekova temelji se na alosteričkim inhibitorima koji se vežu na alosteričko mjesto koje se razlikuje od ATP-veznog mjesta koje je meta do sada poznatih tirozin kinaznih inhibitora (To i sur., 2019). Alosterički inhibitori imaju najveću razinu selektivnosti jer se specifično vežu za kinaze i uzrokuju ciljne konformacijske promjene, sprječavajući kinaznu funkciju (Metibemu i sur., 2019), dok kod tirozin kinaznih inhibitora ne postoji tolika specifičnost, stoga postoji mogućnost da će takav inhibitor, u manjoj mjeri, moći inhibirati i druge kinaze (Broekman i sur., 2011). Mutacije koje nastaju kao rezistencija na tirozin kinazne inhibitore ne nalaze se u alosteričkom mjestu stoga ovi inhibitori daju nadu za uspješnije liječenje tumora sa mutacijama u EGFR (To i sur., 2019). Alosterički inhibitor EAI001 uspješno se veže za EGFR koji nosi T790M mutaciju. Selektivnost za T790M mutaciju može se objasniti tako što se aminotiazolna skupina alosteričkog inhibitora veže s mutiranim metioninom. EAI045 je inhibirao proliferaciju stanica koje su nosile L858R/T790M mutaciju, ali nije u potpunosti inhibirao autofosforilaciju receptora (Jia i sur., 2016). EAI045 se veže na alosteričko mjesto u mutantu L858R gdje Arg858 dovodi do otvaranja alosteričkog džepa. Kod alosteričkog inhibitora JBJ-04-125-02 pokazalo se da bolje djeluje u kombinaciji s TKI Osimertinib (Du i sur., 2021).

Kao posljedica rezistencije na tirozin kinazne inhibitore primjećena je amplifikacija ErbB2 gena kod pacijenata oboljelih od NSCLC. Povećana aktivacija ErbB3 receptora koji iako nema aktivnu kinaznu domenu, stvarajući heterodimere može kompenzirati inhibirane EGFR i ErBb2, aktivirajući nizvodne signalne puteve, točnije PI3K/Akt (Liu i sur., 2018). Ukoliko se pojave mutacije u nekim od signalnih puteva, to može dovesti do pojačane aktivacije, kao npr. aktivirajuće mutacije Akt u p110 podjedinici. Neki tumori imaju i smanjene razine PTEN fosfataze koja je odgovorna za defosforilaciju PIP3 čime se smanjuje PI3K aktivacija (Hynes i MacDonald, 2009). Mutacije u nekom od Ras gena su česta pojava u tumorima, a rezultat je hiperaktivacija Ras/MAPK signalnog puta. Najčešće je mutiran BRAF u melanomu i to mutacija V600E (Poulikakos i Rosen, 2011).

Tumori često ekspimiraju heterogene ligande. Prekomjerna heterogena ekspresija liganada zamijećena je kod glioblastoma, a to su EGF, TGF- α , HB-EGF, betacelulin i epiregulin. EGFR može ući u jezgru glioma stanica gdje može fosforilirati druge supstrate jer se pretpostavlja da zadržava kinaznu aktivnost (von Achenbach i sur., 2018). Istraživanje je pokazalo da pacijenti oboljeli od tumora želuca sa visokom ekspresijom EGFR često imaju i povišenu ekspresiju amfiregulina i epiregulina, dok oni sa visokom ekspresijom ErbB2 imaju veću ekspresiju TGF- α , HB-EGF i epiregulina (Byeon i sur., 2017). U drugom istraživanju tumora kolorektuma kod 44% pacijenata primjećena je pojava divljeg tipa EGFR, te povećana ekspresija nekih liganada, betacelulin 72%, epigen 67%, TGF 58%, amfiregulin 58% i EGF 31% (Khelwatty i sur., 2017).

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Stanična linija

CHO-K1 (Chinese hamster ovary) stanična linija izolirana biopsijom jajnika kineskog hrčka koja ne eksprimira EGFR.

Stanice su održavane na 10-90% konfluentnosti na 37 °C, 5% CO₂ u inkubatoru. Stanice su uzgajane u DMEM mediju kojem je dodano 10% FBS.

3.1.2 Bakterijski soj

Escherichia coli, soj **DH5α**

3.1.3 DNA konstrukti

Tablica 2. DNA konstrukti korišteni u istraživanju

KONSTRUKT

EGFR WT	Segatto O. i Anastasi S.
ERBB2 WT	Segatto O. i Anastasi S.
MIG6 WT	Segatto O. i Anastasi S.
EGFR V924R	Zhang i sur.
EGFR I682Q	Zhang i sur.

3.1.4 Medij

- Bakterijska kultura

LB medij za bakterije (1.0% bacto. tryptone, 0.5% ekstrakt kvasca, 0.5% NaCl u ddH₂O)

LB agar (1.0% bacto. tryptone, 0.5% ekstrakt kvasca, 0.5% NaCl, 0.5% agar u ddH₂O);

Selekcija uz pomoć antibiotika ampicilina

- Stanična kultura

Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM + 10% FBS

3.1.5 Kemikalije

2-Merkaptoetanol(Sigma Aldrich)

N,N,N',N'-Tetrametil-etilenediamin (Sigma Aldrich)

Protein G-agaroz (Sigma Aldrich)

Proteazni inhibitor cOmplete Tablets (Roche)

Fosfatazni inhibitor PhosSTOP (Roche)

BSA-Albumin govedeg seruma (Roth)

Akril amid (AppliChem)

NP-40 (Fluka)

4-jodofenilboronična kiselina (Aldrich)

Luminol (Sigma Aldrich)

Natrijev ortovanadat (Aldrich)

Bromofenol plavo (Sigma Aldrich)

Natrijev fluorid (Fluka)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma Aldrich)

Nitrocelulozna transfer membrana (GVS)

Metanol (J.T.Baker)

PVDF transfer membrana (Carl Roth)

Proteinski marker (Bio Rad)

Tween (Roth)

Etanol (J.T.Baker)

FBS-Fetal bovine serum (Capricorn Scientific)

3.1.6 Puferske otopine

1X TBS pufer pripremljen iz koncentrirane otopine 10X (500 mM Tris, 1.5 M NaCl, pH 7.5 u ddH₂O)

1X pufer za elektroforezu („running buffer“) pripremljen iz koncentrirane otopine 10X (250 mM Tris, 2 M glicin, 1% SDS u ddH₂O)

1X pufer za prijenos („transfer buffer“) pripremljen iz koncentrirane otopine 10X (250 mM Tris, 2 M glicin, 20% v/v metanol u ddH₂O)

1X PBS napravljen iz 10X koncentrirane otopine (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ x 7H₂O, 2.0mM KH₂PO₄)

4X Tris-HCl/SDS pufer za separacijski gel pH 8.8 (1.5 M Tris, 0.4% SDS u ddH₂O)

4X Tris-HCl/SDS pufer za gel za sabijanje pH 6.8 (0.5 M Tris, 0.4% SDS u ddH₂O)

TBS+Tween-BSA pufer za blokiranje (5% BSA, 10X TBS, 0.05% Tween u ddH₂O)

Pufer za ispiranje (10X TBS, 0.05% Tween u ddH₂O)

Pufer za lizu stanica

5X Leamli pufer za nanošenje uzoraka (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 30% glicerol, 6% β-merkaptotanol, 0.02% bromofenol plavo)

3.1.7 Uređaji i programi

Centrifuga Heraous Fresco 17 centrifuge (Thermo Fisher Scientific)

Centrifuga miniSpin (Eppendorf)

Inkubator Hereaus Hera Cell 150i (Thermo Fisher Scientific)

Uređaj za elektroforezu PowerPac Basic Power Supply (Bio Rad)

Chemi Doc XRS+ (program: Image Lab™ 6.0.1) (Bio Rad)

Thermo block TBD-120 (Biosan)

NanoDrop 1000 Spektrofotometar (Thermo Scientific)

Vortex genie 2 (Scientific Industries)

See-saw rocker SSL4 (Stuart)

Vaga (Mettler Toledo)

PyMOL program

3.1.8 Protutijela

Tablica 3. Primarna protutijela korištena u istraživanju

PROTUTIJELO	KATALOŠKI BROJ	PROIZVEDENO U	PROIZVOĐAČ
PHOSPHO-EGF RECEPTOR (THYR1173)	#4407	zec	Cell Signaling
PHOSPHO-EGF RECEPTOR (THYR1068)	#2234	zec	Cell Signaling
PHOSPHO-P44/42 MAPK (ERK1/2) (THR202/TYR204)	#9101	zec	Cell Signaling
PHOSPHO-TYROSINE (P-TYR-100)	#9411	miš	Cell Signaling
EGF RECEPTOR	#2232	zec	Cell Signaling
MYC-TAG	#2276	miš	Cell Signaling

HER2/ERBB2	#4290	zec	Cell Signaling
-------------------	-------	-----	----------------

Razrijeđeno 1:1000 u 5 % BSA+TBST

Tablica 4. Sekundarna protutijela korištena u istraživanju

PROTUTIJELO	
ANTI-ZEC	(Dako, P0448)
ANTI-MIŠ	(Bio Rad, 170-6516)

Razrijeđeno 1:4000 u 5 % BSA+TBST

3.1.9 Ligandi

Tablica 5. Ligandi korišteni u istraživanju

LIGAND	KATALOŠKI BROJ	PROIZVOĐAČ
HUMANI EGF	AF-100-15-100UG	PeptoTech
HUMANI TGF-ALFA	AF-100-16A-20UG	PeptoTech

3.1.10 Kompleti

QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen)

jetOPTIMUS Transfection Kit (Polyplus)

3.2 METODE

3.2.1 Transformacija kompetentnih bakterija soja DH5 α *heat shock* metodom

Kompetentne DH5 α bakterije su transformirane s gore navedenim plazmidima. 200 ng plazmidne DNA je dodano u 100 μ l kompetentnih bakterija i inkubirano na ledu 10 min. Slijedeći korak je zagrijavanje na 42 °C 45 s te ponovno hlađenje na ledu 2 min. Dodano je 200 μ l LB medija i stavljeno na 37 °C 30 min. Transformirane bakterije stavljene su na ploče s LB agarom i ampicilinom preko noći na 37 °C.

Jedna kolonija s LB agar ploče inokulira se u 5 mL LB medija s 5 μ l ampicilina i stavi na 37 °C i 220 rpm. Nakon što bakterije porastu prebacuje se u veću tikvicu sa 150 mL LB medija + 150 μ l ampicilina preko noći na 37 °C i 220 rpm.

3.2.2 Izolacija plazmidne DNA

Za izolaciju plazmidne DNA korišten je QIAfilter Plasmid Midi Kit prema preporučenim uputama proizvođača. Koncentracija izolirane DNA mjerena je s NanoDrop spektrofotometrom.

3.2.3 Transfekcija CHO-K1 stanica

Transfekcijom se u eukariotske stanice unosi nukleinska kiselina. Transfekcija je provedena korištenjem *jetOPTIMUS* Transfection Kit.

CHO-K1 stanice nasadene su na 10 cm ploču s DMEM medijem i inkubirane na 37 °C, 5% CO₂ u inkubatoru za stanične kulture s kontrolom ugljičnog dioksida. Pri konfluentnosti od 70-80% stanice su transfektirane i/ili ko-transfektirane s gore navedenim konstruktima. Korišteno je 200 μ l *jetPRIME* pufera i omjer 1 μ g DNA : 1 μ l *jetOPTIMUS* DNA transfekcijskog reagensa. Transfekcijska smjesa se vorteksira i spin-down te inkubira na sobnoj temperaturi 10 min. Transfektirane stanice se inkubiraju preko noći na 37 °C, 5% CO₂ u inkubatoru.

3.2.4 Stimulacija sa različitim ligandima

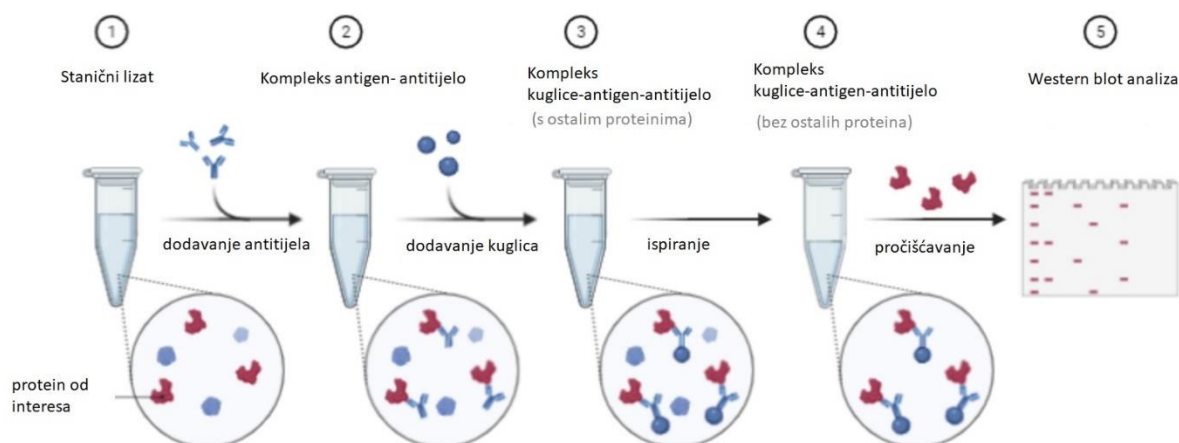
Transfektirane stanice konfluentnosti 70-80% su tripsinizirane nakon 24 h i podijeljene u 4 x 6 cm ploča. Nakon 6-8 h promijenjen je medij te ostavljeno preko noći u inkubatoru na

37 °C, 5% CO₂. Potom je stavljen medij bez dodanog FBS kako bi se stanice izgladnjivale i ugasile stanične signale kroz 5-6 h. Stanice su stimulirane sa 50 ng EGF ili TGF- α na 5, 15 i 30 min.

3.2.5 Imunoprecipitacija i priprema uzorka za proteinsku elektroforezu

Transfektirane stanice koje eksprimiraju protein od interesa potrebno je lizirati. Nakon tretmana sa čimbenicima rasta, potrebno je ukloniti medij i isprati sa 1X PBS i dodati 300 μ l pufera za liziranje stanica (NaCl, EDTA, NP-40 + inhibitor proteaza i fosfataza). Stanice su skupljene u 1.5 mL tubicu i centrifugirane na 4 °C, 12 000 x g 15 min. Supernatant sa proteinima je prebačen u novu ohlađenu 1.5 mL tubicu.

2/3 staničnog lizata odvojeno je za imunoprecipitaciju, a ostatak je korišten kao ukupni stanični lizat. 2 μ l protutijela je pomiješano s protein G-agaroznim kuglicama zajedno sa staničnim lizatom na uz miješanje na orbitalnoj tresilici pri 4 °C preko noći. Imunoprecipitacijski kompleks je ispran 3 puta sa puferom za liziranje stanica bez dodanih inhibitora i resuspendiran u 25 μ l 3X Laemmli puferu i inkubiran na 95 °C 5 min kako bi se prekinule nekovalentne veze te kako bi se precipitirani proteini odvojili od agaroznih kuglica. Preostali ukupni stanični lizat pomiješan je s 5X Laemmli puferom te inkubiran na 95 °C 5 min (Slika 8.)



Slika 8. Shematski prikaz imunoprecipitacije (preuzeto s <https://app.biorender.com/>)

3.2.6 Western blot

Proteini su razdvojeni SDS-PAGE elektroforezom, gdje SDS kao detergent uklanja naboj proteina te se oni razdvajaju prema veličini, odnosno masi. Proteini su razdvajani u gradijentnom 6-15% gelu.

Tablica 6. Separacijski 6-15% gel

SEPARACIJSKI GEL	6%	15%
AKRILAMID (40%)	1.5 mL	3.75 mL
4X TRIS-HCL/SDS PUFER PH 8.8	2.5 mL	2.5 mL
DDH₂O	6 mL	3.75 mL
APS	50 µL	50 µL
TEMED	20 µL	20 µL

Tablica 7. Gel za sabijanje

GEL ZA SABIJANJE	
AKRILAMID (40%)	900 µL
4X TRIS-HCL/SDS PUFER PH 6.8	1.875 mL
DDH₂O	4.65 mL
APS	45 µL
TEMED	15 µL

Elektroforeza se odvijala 65 min na 30 mA/gel. Prijenos razdvojenih proteina na gelu vršio se na PVDF (poliviniliden fluorid) membranu prethodno tretiranu 100% metanolom 5 min. Mokri prijenos u kojem je uključeno slaganje "sendviča" gdje se gel i membrana nalaze između filter papira, a s obje strane nalaze se spužvice i sve se odvija u kadici ispunjenoj puferom za prijenos. Prijenos proteina na membranu odvija se uz pomoć električnog polja gdje se negativno nabijeni proteini vežu na pozitivno nabijenu membranu. Prijenos se odvijao na

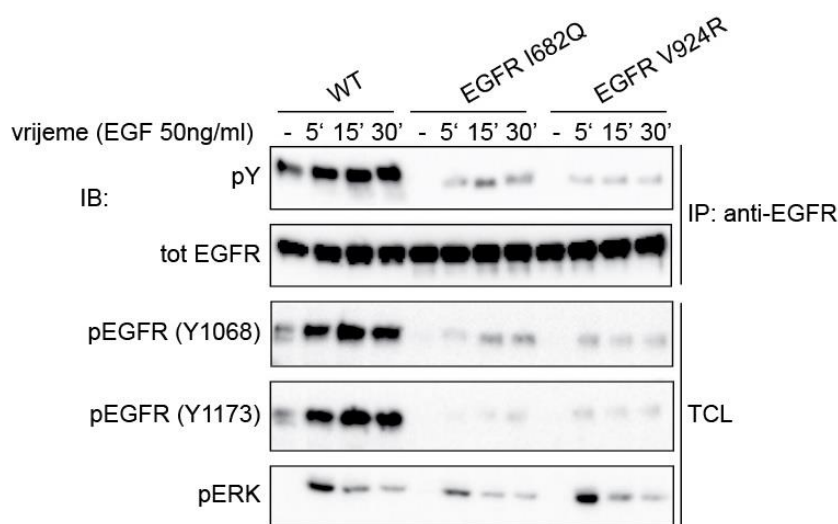
200 mA pri 90 min. Membrane se potom inkubiraju u TBST-BSA puferu za blokiranje kroz 60 min, kako bi se blokiralo nespecifično vezanje proteina na membranu. Inkubacija sa primarnim protutijelom preko noći na 4 °C. Membrane se isperu tri puta po 15 min s TBST i inkubiraju 60 min u sekundarnom protutijelu koje je konjugirano sa peroksidazom iz hrena, enzimom čiji se produkt lako detektira. Membrana se ponovno ispire tri puta po 15 min s TBST kako bi se uklonila ne vezana protutijela i smanjio pozadinski signal. Za detekciju proteina korišten je ECL reagens (1M Tris pH 8.8, 250 mM Luminol, 90 mM 4-jodofenilboronična kiselina) + 30% H₂O₂. Kemiluminiscencija analizirana je s ChemiDoc XRS+.

4 REZULTATI I RASPRAVA

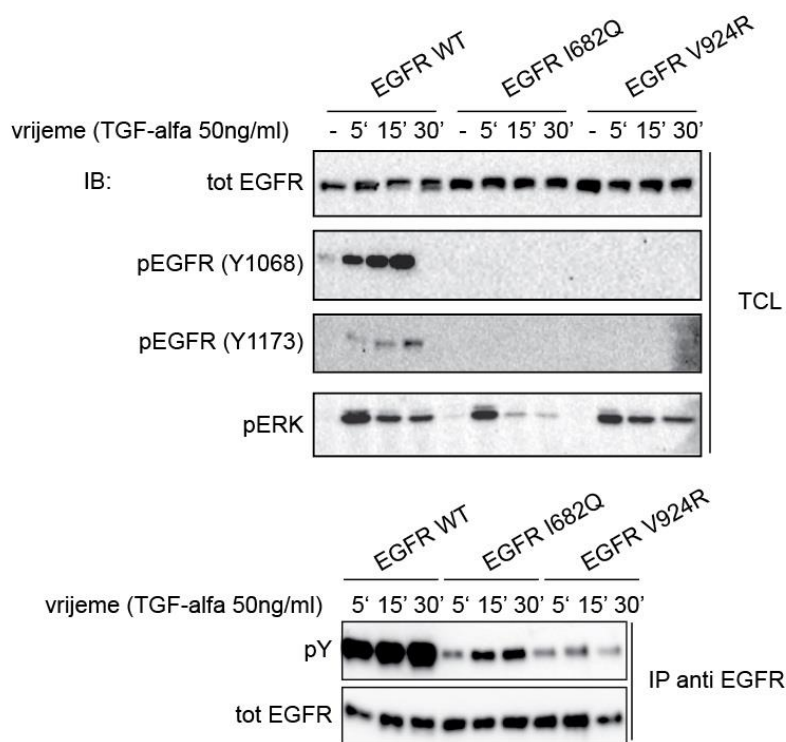
4.1 REZULTATI

4.1.1 EGFR homodimeri s vezanim različitim ligandima

Pokazano je da mutacije u kinaznoj domeni EGFR, I682Q i V924R inhibiraju formiranje funkcionalnog homodimera (Zhang i sur., 2006). Provedena je Western blot analiza proteina izoliranih iz CHO-K1 stanica transfektiranih EGFR divljim tipom (WT), mutiranim varijantama EGFR I682Q ili V924R, kako bi se pokazalo dolazi li do promjene strukturnih konformacija kinaznih domena unutar homodimera uslijed stimulacije s dva različita liganda i je li konformacija podložna promjeni tijekom internalizacije receptora.



Slika 9. Western blot imunodetekcija proteina izoliranih iz transfektiranih CHO-K1 stanica. Stanice su akutno stimulirane s EGF koncentracije 50 ng/ml. Kako bi se potvrdila transfekcija EGFR WT i mutiranim varijantama EGFR I682Q i EGFR V924R korišteno je protutijelo anti-total EGFR, za ukupnu fosforilaciju anti-total pY, za fosforilaciju specifičnih tirozinskih ostataka anti-pEGFR Y1173 i Y1068 i za aktivirani protein nizvodnog signalnog Ras/MAPK puta anti-pERK.

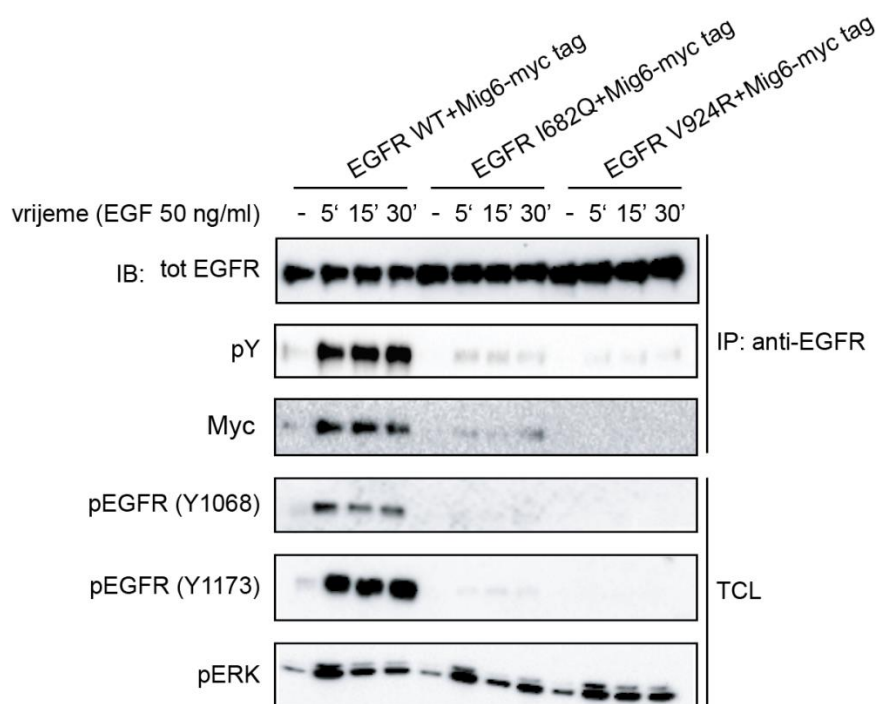


Slika 10. Western blot imunodetekcija proteina izoliranih iz transfektiranih CHO-K1 stanica. Stanice su akutno stimulirane s TGF- α koncentracije 50 ng/ml. Kako bi se potvrdila transfekcija EGFR WT i mutiranim varijantama EGFR I682Q i EGFR V924R korišteno je protutijelo anti-total EGFR, za ukupnu fosforilaciju anti-total pY, za fosforilaciju specifičnih tirozinskih ostataka anti-pEGFR Y1173 i Y1068 i za aktivirani protein nizvodnog signalnog Ras/MAPK puta anti-pERK.

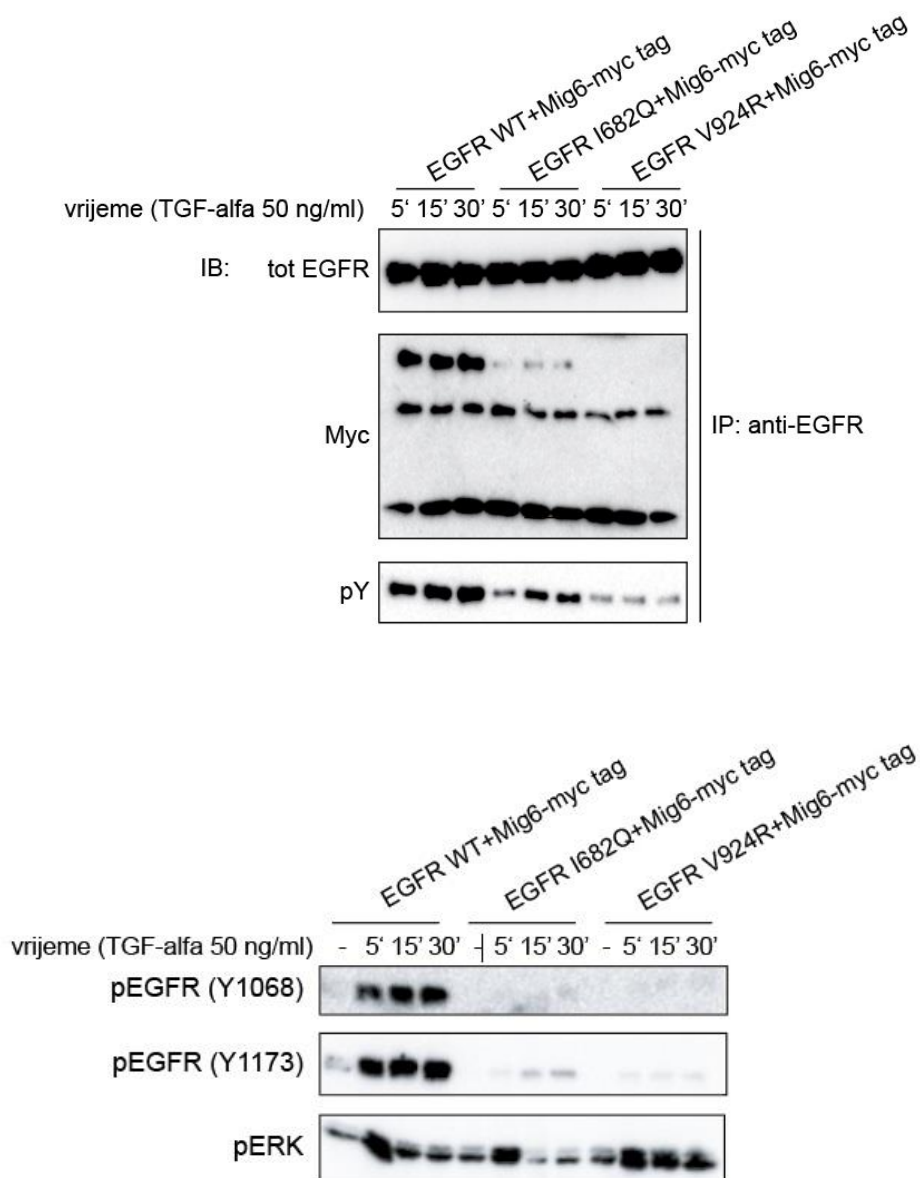
Prethodno izgladnjivane stanice (6h) tretirane su različitim ligandima (EGF ili TGF- α) koncentracije 50 ng/ml kroz vremenski period od 5, 15 i 30 min te ne tretirane. Imunodetekcijom vidljivo je da je transfekcija bila uspješna. Imunoprecipitacijom pokazano je da je divlji tip receptora fosforiliran pri stimulaciji sa EGF i TGF- α . Mutirane varijante receptora stimulirane TGF- α su fosforilirane. EGFR I682Q pokazuje veću ukupnu fosforilaciju na 15 i 30 minuta u odnosu na 5 minuta kod stimulacije s TGF- α . Vidljivo je da su specifični tirozinski ostaci divljeg tipa EGFR fosforilirani, dok to nije slučaj kod mutiranih varijanti. Nizvodni Ras/MAPK signalni put je aktiviran te se vidi da je pERK fosforiliran i to vidljivo više na 5 minuta.

4.1.2 EGFR homodimeri s vezanim različitim ligandima uz prisutnost inhibitora Mig6

Poznato je da se negativni regulator Mig6 veže za EGFR WT pri stimulaciji s EGF i TGF- α . Provedena je Western blot analiza proteina izoliranih iz CHO-K1 stanica ko-transfektiranih EGFR divljim tipom (WT), mutiranom varijantom EGFR I682Q ili V924R te negativnim regulatorom Mig6, kako bi se potvrdila interakcija Mig6 s mutiranim varijantama EGFR pri stimulaciji s dva različita liganda i je li interakcija podložna promijeni tijekom internalizacije receptora.



Slika 11. Western blot imunodetekcija proteina izoliranih iz ko-transfektiranih CHO-K1 stanica. Stanice su akutno stimulirane s EGF koncentracije 50 ng/ml. Kako bi se potvrdila transfekcija EGFR WT i mutiranim varijantama EGFR I682Q i EGFR V924R korišteno je protutijelo anti-total EGFR, za ukupnu fosforilaciju anti-total pY, za fosforilaciju specifičnih tirozinskih ostataka anti-pEGFR Y1173 i Y1068 i za aktivirani protein nizvodnog signalnog Ras/MAPK puta anti-pERK. Za detekciju Mig6 inhibitora korišteno je protutijelo anti-Myc jer protein nosi Myc-tag (Mig6-myc tag).

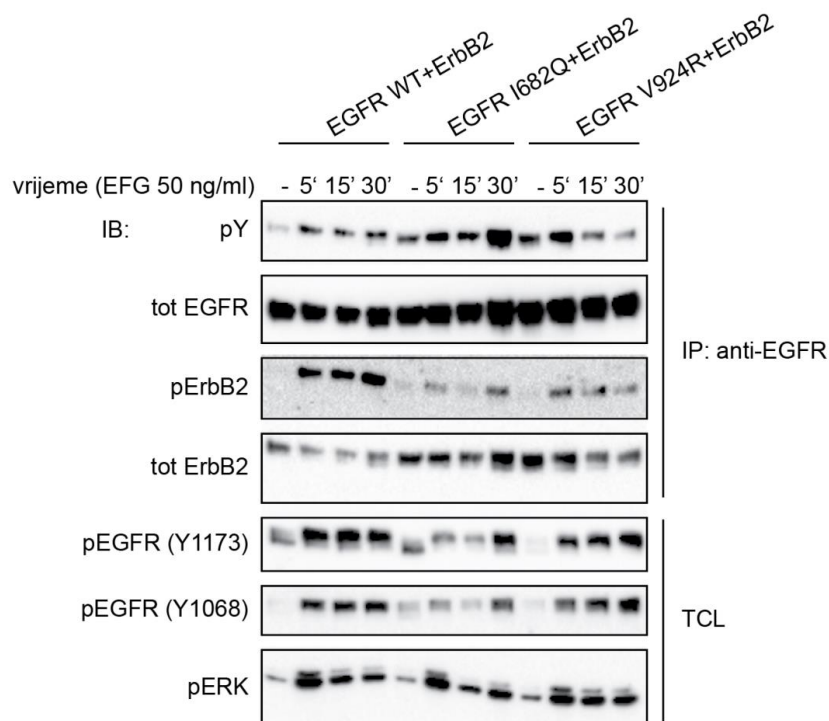


Slika 12. Western blot imunodetekcija proteina izoliranih iz ko-transfektiranih CHO-K1 stanica. Stanice su akutno stimulirane s TGF- α koncentracije 50 ng/ml. Kako bi se potvrdila transfekcija EGFR WT i mutiranim varijantama EGFR I682Q i EGFR V924R korišteno je protutijelo anti-total EGFR, za ukupnu fosforilaciju anti-total pY, za fosforilaciju specifičnih tirozinskih ostataka anti-pEGFR Y1173 i Y1068 i za aktivirani protein nizvodnog signalnog Ras/MAPK puta anti-pERK. Za detekciju Mig6 inhibitora korišteno je protutijelo anti-Myc jer protein nosi Myc-tag (Mig6-myc tag).

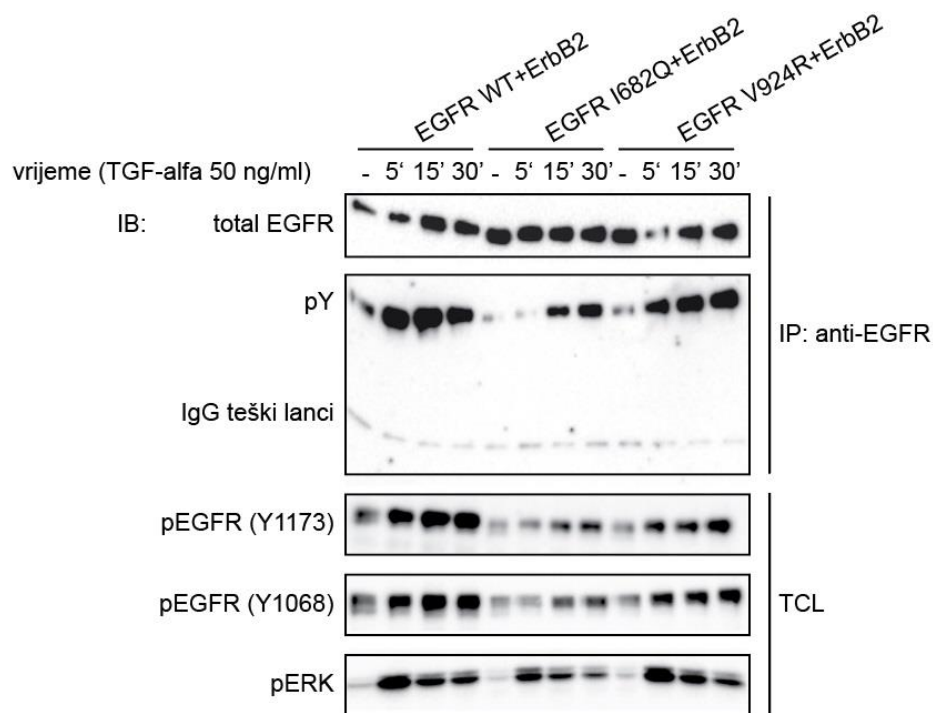
Prethodno izgladnjivane stanice (6h) tretirane su različitim ligandima (EGF ili TGF- α) koncentracije 50 ng/ml kroz vremenski period od 5, 15 i 30 min te ne tretirane. Imunodetekcijom vidljivo je da je transfekcija bila uspješna. Inhibitor Mig6 stupa u interakciju s divljim tipom EGFR, ali ne i sa mutiranim varijantama receptora. Vidljivo je da je divlji tip receptora i dalje fosforiliran promatrajući ukupnu fosforilaciju i fosforilaciju specifičnih tirozinskih ostataka. Mutirane varijante nisu fosforilirane na specifičnim tirozinskim ostacima dok je prisutna blaga ukupna fosforilacija mutirane varijante I682Q na 15 i 30 pri stimulaciji s TGF- α . Nizvodni signalni put Ras/MAPK je aktiviran što je vidljivo fosforilacijom pERK.

4.1.3 EGFR i ErbB2 heterodimeri s vezanim različitim ligandima

U prethodnim istraživanjima nije ispitan utjecaj mutacija u kinaznoj domeni EGFR na formiranje heterodimera. Provedena je Western blot analiza proteina izoliranih iz CHO-K1 stanica ko-transfektiranih EGFR divljim tipom (WT), mutiranom varijantom EGFR I682Q ili V924R sa ErbB2 kako bi se pokazalo utječu li mutacije u kinaznoj domeni EGFR na formiranje funkcionalnih heterodimera uslijed stimulacije različitim ligandima tijekom procesa internalizacije EGF-receptora.



Slika 13. Western blot imunodetekcija proteina izoliranih iz ko-transfektiranih CHO-K1 stanica. Stanice su akutno stimulirane s EGF koncentracije 50 ng/ml. Kako bi se potvrdila transfekcija EGFR WT i mutiranim varijantama EGFR I682Q i EGFR V924R korišteno je protutijelo anti-total EGFR, za provjeru transfekcije ErbB2 korišteno je protutijelo anti-total ErbB2, za ukupnu fosforilaciju anti-total pY, za fosforilaciju ErbB2 receptora anti-pErbB2, za fosforilaciju specifičnih tirozinskih ostataka anti-pEGFR Y1173 i Y1068 i za aktivirani protein nizvodnog signalnog Ras/MAPK puta anti-pERK.



Slika 14. Western blot imunodetekcija proteina izoliranih iz ko-transfektiranih CHO-K1 stanica. Stanice su akutno stimulirane s TGF- α koncentracije 50 ng/ml. Kako bi se potvrdila transfekcija EGFR WT i mutiranim varijantama EGFR I682Q i EGFR V924R korišteno je protutijelo anti-total EGFR, za ukupnu fosforilaciju anti-total pY, za fosforilaciju specifičnih tirozinskih ostataka anti-pEGFR Y1173 i Y1068 i za aktivirani protein nizvodnog signalnog Ras/MAPK puta anti-pERK.

Prethodno izgladnjivane stanice (6h) tretirane su različitim ligandima (EGF ili TGF- α) koncentracije 50 ng/ml kroz vremenski period od 5, 15 i 30 min te ne tretirane.

Imunodetekcijom vidljivo je da je transfekcija bila uspješna. Receptor je fosforiliran ne vezano o mutacijama. Divlji tip receptora za koji je vezan EGF ima fosforiliran i ErbB2. Specifični tirozinski ostaci prate isti trend i kod receptora s vezanim EGF i TGF- α tako da je mutirana varijanta EGFR I682Q manje fosforilirana u odnosu na divlji tip i EGFR V924R, no vidljivo je da je fosforilacija veća na 30 min. pERK je fosforiliran, a na 5 minuta primjećuje se jači signal.

4.1.4 Povezivanje različitih liganada fleksibilnim linkerom

Progresija tumora i rezistencija na postojeće protu-tumorske lijekove vrlo često su povezani s heterogenom ekspresijom liganada EGFR u mikrokruženju tumora. Vodeći se tom informacijom dizajnirane su kimerne molekule koje povezuju dva čimbenika rasta, odnosno liganda, linkerom koji mora imati svojstvo fleksibilnosti.

Humani epidermalni čimbenik rasta (EGF)

mRNA:

```
ATGAATAGTGACTCTGAATGTCCCCTGTCCCACGATGGGTACTGCCTCCATGATG
GTGTGTGCATGTATATTGAAGCATTGGACAAGTATGCATGCAACTGTGTTGTTGG
CTACATCGGGGAGCGATGTCAGTACCGAGACCTGAAGTGGTGGGAACTGCGC
```

Aminokiselinska sekvenca:

```
MNSDSECLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR
```

Humani transformirajući čimbenik rasta alfa (TGF- α)

mRNA:

```
ATGGTGGTGTCCCATTTTAATGACTGCCAGATTCCCACACTCAGTTCTGCTTCCA
TGGAACCTGCAGGTTTTTGGTGCAGGAGGACAAGCCAGCATGTGTCTGCCATTCT
GGGTACGTTGGTGCACGCTGTGAGCATGCGGACCTCCTGGCC
```

Aminokiselinska sekvenca:

```
MVVSHFNDCPDSHTQFCFHGTCRFLVQEDKPACVCHSGYVGARCEHADLLA
```

Heparin vezujući-EGF

mRNA:

ATGGACTTGCAAGAGGCAGATCTGGACCTTTTGAGAGTCACTTTATCCTCCAAGC
CACAAGCACTGGCCACACCAAACAAGGAGGAGCACGGGAAAAGAAAGAAGAAA
GGCAAGGGGCTAGGGAAGAAGAGGGACCCATGTCTTCGGAAATACAAGGACTTC
TGCATCCATGGAGAATGCAAATATGTGAAGGAGCTCCGGGCTCCCTCCTGCATCT
GCCACCCGGGTTACCATGGAGAGAGGTGTCATGGGCTGAGCCTC

Aminokiselinska sekvenca:

MDLQEADLDLLRVTLSSKPQALATPNKEEHGKRKKKGKGLGKKRDPCLRKYKDFCI
HGECKYVKELRAPSCICHPGYHGER CHGLSL

Amfiregulin

mRNA:

ATGTCAGTCAGAGTTGAACAGGTAGTTAAGCCCCCCAAAACAAGACGGAAAGT
GAAAATACTTCAGATAAACCCAAAAGAAAGAAAAAGGGAGGCAAAATGGAAA
AAATAGAAGAAACAGAAAGAAGAAAAATCCATGTAATGCAGAATTTCAAATTT
CTGCATTCACGGAGAATGCAAATATATAGAGCACCTGGAAGCAGTAACATGCAA
ATGTCAGCAAGAATATTTTCGGTGAACGGTGTGGGGAAAAGTCCATGAAAACCTCA
CAGCATGATTGACAGTAGTTTATCAAAAATT

Aminokiselinska sekvenca:

MSVRVEQVVKPPQNKTESENTSDKPKRKKKGGKNGKNRRNRKKKNPCNAEFQNF
IHGECKYIEHLEAVTCKCQQEYFGERCGEKSMKTHSMIDSSLSK

Linker

Aminokiselinska sekvenca:

- a) SGIRS(GS5)5 – SGIRSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSS (35
aminokiselina)

- b) GIRS(G2S4)5 – GIRSGSSGSSGSSGSSGSSGSSGSSGSSGSSGSS (34
aminokiseline)
- c) (GS5)9 –
GSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSS (54
aminokiseline)

EGF-linker-EGF

- a) MNSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKW
WELRSGIRSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSNSDSECPLSHDGYCLH
DGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR
- b) MNSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKW
WELRGIRSGSSGSSGSSGSSGSSGSSGSSGSSGSSGSSNSDSECPLSHDGYCL
HDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR
- c) MNSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKW
WELRGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSS
SNSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKW
WELR

EGF-linker-TGF- α

- a) MNSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKW
WELRSGIRSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSVVSHFNDCPDSHTQFC
FHGTCRFLVQEDKPACVCHSGYV GARCEHADLLA
- b) MNSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKW
WELRGIRSGSSGSSGSSGSSGSSGSSGSSGSSGSSGSSVVSHFNDCPDSHTQF
CFHGTCRFLVQEDKPACVCHSGYV GARCEHADLLA
- c) MNSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKW
WELRGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSS
SVVSHFNDCPDSHTQFCFHGTCRFLVQEDKPACVCHSGYV GARCEHADLLA

EGF-linker-HB-EGF

- a) MNSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKW
WELRSGIRSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSDLQEADLLRVTLSS
KPQALATPNKEEHGKRKKKGKGLGKKRDPCLRKYKDFCIHGECKYVKELRA
PSCICHPGYHGER CHGLSL

- b) **MNSDSECLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKW**
WELRGIRSGSSGSSGSSGSSGSSGSSGSSGSSGSSSSSSGSSSSSDLQEAD
 LDLLRVTLSKPKALATPNKEEHGKRKKKGKGLGKKRDPCLRKYKDFCIHGE
 CKYVKELRAPSCICHPGYHGER CHGLSL
- c) **MNSDSECLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKW**
WELRGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSS
SDLQEADLDLLRVTLSKPKALATPNKEEHGKRKKKGKGLGKKRDPCLRKY
KDFCIHGECKYVKELRAPSCICHPGYHGER CHGLSL

TGF- α -linker-Amfiregulin

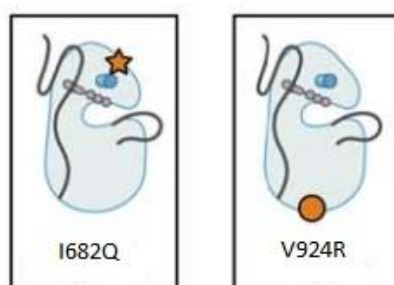
- a) **MVVSHFNDCPDSHTQFCFHGTCRFLVQEDKPACVCHSGYVGARCEHADLLA**
SGIRSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSSVRVEQVVKPPQNKTESENTS
 DKPKRKKKGGKNGKNRRNRKKKNPCNAEFQNF CIHGECKYIEHLEAVTCKC
 QQEYFGERCGEKSMKTHSMIDSSLSK
- b) **MVVSHFNDCPDSHTQFCFHGTCRFLVQEDKPACVCHSGYVGARCEHADLLA**
GIRSGSSGSSGSSGSSGSSGSSGSSGSSGSSSSSSSGSSSSSSVRVEQVVKPP
 QNKTESENTSDKPKRKKKGGKNGKNRRNRKKKNPCNAEFQNF CIHGECKYI
 EHLEAVTCKCQQEYFGERCGEKSMKTHSMIDSSLSK
- c) **MVVSHFNDCPDSHTQFCFHGTCRFLVQEDKPACVCHSGYVGARCEHADLLA**
GSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSGSSSSSSVR
 VEQVVKPPQNKTESENTSDKPKRKKKGGKNGKNRRNRKKKNPCNAEFQNF
 IHGECKYIEHLEAVTCKCQQEYFGERCGEKSMKTHSMIDSSLSK

Sekvence su preuzete s NCBI The National Center for Biotechnology Information. Pomoću linkera različitih dužina predložene su različite kimerne molekule od kojih bi EGF-linker-EGF trebala biti pozitivna kontrola. Povezani su ligandi koji pripadaju istoj skupini prema tome koju konformaciju receptora uzrokuju, a razlikuju se ili ne razlikuju prema afinitetu za receptor te ligandi koji pripadaju različitoj skupini prema tome koju konformaciju receptora uzrokuju, a imaju isti afinitet prema receptoru.

4.2 RASPRAVA

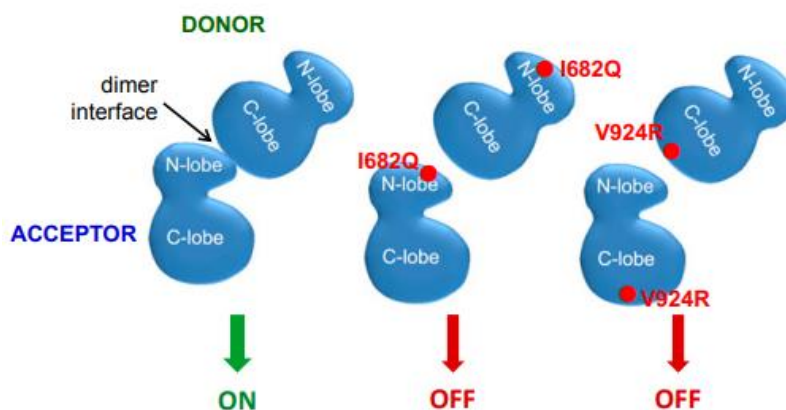
ErbB obitelj receptora uključujući EGFR koji je ključan regulator razvoja eukariota i kontrole proliferacije, preživljenja i diferencijacije stanica u organizmu. U mnogim tumorima aktivacija i regulacija ErbB receptora je poremećena stoga su upravo ovi receptori dijagnostički markeri i meta mnogih terapeutika koji djeluju inhibicijski na aktivnost receptora (Sorkin i Duex, 2010). Biologija široko eksprimiranih EGFR/ErbB receptora nije jednostavna, no s vremenom sve više se razumijeva njihova regulacija. Poznato je da se za EGFR veže sedam različitih liganada (Lemmon i sur., 2014), a u ovom istraživanju korištena su dva, EGF i TGF- α . Specifičan način liganandom inducirane aktivacije ErbB receptora i formiranjem asimetričnih homo/heterodimera polje je koje je predmet i ovog istraživanja.

U ovom radu osim divljeg tipa receptora korištene su dvije varijante koje imaju mutaciju u kinaznoj domeni, EGFR I682Q koja ima mutaciju u N-režnju te isključivo ima ulogu aktivatora i EGFR V924R koja ima mutaciju u C-režnju i isključivo ima ulogu primatelja (Slika 15.).



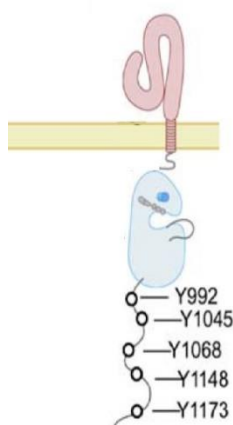
Slika 15. Lijevo zvijezdicom prikazana mutacija N-režnja I682Q, desno kružićem prikazana mutacija C-režnja V924R (Zhang i sur., 2006)

Poznavajući da se EGFR aktivira kao asimetrični dimer, gdje u interakciju stupa N-režanj jedne i C-režanj druge kinaze pokazano je da mutirane varijante, koje imaju I682Q mutaciju i mogu biti samo aktivatori te V924R mutaciju koji mogu biti samo primatelji, ne mogu stvoriti aktivne homodimere pa takav receptor neće biti fosforiliran (Slika 16.) (Zhang i sur., 2006).



Slika 16. Aktivni i neaktivni asimetrični dimeri EGFR (Red Brewer i sur., 2013)

Činjenica da receptor stimuliran EGF nema istu konformaciju vanstanične domene kao i receptor s vezanim TGF- α (Ogiso i sur., 2002, Garret i sur., 2002) potakla je ovo istraživanje kako bi se ispitalo utjecaj razlika vanstanične domene na kontakte u kinaznoj domeni EGFR homodimera. Iz rezultata je vidljivo da je divlji tip receptora fosforiliran na specifičnim tirozinskim ostacima kada je akutno stimuliran s EGF (Slika 9.), dok kod stimulacije s TGF- α divlji tip receptora pokazuje manju fosforilaciju na tirozinskom ostatku Y1173, no ukupna fosforilacija ipak postoji (Slika 10.) te je moguće da se osim Y1068 fosforiliraju i neki drugi tirozinski ostaci receptora (Slika 17.).



Slika 17. Tirozinski ostaci EGFR koji podliježu fosforilaciji (Jura i sur., 2009)

Primjećeno je da se kod receptora stimuliranog s TGF- α na pY1068 fosforilacija povećava kroz proces internalizacije (Slika 10.) što je moguće rezultat recikliranja receptora te

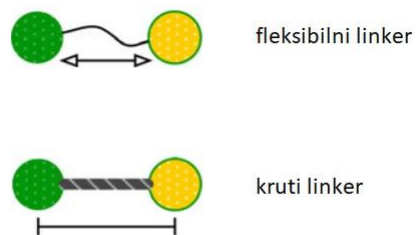
produživanja signala, ili promjene pH pri internalizaciji receptora u stanici. Promjena pH može utjecati na konformaciju receptora te je moguće da pri određenom pH receptor promijeni svoju strukturu što mu omogućuje dodatnu transfosforilaciju, vezanje proteina adaptora i aktiviranje nizvodnih signalnih puteva. Isto tako signalizacija receptora se nastavlja nakon njegove internalizacije te je moguće da se signal mijenja ovisno o putovanju receptora kroz stanicu. Do sada već poznat rezultat, da EGFR s mutacijama I682Q i V924R pri stimulaciji s EGF ne dovodi do formiranja funkcionalnog dimera (Zhang i sur., 2006), potvrđen je i u ovom radu. Ukoliko se mutirane varijante EGFR stimuliraju s TGF- α ukupna fosforilacija receptora koji nosi mutaciju I682Q prisutna je na 15 i 30 min. Moguće je da se receptor fosforilira na nekim drugim tirozinskim ostacima koji u ovom radu nisu provjeravani. Protein nizvodnog signalnog Ras/MAPK puta, ERK, pokazuje pojačanu fosforilaciju na 5 minuta što ukazuje na to da aktivacija Ras/MAPK signalnog puta započinje dok je receptor na membrani.

Mig6 je inhibitor EGFR i onemogućuje fosforilaciju receptora, može inhibirati EGFR tako da djeluje na njegovu katalitičku aktivnost (Park i sur., 2015). Do sad provedena istraživanja pokazala su da je posljedica interakcije Mig6 s EGFR znatno utišavanje nizvodnih signalnih puteva, u ovom slučaju pERK te da je fosforilacija specifičnih tirozinskih ostataka Y1173 i Y1068 smanjena pri akutnoj stimulaciji s EGF. Također su pokazano da receptor akutno stimuliran s TGF- α i inhibiran Mig6 rezultira smanjenom ukupnom fosforilacijom (Anastasi i sur., 2007). Iz rezultata (Slika 11. i 12.) potvrđeno je da se inhibitor Mig6 veže za divlji tip EGFR dok se za mutirane varijante ne veže čime se zaključuje da se Mig6 veže za dimer, no ne i za monomer. Može se zaključiti da su aminokiseline I682Q i V924R, koje su supstituirane, odgovorne za mjesto vezanja Mig6 te da je interakcija između EGFR i Mig6 neovisna o prirodi liganda kojim je receptor stimuliran. Vidljivo je da je fosforilacija specifičnih tirozinskih ostataka Y1068 i Y1173 niža kod divljeg tipa receptora (Slika 11. i 12.) u odnosu kada nije prisutan Mig6 (Slika 9. i 10.). Fosforilacija receptora još je uvijek prisutna, a to je moguće zbog prekomjerne ekspresije receptora koji uvjetuju spontanu homodimerizaciju. Kod receptora tretiranih TGF- α primjećena je veća razina ukupne fosforilacije kod mutiranih varijanti EGFR (Slika 12.) ista kao i kod stanica koje ne ekspimiraju Mig6 što ukazuje na to da je fosforilacija mutiranih varijanti receptora neovisna o interakciji s Mig6.

U ovom istraživanju ispitivao se i utjecaj mutacija u kinaznoj domeni EGFR za formiranje aktivnih heterodimera i njihov utjecaj na ukupnu fosforilaciju te na fosforilaciju specifičnih tirozinskih ostataka i nizvodni signalni Ras/MAPK put. Smatra se da kada EGFR heterodimerizira s ostalim ErbB članovima može doći do stvaranja novih mjesta autofosforilacije kako bi se aktivirale nizvodne signalne molekule ili, upravo suprotno, do nemogućnosti stvaranja autofosforilacijskih mjesta. (Muthuswamy i sur., 1999). Heterodimer EGFR/ErbB2 tretiran s EGF se fosforilira, isto tako i sam ErbB2 je fosforiliran. Iz rezultata je vidljivo da ErbB2 u heterodimeru s mutiranim varijantama EGFR pokazuje manju fosforilaciju u odnosu na divlji tip te da EGFR u heterodimeru EGFR I682Q/ErbB2 pri stimulaciji EGF na 30 minuta pokazuje veći signal i ukupne i fosforilacije oba specifična tirozinska ostatka (Slika 13. i 14.). Objašnjenje ovog rezultata leži u spoznaji da se signalizacija receptora nastavlja i nakon internalizacije. Endosomi imaju svojstva signalnih platformi koja omogućavaju receptorima, smještenim u endosomu, kontinuiranu signalizaciju. Imaju mali volumen koji pozitivno utječe na receptor-ligand kompleks te održavanje receptora aktivnim, dugo zadržavanje aktivnog receptora tijekom sortiranja te niži pH nego na plazma membrani (Sorkin i von Zastrow, 2009). Osim toga moguće je da pri heterodimerizaciji dolazi do novih mjesta autofosforilacije receptora. Uspoređujući fosforilaciju specifičnih tirozinskih ostataka Y1068 i Y1173 kod sve tri varijante receptora u homodimernom i heterodimernom obliku može se zaključiti da aminokiseline supstituirane u mutiranim varijantama receptora nisu odgovorne za formiranje funkcionalnih heterodimera te da se kontakti kinaznih domena u homo i heterodimerima razlikuju. Receptor stimuliran TGF- α pokazuje veću fosforilaciju u uspoređi s EGF. Ukupna fosforilacija EGFR u heterodimeru EGFR I682Q/ErbB2 pojavljuje se tek na 15 i 30 minuta iz čega se može zaključiti da je ta aminokiselina odgovorna za formiranje funkcionalnog heterodimera na 5 minuta, dok se na 15 i 30 minuta konformacija receptora mijenja, a samim time i kontakt između kinaznih domena heterodimera.

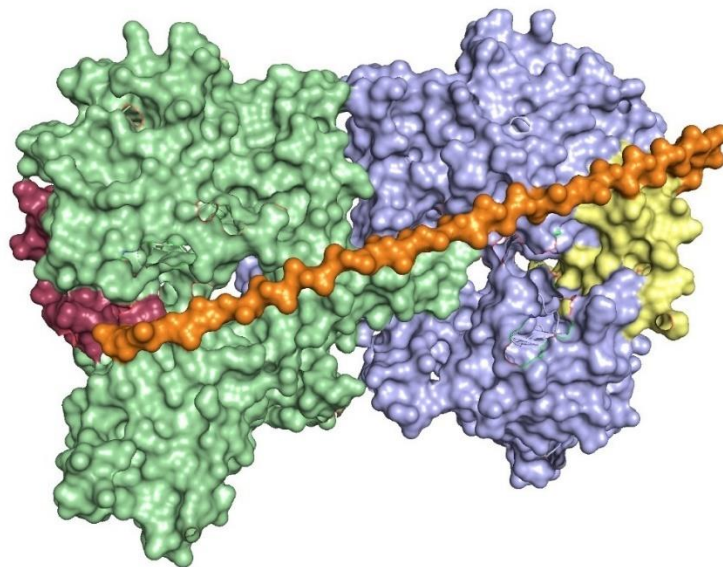
Dosadašnja istraživanja ukazuju na to da u mikrokruženju tumora postoji heterogena ekspresija čimbenika rasta EGF-receptora (von Achenbach i sur., 2018). Ukoliko receptor mijenja konformaciju vanstanične domene uslijed vezanja liganda, postoji vjerojatnost da će u homodimeru jedna molekula receptora vezati jedan, a druga molekula receptora drugi, različiti ligand. Ova pretpostavka potakla je ideju o konstruiranju kimerne molekule sastavljene od dva različita liganda povezana fleksibilnim linkerom. Izmjereno je da je udaljenost između dva vezana liganda 85 Å, a znajući da je prosječno jedna aminokiselina duga 3.5 Å te da linker

treba biti fleksibilan, potrebno je otprilike 36 aminokiselina koje bi povezivale dva liganda ($85/3.5 \approx 24$; $24 \times 1.5 \approx 36$, množenje s 1.5 kako bi se linker učinio fleksibilnim) (Slika 18.).



Slika 18. Usporedba fleksibilnog i krutog linkera

Moguće je da se u mikrokruženju tumora gdje su ekspimirani različiti ligandi i događa takva situacija te da su TKI u principu nedovoljno specifični za takvu strukturu dimera. Kako bi se unaprijedilo liječenje takvih tumora bilo bi potrebno dizajnirati alosteričke inhibitore koji bi u kontekstu strukturne konformacije bili učinkovitiji izbor. Predložen je primjer nekoliko različitih linkera koji bi s 2 različita liganda inducirali formiranje homodimera. Kao pozitivna kontrola koristila bi se dva ista liganda, u ovom slučaju EGF i EGF gdje se nakon stimulacije receptor dimerizira, aktivira i potiče nizvodnu signalizaciju. Na slici 19 prikazan je model kimerne molekule koja sadrži dvije EGF molekule vezane za dva EGF-receptora.



Slika 19. Predloženi model EGFR dimera s dva vezana EGF liganda povezana linkerom, zeleno i ljubičasto-dvije molekule EGFR, crveno i žuto-dvije molekule EGF, narančasto-linker. Slika je konstruirana korištenjem PyMOL programa

Kada bi se povezala dva različita liganda, točnije ona dva koja uzrokuju drukčiju konformaciju vanstanične domene receptora, moguć je drukčiji ishod, također ukoliko se povežu i dva različita liganda koja uzrokuju istu konformaciju receptora, a razlikuju se po afinitetu. Takvom kimernom molekulom tretirale bi se stanice koje imaju stabilno eksprimiran EGFR ili mutirane varijante. Postoji mogućnost da bi se tada EGF-receptor mogao aktivirati i da te mutacije u kinaznoj domeni ne bi bile odgovorne za formiranje aktivnih asimetričnih EGFR dimera. Nadalje, razvoj alosteričkih inhibitora možda je najučinkovitija metoda liječenja tumora koji prekomjerno eksprimiraju divlji tip EGFR i heterogeno eksprimiraju čimbenike rasta.

5 ZAKLJUČCI

1. Promjena strukturne konformacije vanstanične domene EGFR uzrokovana vezanjem različitih liganada (EGF i TGF- α) rezultira promjenom u kontakta između dvije kinazne domene unutar homodimera.
2. Negativni regulator EGFR Mig6 ne stupa u interakciju s varijantama receptora koje nose I682Q i V924R mutaciju u kinaznoj domeni pri akutnoj stimulaciji s EGF i TGF- α .
3. Strukturne konformacije kinaznih domena homo i heterodimera EGFR se razlikuju.
4. Strukturna konformacija kinazne domene heterodimera mijenja se tijekom procesa internalizacije EGF-receptora koji nosi mutaciju I682Q.

6 Literatura

Anastasi, S., Baietti, M. F., Frosi, Y., Alemà, S., Segatto, O. (2007) The evolutionarily conserved EBR module of RALT/MIG6 mediates suppression of the EGFR catalytic activity. *Oncogene*, **26**, 7833–7846.

Appert-Collin, A., Hubert, P., Crémel, G., Bennisroune, A. (2015) Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. *Front. Pharmacol.*, **6**, 283.

Berasain, C., Avila, M. A. (2014) *Amphiregulin*. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **28**, 31–41.

Bonner, J. A., Raisch, K. P., Trummell, H. Q., Robert, F., Meredith, R. F., Spencer, S. A., Buchsbaum, D. J., Saleh, M. N., Stackhouse, M. A., LoBuglio, A. F., Peters, G. E., Carroll, W. R., Waksal, H. W. (2000) Enhanced apoptosis with combination C225/radiation treatment serves as the impetus for clinical investigation in head and neck cancers. *Am. J. Clin. Oncol.*, **18**, 47–53.

Broekman, F., Giovannetti, E., Peters, G. J. (2011) Tyrosine kinase inhibitors: Multi-targeted or single-targeted?. *World J. Clin. Oncol.*, **2**, 80–93.

Burke, P., Schooler, K., Wiley, H. S. (2001) Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking. *Mol. Biol. Cell.* **12**, 1897–1910.

Byeon, S., Lee, H. S., Kim, M.-A., Lee, B. L., Kim, W. H. (2017) Expression of the ERBB Family of Ligands and Receptors in Gastric Cancer. *Pathobiology*, **84**, 210–217.

Ceresa, B. P. (2011) Endocytic Trafficking of the Epidermal Growth Factor Receptor in Transformed Cells. U Breast Cancer - Carcinogenesis, Cell Growth and Signalling (Gunduz, M., ured.), IntechOpen, London, str. 49-72

Chen, X., Zaro, J. L., Shen, W. C. (2013) Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev.* **65**, 1357-1369.

Cooper, G. M. (2000) *The Cell: A Molecular Approach*, 2. izd., Sinauer Associates, Sunderland

Doerner, A., Scheck, R., Schepartz, A. (2015) Growth Factor Identity Is Encoded by Discrete Coiled-Coil Rotamers in the EGFR Juxtamembrane Region. *Chem. Biol.*, **22**, 776–784.

Du, X., Yang, B., An, Q., Assaraf, Y. G., Cao, X., Xia, J. (2021) Acquired resistance to third-generation EGFR-TKIs and emerging next-generation EGFR inhibitors. *The Innovation* **2**, 1-17

Garrett, T. P. J., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Zhu, H., Walker, F., Frenkel, M. J., Hoyne, P. A., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., Ward, C. W. (2002) Crystal Structure of a Truncated Epidermal Growth Factor Receptor Extracellular Domain Bound to Transforming Growth Factor α . *Cell*, **110**, 763–773.

Hsuan, J. J. (2004). Transforming Growth Factor (TGF) Alpha.U: Encyclopedia of Endocrine Diseases (Martini, L., ured.) Academia Press, Ghent, str. 605–611.

Hynes, N. E., MacDonald, G. (2009) ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **21**, 177–184.

Jia, Y., Yun, C. H., Park, E., Ercan, D., Manuia, M., Juarez, J., Xu, C., Rhee, K., Chen, T., Zhang, H., Palakurthi, S., Jang, J., Lelais, G., DiDonato, M., Bursulaya, B., Michellys, P. Y., Epple, R., Marsilje, T. H., McNeill, M., Lu, W., Harris, J., Bender, S., Wong, K., Jänne, P. A., Eck, M. J. (2016) Overcoming EGFR(T790M) and EGFR(C797S) resistance with mutant-selective allosteric inhibitors. *Nature*, **534**, 129–132.

Jura, N., Endres, N. F., Engel, K., Deindl, S., Das, R., Lamers, M. H., Wemmer, D. E., Zhang, X., Kuriyan, J. (2009) Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell*, **137**, 1293–1307

Khelwatty S., Essapen S., Bagwan I., Green M., Seddon A., Modjtahedi H. (2017) The impact of co-expression of wild-type EGFR and its ligands determined by immunohistochemistry for response to treatment with cetuximab in patients with metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*. **8**, 7666-7677.

Kovacs, E., Zorn, J. A., Huang, Y., Barros, T., Kuriyan, J. (2015) A Structural Perspective on the Regulation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Annu. Rev. Biochem.*, **84**, 739–764.

Kuemmerle, J. F., Barnard, J. A., McHugh, K. M. (2012) Growth Factors in the Gastrointestinal Tract. U:Physiology of the Gastrointestinal Tract (Said, H., ured.), Academic Press, Cambridge, str.199–277.

Lemmon, M. A., Schlessinger, J., Ferguson, K. M. (2014) The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **6**, a020768. doi:10.1101/cshperspect.a020768

Liu, Q., Yu, S., Zhao, W. Qin, S., Chu, Q., Wu, K. (2018) EGFR-TKIs resistance via EGFR-independent signaling pathways. *Mol. Cancer*, **17**, 53. doi: 10.1186/s12943-018-0793-1

Mattila, E., Pellinen, T., Nevo, J., Vuoriluoto, K., Arjonen, A., Ivaska, J. (2004) Negative regulation of EGFR signalling through integrin- α 1 β 1-mediated activation of protein tyrosine phosphatase TCPTP. *Nat. Cell Biol.*, **7**, 78–85

Metibemu, D.S., Akinloye, O.A., Akamo, A.J., Ojo, D. A., Okeowo, O. T., Omotuyi, I. O. (2019) Exploring receptor tyrosine kinases-inhibitors in Cancer treatments. *Egypt. J. Med. Hum. Genet.* **20**, 35. doi: 10.1186/s43042-019-0035-0

Mohapatra, B., Ahmad, G., Nadeau, S., Zutshi, N., An, W., Scheffe, S., Band, H. (2013) Protein tyrosine kinase regulation by ubiquitination: Critical roles of Cbl-family ubiquitin ligases. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* **1833**, 122–139.

Muthuswamy, S. K., Gilman, M., Brugge, J. S. (1999) Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 6845–6857.

Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J.-H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., Yokoyama, S. (2002) Crystal Structure of the

Complex of Human Epidermal Growth Factor and Receptor Extracellular Domains. *Cell*, **110**, 775–787.

Okines, A., Cunningham, D., Chau, I. (2011) Targeting the human EGFR family in esophagogastric cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **8**, 492–503.

Olayioye, M. A. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J.*, **19**, 3159–3167.

Park, E., Kim, N., Ficarro, S. B., Zhang, Y., Lee, B. I., Cho, A., Kim, K., Park, A., Park, W. Y., Murray, B., Meyerson, M., Beroukhim, R., Marto, J. A., Cho, J., Eck, M. J. (2015) Structure and mechanism of activity-based inhibition of the EGF receptor by Mig6. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 703–711.

Pines, G., Köstler, W. J., Yarden, Y. (2010) Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. *FEBS Lett.*, **584**, 2699–2706.

Poulikakos, P. I., Rosen, N. (2011) Mutant BRAF melanomas--dependence and resistance. *Cancer cell*, **19**, 11–15.

Purba, E. R., Saita, E. I., Maruyama, I. N. (2017) Activation of the EGF Receptor by Ligand Binding and Oncogenic Mutations: The "Rotation Model". *Cells*, **6**,13. doi: 10.3390/cells6020013

Red Brewer, M., Yun, C.-H., Lai, D., Lemmon, M. A., Eck, M. J., Pao, W. (2013) Mechanism for activation of mutated epidermal growth factor receptors in lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **110**, 3595–3604.

Roepstorff, K., Grøvdal, L., Grandal, M., Lerdrup, M., van Deurs, B. (2008) Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer. *Histochem. Cell Biol.*, **129**, 563–578.

Roskoski R., Jr (2019) Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein-tyrosine kinases in human cancers. *Pharmacol. Res.*, **139**, 395–411.

Roskoski, R. (2014) The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol. Res.*, **79**, 34–74.

Shah, R., Lester, J. F. (2019) Tyrosine Kinase Inhibitors for the Treatment of EGFR Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: A Clash of the Generations. *Clinical Lung Cancer* **21**, 216-228

Sinclair, J. K. L., Walker, A. S., Doerner, A. E., Schepartz, A. (2018) Mechanism of Allosteric Coupling into and through the Plasma Membrane by EGFR. *Cell Chem. Biol.*, **25**, 857–870.

Singh, B., Carpenter, G., Coffey, R. J. (2016) EGF receptor ligands: recent advances. *F1000Research*, **5**, 2270. doi:10.12688/f1000research.9025.1

Sorkin, A., Duex, J. E. (2010) Quantitative analysis of endocytosis and turnover of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **46**. doi: 10.1002/0471143030.cb1514s46

Sorkin, A., von Zastrow, M. (2009) Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 609–622.

Tebbutt, N., Pedersen, M. W., Johns, T. G. (2013) Targeting the ERBB family in cancer: couples therapy. *Nat. Rev. Cancer.*, **13**, 663–673.

To, C., Jang, J., Chen, T., Park, E., Mushajiang, M., De Clercq, D., Xu, M., Wang, S., Cameron, M. D., Heppner, D. E., Shin, B. H., Gero, T. W., Yang, A., Dahlberg, S. E., Wong, K. K., Eck, M. J., Gray, N. S., Jänne, P. A. (2019) Single and Dual Targeting of Mutant EGFR with an Allosteric Inhibitor. *Cancer Discov.*, **9**, 926–943.

Torres, M., Forman, H. J. (2006) Signal transduction. U: Encyclopedia of Respiratory Medicine, (Laurent, G., Shapiro, S. ured.), Academic Press, Cambridge, str. 10–18.

von Achenbach, C., Weller, M., Szabo, E. (2018) Epidermal growth factor receptor and ligand family expression and activity in glioblastoma. *J. Neurochem.*, **147**, 99–109.

Wang, Z. (2017). ErbB Receptors and Cancer. U:ErbB Receptor Signaling (Wang, Z., ed.) Humana Press, Totowa New Jersey, str. 3–35.

Waterman, H., Yarden, Y. (2001) Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases. *FEBS Lett.*, **490**, 142–152.

Wee, P., Wang, Z. (2017) Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers*, **9**, 52.

Wee, P., Wang, Z. (2018) Regulation of EGFR Endocytosis by CBL During Mitosis. *Cells*, **7**, 257. doi: 10.3390/cells7120257

Xu, N., Fang, W., Mu, L., Tang, Y., Gao, L., Ren, S., Cao, D., Zhou, L., Zhang, A., Liu, D., Zhou, C., Wong, K. K., Yu, L., Zhang, L., Chen, L. (2016) Overexpression of wildtype EGFR is tumorigenic and denotes a therapeutic target in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, **7**, 3884–3896.

Zeng, F., Harris, R. C. (2014) Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **28**, 2–11.

Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A., Kuriyan, J. (2006) An Allosteric Mechanism for Activation of the Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor. *Cell*, **125**, 1137–1149.

Zhang, X., Pickin, K. A., Bose, R., Jura, N., Cole, P. A., Kuriyan, J. (2007) Inhibition of the EGF receptor by binding of MIG6 to an activating kinase domain interface. *Nature*, **450**, 741–744.

7 PRILOZI

4E-BP - engl. eukaryotic initiation factor 4E-binding protein

DAG – diacilglicerol

EGF – epidermalni faktor rasta, engl. epidermal growth factor

EGFR – engl. epidermal growth factor receptor; receptor za epidermalni faktor rasta

ERK-engl. extracellular signal regulated kinase

Gab1 - engl. Grb2 associated binder

Grb2 - engl. Growth factor receptor binding protein 2

HER - engl. Human EGFR receptor

IB- imunoblot

IP – imunoprecipitacija

MAPK- engl. mitogen activated protein kinase

mTOR - engl. mammalian target of rapamycin

Nf1- neurofibromin 1

PIP₃ - fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat

PIP₂ - fosfatidilinozitol-4,5-difosfata

PTB - engl. phosphotyrosine-binding domain

PTEN- fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat 3 fosfataza

RalGDS – engl. Ras-like guanine nucleotide dissociation stimulator

SH2 - engl. Src homology 2

Shc - engl. Src homology and collagen

Sos1- engl. Son of sevenless 1

TACE - engl. tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme

TCPTP - engl. T-cell protein tyrosine phosphatase

TCL – ukupni stanični lizat, engl. total cell lysate

TGF- α – transformirajući faktor rasta alfa, engl. transforming growth factor alpha

TKI – tirozin kinazni inhibitor

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni

Tea Jukica