

ERBB2 obitelj receptora i RAS-RAF-MAPK signalni put u karcinomima dojke

Demir, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:159:692828>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-11**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Karla Demir

7587/BT

**ERBB2 OBITELJ RECEPTORA I RAS-RAF-MAPK
SIGNALNI PUT U KARCINOMIMA DOJKE**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biologija 2

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Reno Hrašćan

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

ERBB2 obitelj receptora i RAS-RAF-MAPK signalni put u karcinomima dojke

Karla Demir, 0058212759

Sažetak: Karcinom dojke je najčešća maligna bolest koja se javlja kod žena i jedan je od najčešćih karcinoma u svijetu. Njegov razvoj često je potaknut prekomjernom aktivnošću signalnih puteva u stanici, među koje spada RAS-RAF-MAPK signalni put. Transmembranski receptor ERBB2 uključen je u RAS-RAF-MAPK signalni put i provodi signal od izvanstaničnog čimbenika rasta do unutrašnjosti stanice. Istraživanjima je dokazano da amplifikacija i prekomjerna ekspresija *HER2* gena, gena koji kodira za ERBB2 receptor, te onkogene mutacije RAS i RAF izoformi posljedično dovode do razvoja različitih podtipova karcinoma dojke, naročito *HER2*-pozitivnog i TNBC podtipa. Tretiranjem RAS-RAF-MAPK signalnog puta anti-ERBB2 protutijelima te RAF i MEK inhibitorima otvara se mogućnost liječenja karcinoma dojke.

Ključne riječi: ERBB2 receptor, karcinom dojke, RAS-RAF-MAPK signalni put

Rad sadrži: 27 stranica, 5 slika, 1 tablica, 46 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Reno Hrašćan

Datum obrane: 15.9.2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics**

**Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology**

ERBB2 family of receptors and RAS-RAF-MAPK signaling pathway in breast cancer

Karla Demir, 0058212759

Abstract: Breast cancer is the most common malignancy that occurs in women and is one of the most common cancers in the world. Its development is driven by excessive activity of signaling pathways in the cell, including the RAS-RAF-MAPK signaling pathway. The ERBB2 transmembrane receptor is involved in the RAS-RAF-MAPK signaling pathway and carries the signal from the extracellular growth factor to the cell interior. Studies have shown that amplification and overexpression of *HER2* gene, a gene encoding the ERBB2 receptor, and oncogenic mutations in RAS and RAF isoforms consequently lead to the development of different subtypes of breast cancer, especially *HER2*-positive and TNBC subtypes. Treatment of the RAS-RAF-MAPK signaling pathway with ERBB2-antibodies and RAF and MEK inhibitors opens the possibility of treating breast cancer.

Keywords: breast cancer, ERBB2 receptor, RAS-RAF-MAPK signaling pathway

Thesis contains: 27 pages, 5 pictures, 1 table, 46 references, 1 supplement

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Dr. sc. Reno Hrašćan, Assoc. Prof.

Defence date: September 15th 2020

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. TUMORI	2
2.1.1. Definicija i karakteristike tumora	2
2.1.2. Onkogeni i tumor supresorski geni	2
2.1.3. Kancerogeneza	2
2.1.4. Vrste karcinoma	3
2.2. MOLEKULARNI PODTIPOVI KARCINOMA DOJKE	5
2.2.1. Luminalni podtipovi A i B	5
2.2.2. <i>HER2</i> pozitivni podtip	5
2.2.3. Trostruko negativni podtip	6
2.3. RAS-RAF-MAPK SIGNALNI PUT	8
2.3.1. Uloga i struktura ERBB2 receptora	8
2.3.2. Aktivacija ERBB2 receptora	9
2.3.3. Aktivacija Ras, Raf i MAPK proteina	10
2.4. RAS-RAF-MAPK SIGNALNI PUT U KARCINOMIMA DOJKE	13
2.4.1. Amplifikacija i prekomjerna ekspresija <i>HER2</i> gena	13
2.4.2. Onkogene mutacije u RAS-RAF-MAPK signalnom putu	14
2.4.3. Integracija RAS-RAF-MAPK signalnog puta	17
2.4.4. Tretiranje RAS-RAF-MAPK signalnog puta u svrhu liječenja karcinoma dojke	20
3. ZAKLJUČAK	23
4. POPIS LITERATURE	24
5. PRILOZI	
5.1. POPIS KRATICA	

1. UVOD

Karcinom dojke je najčešća maligna bolest koja se javlja kod žena i jedan je od tri najčešća karcinoma u svijetu (Harbeck i Gnant, 2017). Ovakva vrsta tumora nastaje promjenom i nekontroliranim dijeljenjem stanica tkiva dojke koje rezultira stvaranjem izrasline ili mase u dojci. Većina karcinoma dojke započinje u mliječnim žlijezdama dojke ili u specijaliziranim kanalčićima koji povezuju mliječne žlijezde s bradavicama (ACS, 2019). Karcinom dojke se može razviti putem različitih mehanizama, no najčešće je potaknut prekomjernom aktivnošću signalnih puteva u stanici (Velloso i sur., 2017).

Najvažnija karakteristika stanica je njihova proliferacija koja mora biti striktno regulirana, isto kao i replikacija DNA, kako bi se očuvala izvornost genoma u svakoj slijedećoj generaciji stanica. Proliferacija stanica je potaknuta signalom kojeg u stanicu prenosi izvanstanični čimbenik rasta s ciljem regulacije ekspresije gena i sinteze proteina odgovornih za staničnu proliferaciju (Pecorino, 2016). Jedan od članova obitelji receptora humanog epidermalnog faktora rasta je transmembranski receptor ERBB2 koji sudjeluje u razvoju karcinoma dojke.

ERBB2 receptor je uključen u RAS-RAF-MAPK signalni put koji je jedan od najvažnijih i najproučavanijih unutarstaničnih signalnih puteva odgovornih za staničnu proliferaciju, diferencijaciju i sprječavanje apoptoze stanice. Amplifikacija i prekomjerna ekspresija *HER2* gena te mutacije RAS i RAF izoformi dovode do prekomjerne aktivacije RAS-RAF-MAPK signalnog puta koji integracijom s ostalim važnim signalnim putevima znatno doprinosi razvoju karcinoma dojke.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TUMORI

2.1.1. Definicija i karakteristike tumora

Tumor je kompaktna ili tekućinom ispunjena nakupina tkiva karakterizirana pretjeranom i abnormalnom proliferacijom stanica. Ograničenjem rasta tumorskih stanica na mjesto nastanka te zadržavanjem normalnih fizioloških karakteristika stanica, dolazi do nastanka dobroćudnog tumora. Ukoliko su stanice abnormalnih fizioloških karakteristika i mogu se nekontrolirano dijeliti, dolazi do nastanka malignog tumora. Dobroćudni tumori se ne mogu se proširiti na ostale dijelove tijela, za razliku od malignih tumora koji putem krvotoka ili limfnih čvorova mogu dospjeti u druga tkiva tijela te na taj način metastazirati (Sinha, 2018).

2.1.2. Onkogeni i tumor supresorski geni

Onkogeni i tumor supresorski geni su dvije najvažnije vrste mutiranih gena koji doprinose razvoju tumorskih stanica. Onkogeni su dominantni geni koji uzrokuju nekontrolirani rast i diobu stanica te nastaju iz normalnih gena tzv. proto-onkogeni. Proto-onkogeni imaju funkcionalnu ulogu u stanici te su uključeni u stanični rast, proliferaciju i sprječavanje apoptoze stanice. Mutacijom samo jednog alela proto-onkogeni dolazi do aktivacije onkogeni. Prisutnost onkogeni u stanici rezultira pojačanom sintezom proteina ili povećanom aktivnošću proteina ključnih za fazu inicijacije u procesu karcinogeneze. Tumor supresorski geni su recesivni geni koji kodiraju za proteine važne za inhibiciju rasta stanica i formiranja tumora. Mutacije u oba alela tumor supresorskih gena uzrokuju gubitak njihove funkcije i ne dolazi do inhibicije rasta stanica što rezultira razvojem tumora (Pecorino, 2016).

2.1.3. Kancerogeneza

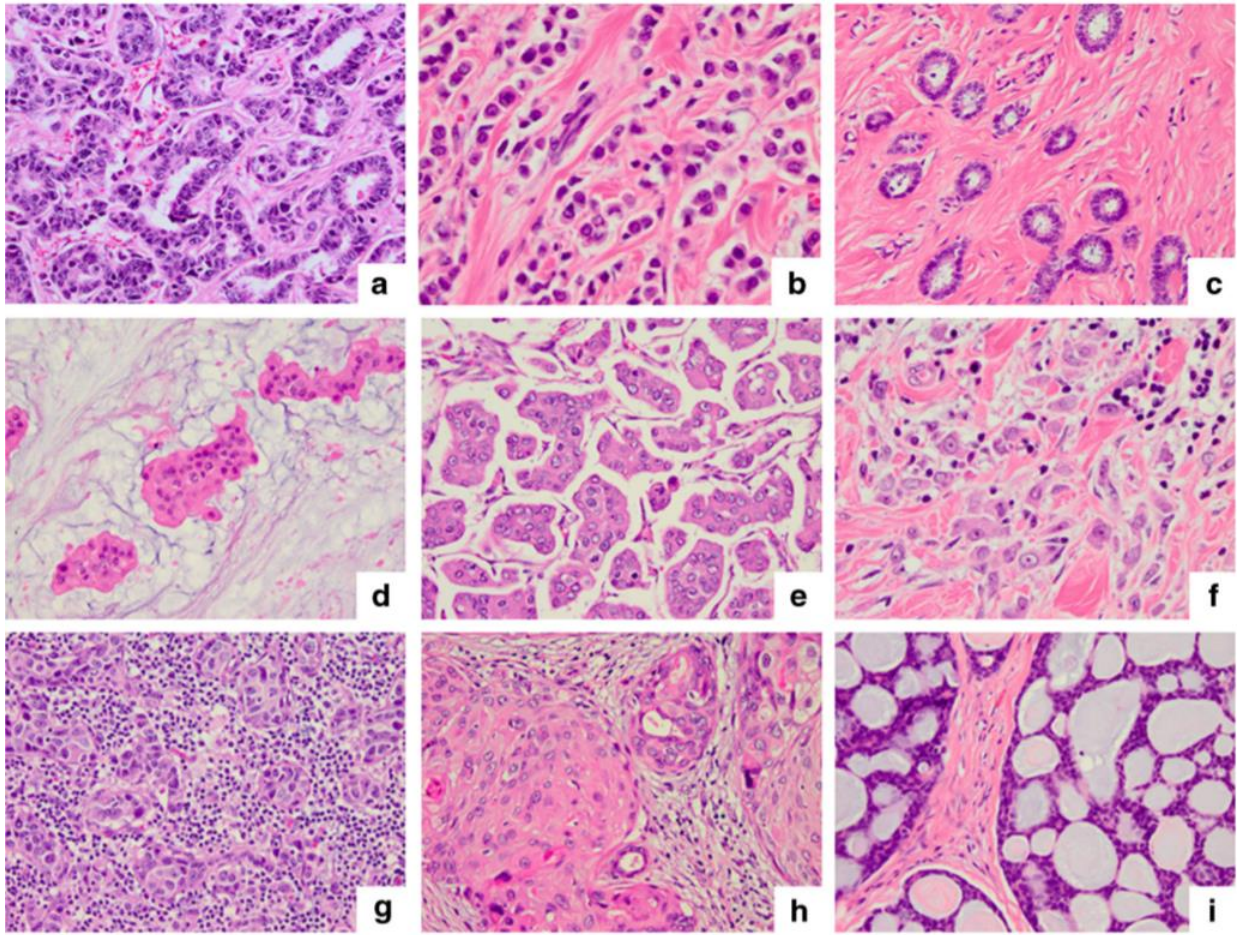
Kancerogeneza je proces koji se sastoji od više koraka, a karakteriziran je genskim promjenama koje utječu na važne signalne puteve u stanici. Proces uključuje tri faze:

- inicijaciju,
- promociju,
- progresiju.

Inicijacija je prva faza u kojoj se uvode mutacije u genima korištenjem kemijskih ili fizikalnih kancerogena. Mutacije posljedično dovode do aktivacije onkogeni ili inaktivacije tumor supresorskih gena (Albernaz i sur., 2017). Mutirana stanica iz faze inicijacije ulazi u drugu fazu – promociju. U fazi promocije se djelovanjem onkopromotora potiče dijeljenje neoplazmatskih stanica što olakšava stvaranje tumora. U fazi progresije dolazi do ekspresije malignog fenotipa stanica koje se dijele i uzrokuju brzo povećanje veličine tumora. Rastom tumora, stanice mogu proći kroz daljnje mutacije što može dovesti do povećanja heterogenosti tumorskih stanica. Napredovanje malignih tumora u fazi progresije dovodi do razdvajanja stanica od abnormalne nakupine tkiva i njihova širenja u okolna tkiva, što rezultira stvaranjem sekundarnih tumora na novim mjestima u organizmu (Devi, 2000).

2.1.4. Vrste karcinoma

Karcinomi su maligni tumori koji se postupno razvijaju iz preinvazivnih promjena u pločastom ili žljezdanom epitelu iz kojeg tumor potječe. U skupinu karcinoma epitelnog porijekla spadaju karcinomi pločastog epitela, karcinomi prijelaznog epitela i adenokarcinomi. Adenokarcinomi su maligni tumori žljezdanog podrijetla koji najčešće nastaju od epitelnih stanica sluznice probavnog ili dišnog sustava, endometrija i površinskog sloja jajnika te epitelnih dijelova dojke (Damjanov i sur., 2014). Karcinom dojke je jedan od pripadnika skupine adenokarcinoma i klasificira ga se na temelju njegovih histopatoloških i molekularnih karakteristika. Prema histološkoj klasifikaciji, karcinom dojke se dijeli na karcinome *in situ*, duktalne i lobularne, te invazivne karcinome. Postoji 21 podtip invazivnih karcinoma dojke, od kojih je najčešći invazivni karcinom nespecifičnog tipa, poznatiji pod nazivom invazivni duktalni karcinom dojke. Ostali podtipovi su morfološki različiti specifični podtipovi koji su prikazani na Slici 1 (Vuong i sur., 2014).



Slika 1. Reprezentativne morfološke varijante invazivnih karcinoma dojke. Morfološke varijante prikazane na slici: invazivni duktalni (a), klasični lobularni (b), tubularni (c), mucinozni (d), invazivni mikropapilarni (e), pleomorfni lobularni (f), medularni (g), metaplastični (h) i adenoidni cistični (i) (Vuong i sur., 2014).

Molekularni podtipovi temeljeni na histološkim karakteristikama, mogu poslužiti kao snažni prognostički i prediktivni faktori te znatno doprinose liječenju različitih tipova karcinoma dojke. Imunohistokemija koristi klasične molekularne markere poput *ER*, *PR* i *HER2*, koji imaju važnu ulogu u molekularnom podtipiziranju. Na osnovu molekularne klasifikacije, karcinomi dojke mogu se podijeliti na četiri osnovna molekularna podtipa, a to su luminalni podtip A, luminalni podtip B, *HER2* pozitivni i trostruko negativni karcinom dojke (Al-thoubaity, 2020).

2.2. MOLEKULARNI PODTIPOVI KARCINOMA DOJKE

2.2.1. Luminalni podtipovi A i B

Luminalni karcinomi dojke su hormonski (HR)-pozitivni karcinomi koji se mogu podijeliti na dva podtipa na temelju ekspresije gena odgovornih za proliferaciju stanica – luminalni podtip A i luminalni podtip B. Karcinomi dojke luminalnog podtipa A su *ER/PR*-pozitivni i *HER2* negativni, s izraženom ekspresijom *ER/PR*-povezanih gena i slabom ekspresijom gena odgovornih za proliferaciju stanica (Provenzano i sur., 2018). U luminalnom podtipu A dolazi do mutacije gena *PIK3CA* i *MAP3KI* odgovornih za stanični rast i proliferaciju te *XBPI*, *GATA3* i *FOXA1* gena koji kodiraju za transkripcijske faktore važne za ekspresiju gena. Karcinomi dojke luminalnog podtipa B su *ER/PR*-pozitivni i *HER2*-negativni te mogu biti *PR*-negativni i *HER2*-pozitivni, s izraženom ekspresijom gena odgovornih za proliferaciju stanica. U navedenom podtipu dolazi do mutacije gena *P53* i *PIK3CA* važnih za proliferaciju stanica i formiranje tumora, amplifikacije gena *MDM2* odgovornog za formiranje tumora, amplifikacije gena regulatora staničnog ciklusa Cyclin D1 te gubitka gena *ATM* koji ima ulogu u popravku DNA. *Ki67* je nuklearni marker proliferacije koji se eksprimira u svim fazama staničnog ciklusa, osim u G_0 fazi. Luminalni podtip B pokazuje visoku vrijednost *Ki67* zbog čega se može lakše identificirati i rezultira lošijom prognozom bolesti, za razliku od luminalnog podtipa A koji pokazuje nisku vrijednost *Ki67* i rezultira boljom prognozom bolesti. Oba podtipa karcinoma dojke imaju specifične genske profile koji dovode do onkogene proliferacije (Fragomeni i sur., 2018; GHR, 2020).

2.2.2. *HER2* pozitivni podtip

U odnosu na *ER*-pozitivne stanice karcinoma dojke, *HER2* pozitivni podtipovi su puno agresivniji i brže rastu zbog toga što njihove stanice mogu primiti više faktora rasta koji se vežu za prekomjerno ekspimirane receptore faktora rasta na površini stanice (Tang i sur., 2016). *HER2* gen kodira za transmembranski receptor koji regulira stanični rast, proliferaciju i preživljavanje kroz različite signalne puteve. U 12 do 20% svih karcinoma dojke dolazi do amplifikacije *HER2* gena koja posljedično dovodi i do njegove prekomjerne ekspresije. Osim amplifikacije i prekomjerne ekspresije *HER2* gena, dolazi do amplifikacije gena regulatora staničnog ciklusa Cyclin D1, prekomjerne ekspresije gena *FGFR4* koji kodira za receptor fibroblasnog faktora rasta 4, mutacije gena *P53* i *PIK3CA* te gena koji kodiraju za *APOBEC*

obitelj proteina. *HER2* pozitivni karcinomi mogu se podijeliti u dvije skupine – *HER2* obogaćeni podtip koji može biti *ER*- i/ili *PR*-negativan i *HER2* pozitivan te luminalni *HER2* podtip koji može biti *ER*- i/ili *PR*-pozitivan i *HER2* pozitivan (Fragomeni i sur., 2018; GHR, 2020).

2.2.3. Trostruko negativni podtip

Trostruko negativni karcinom dojke (TNBC, od engl. *triple negative breast cancer*) je podtip karcinoma dojke heterogene prirode u kojem nije detektirana prisutnost *ER*, *PR* i *HER2* molekularnih markera. TNBC čini ukupno 15 do 20% svih karcinoma dojke i slijedi agresivan klinički tijek, uključujući visoku učestalost metastaza. Za razliku od luminalnih podtipova A i B te *HER2* pozitivnog podtipa, TNBC je češće povezan sa mutacijama gena *BRCA1* i u manjoj mjeri sa mutacijama gena *BRCA2* (Uscanga-Perales i sur., 2016). *BRCA1* i *BRCA2* su tumor supresorski geni koji imaju važnu ulogu u održavanju integriteta genoma putem preciznog popravka DNA homolognom rekombinacijom. Gubitkom funkcije *BRCA* gena dolazi do genomske nestabilnosti koja može rezultirati onkogenom transformacijom ne-tumorskih stanica u tumor-inicirajuće stanice ili matične stanice raka (CSCs, od engl. cancer stem cells) te daljnjim razvojem tumora. CSC stanice imaju dugotrajan oporavak i potencijal da diferenciraju u druge tipove tumorskih stanica te potiču rast tumora (Gorodetska i sur., 2019).

Dokazano je da je molekularna biologija TNBC podtipa različita i heterogena te je identificirano sedam podtipova TNBC koji su prikazani u Tablici 1 (Uscanga-Perales i sur., 2016). BL1 pokazuje visoku vrijednosti *Ki67* proliferacijskog markera i visoku ekspresiju gena koji kodiraju za bazalne citokeratine, poput *KRT5*, te gena koji imaju važnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa, replikaciji DNA i odgovoru stanice na oštećenje DNA. BL2 također pokazuje visoku ekspresiju gena koji kodiraju za bazalne citokeratine i gena *TP63* važnog za formiranje tumora, uz povećanu aktivnost signalnih puteva. U M i MSL podtipovima je detektirana visoka ekspresija gena važnih za staničnu proliferaciju i signalne puteve. LAR podtip pokazuje visoku ekspresiju gena koji kodiraju za luminalne citokeratine, uključujući *KRT7* i *KRT1*, te *AR* gena koji kodira za androgeni receptor (Fragomeni i sur., 2018; GHR, 2020).

Tablica 1. Klasifikacija TNBC, onkologija gena i zastupljenost pojedinog podtipa (Uscanga-Perales i sur., 2016).

Klasifikacija TNBC	Onkologija gena	Zastupljenost podtipa (%)
bazalni podtip 1 (BL1)	proliferacija stanica i odgovor na oštećenje stanice	10
bazalni podtip 2 (BL2)	signalizacija faktora rasta sa mioepitelnim markerima	20
imunomodulacijski podtip (IM)	signalizacija posredovana imunološkom sinapsom	20
mezenhimalni podtip(M)	epitelno-mezenhimska tranzicija i diferencijacija	20
metaplastični podtip (MSL)	epitelno-mezenhimska tranzicija i diferencijacija; angiogeneza i signalizacija faktora rasta	10
luminalni androgen-ovisni podtip (LAR)	hormonska signalizacija posredovana androgenim receptorom	10
nestabilni podtip	proliferacija stanica i odgovor na oštećenje stanice	10

2.3. RAS-RAF-MAPK SIGNALNI PUT

2.3.1. Uloga i struktura ERBB2 receptora

ERBB/HER protein-tirozin kinaze (RTK, od engl. *receptor tyrosine kinase*), među koje spada i receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR, od engl. *epidermal growth factor receptor*), jedne su od najproučavanijih obitelji receptora koje imaju važnu ulogu u signalizaciji stanice. Uključeni su u regulaciju apoptoze, progresiju staničnog ciklusa, modificiranje citoskeleta, diferencijaciju, razvoj, imunosti odgovor, funkcioniranje živčanog sustava i transkripciju. Njihovom deregulacijom dolazi do nastanka različitih bolesti, uključujući i razvoj karcinoma. *ERBB* obitelj gena se sastoji od četiri člana, a to su *EGFR/ERBB1/HER1*, *NEU/ERBB2/HER2*, *ERBB3/HER3* i *ERBB4/HER4* (Roskoski, 2014). *ERBB2* gen je lokaliziran na dužem kraku kromosoma 17q12q21 i kodira za transmembranski tirozin-kinazni receptor ERBB2 molekulske mase 185 kDa (Van Bockstal i sur., 2020). ERBB2 je jedan od ključnih članova EGFR obitelji jer je njegov linearni signalni put uključen u pro-onkogeni RAS-RAF-MAPK signalni put koji postupno dovodi do aktivacije transkripcije ciljanih gena.

Receptor je građen od tri domene – ekstracelularne odnosno ligand-vezujuće domene, transmembranske domene i citoplazmatske tirozin-kinazne domene, isto kao i ostali članovi EGFR obitelji (Sidhanth i sur., 2017). Ekstracelularna domena je podijeljena na subdomenu I, subdomenu II, subdomenu III i subdomenu IV. Subdomene I i III su leucinom bogati fragmenti koji sudjeluju u vezanju liganda, subdomena II formira homodimere ili heterodimere s analognim domenama ostalih članova EGFR obitelji, dok subdomena IV može formirati disulfidne mostove sa subdomenom II, što joj omogućuje povezivanje s transmembranskom domenom. Važno je istaknuti da su subdomene II i IV cisteinom bogati fragmenti koji ne sudjeluju u vezanju liganda (Wee i Wang, 2017).

Ekstracelularna domena ERBB2 receptora se razlikuje od ekstracelularnih domena ostalih EGFR članova po tome što poprima otvorenu konformaciju. Otvorena konformacija izlaže dimerizacijsku petlju u subdomeni II čime postaje dostupna za dimerizaciju ERBB2 s ostalim receptorima (Elizalde i sur., 2016). Transmembranska domena je hidrofobna membranska struktura u obliku heliksa koja je građena od 23 aminokiseline. Ima ulogu u učvršćivanju receptora za membranu i smatra se da sudjeluje u dimerizaciji putem N-terminalnog kraja koji se nalazi na kraju heliksa. Intracelularna domena sadrži jukstamembranski segment dugačak oko 40 aminokiselina, tirozin-kinaznu regiju i C-terminalni

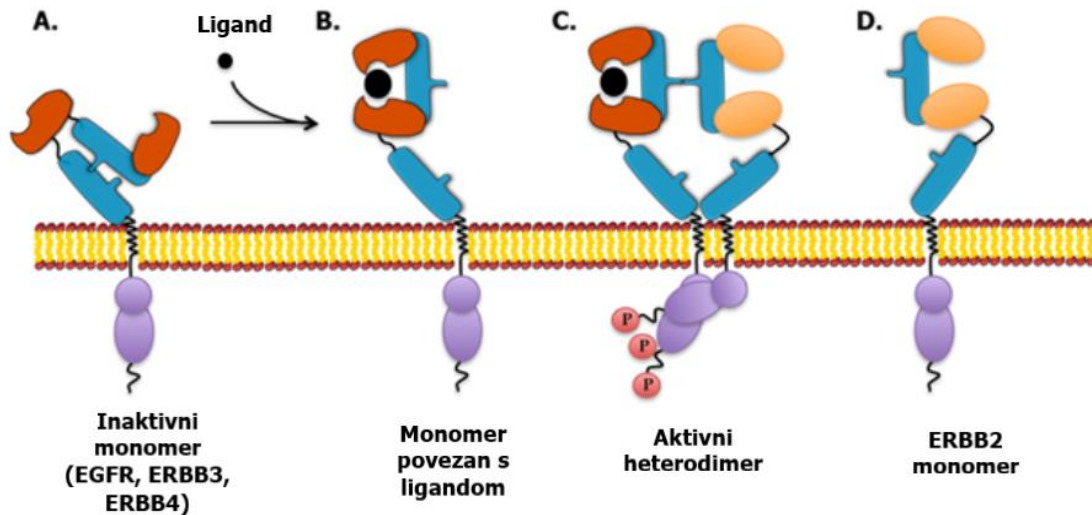
rep. Tirozin-kinazna regija se može podijeliti na N-dio koji pretežno ima strukturu β -nabrane ploče i C-dio koji pretežno ima strukturu α -uzvojnice. Između N- i C-dijela nalazi se mjesto za vezanje ATP-a. N- i C-dio sudjeluju u transautofosforilaciji prilikom koje dolazi do interakcije između N-dijela jednog receptora i C-dijela drugog receptora. Tirozin-kinazna regija sadrži i ostatke lizina koji se navode kao primarna mjesta za vezanje ubikvitina prilikom ubikvitinacije receptora. C-terminalni dio sadrži tirozinske ostatke koji se fosforiliraju i time omogućuju vezanje različitih intracelularnih proteina za aktivirani receptor. Intracelularni proteini nakon toga sudjeluju u provođenju signala dalje u stanici (Wee i Wang, 2017).

2.3.2. Aktivacija ERBB2 receptora

Specifična struktura ERBB2 receptora objašnjava činjenicu da unatoč odsutnosti liganda koji se direktno veže na ERBB2, ovaj receptor sudjeluje u formaciji ERBB dimera koja je inducirana pomoću liganda (Elizalde i sur., 2016). Dimerizacija je proces u kojem dva EGFR monomera ulaze u interakciju i tako formiraju dimer. Vezanje liganda za jedan od receptora uzrokuje konformacijsku promjenu kojom se otvara dimerizacijska domena u ekstracelularnom dijelu receptora. Time se olakšava vezanje otvorene domene sa sličnom domenom u drugom EGFR monomeru, što rezultira nastajanjem dimera receptora (Pecorino, 2016). ERBB2 receptor formira heterodimere s ERBB1 ili ERBB4 receptorom ovisno o ligandu. Ukoliko se kao ligand veže EGF, ERBB2 tvori heterodimere s ERBB1, a u prisutnosti neurgulina kao liganda, ERBB2 tvori heterodimere s ERBB4 (Sidhanth i sur., 2017). S druge strane, ERBB3 je katalitički inaktivan jer se ATP ne može vezati za njegovu kinaznu domenu i nema mogućnost homodimerizacije. Signalne funkcije ERBB3 su posredovane kinaznom aktivnošću receptora koji s njim tvore heterodimere. ERBB2 i ERBB3 su individualno nepotpune signalne molekule, no formiranjem zajedničkog kompleksa nastaje najaktivniji signalni heterodimer EGFR obitelji važan za mnoge biološke i razvojne procese (Moasser, 2007). ERBB2 heterodimeri povećavaju učinkovitost za vezanje liganda, što omogućuje produženo djelovanje aktivirajućih signala. S obzirom da ERBB2 receptor nema ligand, heterodimerizacija s drugim ERBB receptorima rezultira transautofosforilacijom tirozinskih ostataka koji služe kao priključna mjesta adaptirajućih proteina (Slika 2.).

Transautofosforilacija je važna za privlačenje i aktivaciju važnih signalnih molekula (Sidhanth i sur., 2017). Konformacijska promjena receptora nastala uslijed vezanja liganda, također djeluje na intramolekulske interakcije koje dovode do kinazne aktivacije. Promjena u strukturi receptora omogućuje pristup ATP-a i supstratne molekule katalitičkoj kinaznoj

domeni. Mala udaljenost receptora, postignuta njihovom dimerizacijom, omogućuje kinaznoj domeni jednog receptora dimera da fosforilira drugi receptor dimera te da drugi receptor dimera fosforilira prvi receptor dimera. Intermolekulska transautofosforilacija događa se na mnogobrojnim tirozinskim ostacima koji pripadaju citoplazmatskoj domeni (Pecorino, 2016).



Slika 2. Shematski prikaz aktivacije ERBB2 receptora. A) U odustnosti liganda, EGFR, ERBB3 i ERBB4 imaju zatvorenu konformaciju, B) Subdomene I i III sudjeluju u vezanju liganda zbog kojeg receptori poprimaju otvorenu konformaciju pogodnu za dimerizaciju, C) Dimerizacija ERBB2 receptora s ostalim članovima EGFR obitelji dovodi do transautofosforilacije tirozinskih ostataka C-terminalnog kraja citoplazmatske tirozin-kinazne domene, D) ERBB2 zbog svoje posebne strukture ima otvorenu konformaciju i može ući u interakcije s ostalim ERBB receptorima (Marchini i sur., 2013).

2.3.3. Aktivacija Ras, Raf i MAPK proteina

Nakon transautofosforilacije receptora, slijedi translokacija specifičnih proteina iz citoplazme stanice prema staničnoj membrani. Fosforilirani tirozinski ostaci imaju veliki afinitet za proteine koji sadrže Src homologne domene. Src homologne domene 2 (SH2, od engl. *Src homology 2*) i Src homologne domene 3 (SH3, od engl. *Src homology 3*) posreduju u stvaranju protein-protein interakcija u signalnim putevima aktiviranim pomoću RTK. SH2 domene prepoznaju i vežu se za posebne aminokiselinske sekvence koje se nalaze bliže C-terminalnom dijelu u odnosu na fosforilirane tirozinske ostatke, a SH3 domene prepoznaju i vežu se za prolin i hidrofobne aminokiselinske ostatke. SH2 i SH3 domene se nalaze u istom proteinu, a jedan

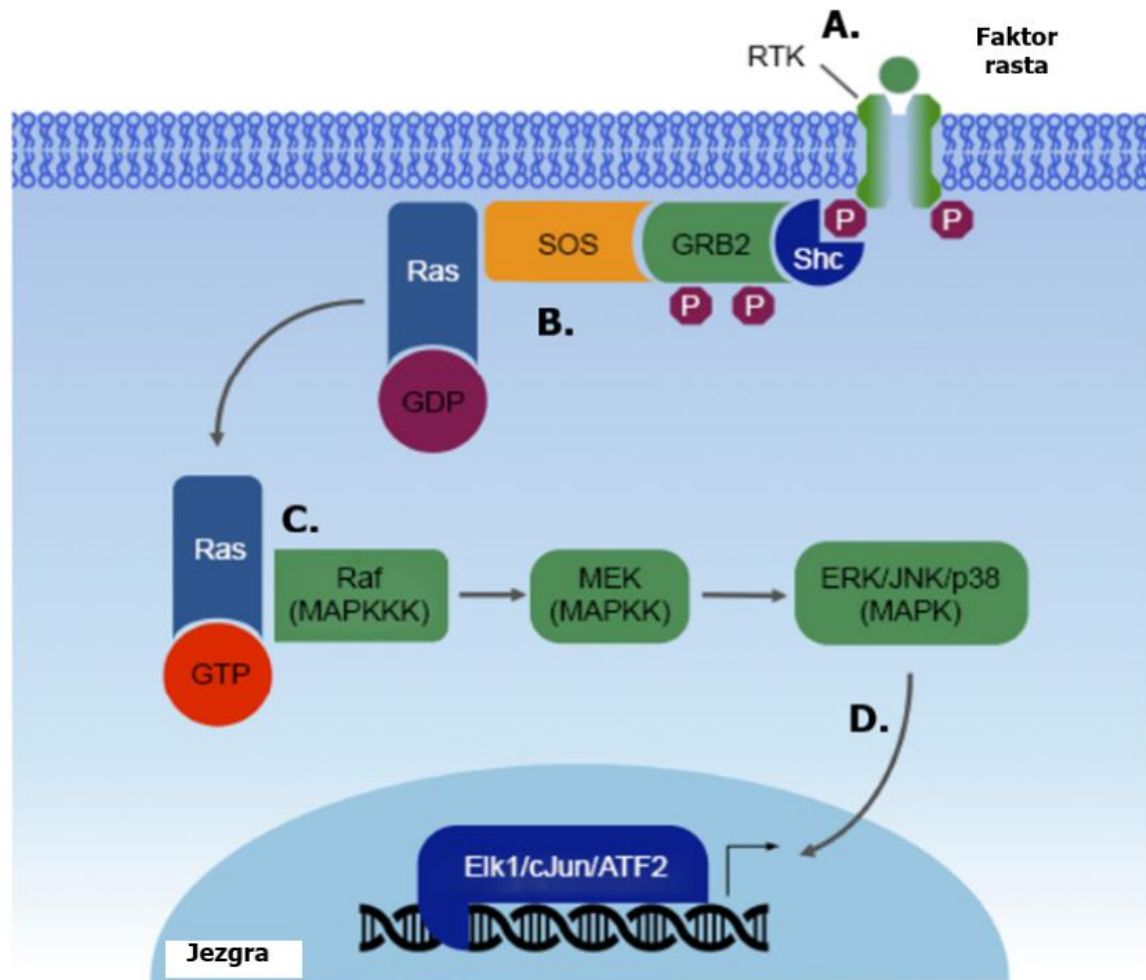
od takvih proteina koji sadrže oba dvije domene je Grb2. Grb2 protein prepoznaje fosforilirani ERBB2 receptor putem SH2 domena i olakšava translokaciju proteina iz citoplazme prema membrani pomoću SH3 domena. Dvije SH3 domene Grb2 proteina ulaze u interakciju sa SH3 domenama centralnog SOS proteina koji olakšava aktivaciju RAS proteina.

RAS se smatra glavnom molekulom koja prenosi signal od faktora rasta dalje u brojne važne signalne puteve (Pecorino, 2016). Najprije formira mjesto vezanja za SOS translokaciju čime se potiče pretvorba GDP-a vezanog za RAS u GTP pomoću GTP-a SOS proteina. Pretvorba GDP-a u GTP dovodi do konformacijske promjene RAS proteina koji iz inaktivnog prelazi u aktivni oblik. Aktivnost RAS proteina se prekida njegovom unutrašnjom GTPaznom aktivnošću kojom GTP prelazi natrag u GDP te RAS ponovno postaje inaktivan. Aktivni RAS doprinosi aktivaciji tri glavna efektora koji prevode signal u različite signalne puteve, a jedan od njih je i CRAF, također poznat i pod nazivom RAF-1.

RAF-1 je serin-treonin protein-kinaza koja se sastoji od N-terminalne regulacijske domene i C-terminalne kinazne domene. RAS inicira RAF-1 aktivaciju tako da ga translocira iz citoplazme do membrane stanice gdje se odvija dodatna aktivacija RAF-1 proteina. RAF-1 može dimerizirati s drugom RAF-1 molekulom ili BRAF proteinom kako bi aktivirao svoju kinaznu aktivnost (Wee i Wang, 2017). Aktivacija RAF-1 proteina uključuje i otpuštanje njegovog auto-inhibitornog mehanizma te posljedično dolazi do prelaska RAF-1 inaktivnog oblika u RAF-1 aktivni oblik. Aktivni RAF-1 zatim provodi signal s površine stanice daleko u unutrašnjost stanice. S obzirom da je RAF-1 kinaza, on signal prenosi dalje tako da fosforilira iduću molekulu sastavnicu RAS-RAF-MAPK signalnog puta, a to je protein-kinaza aktivirana mitogenom, poznatija kao MAPKK ili MEK.

MAP kinaze predstavljaju obitelj serin-treonin kinaza koje povezuju aktivirani RAS i regulaciju ekspresije gena. Provođenje signala dalje u stanici obuhvaća nekoliko fosforilacijskih koraka vođenih pomoću tri MAP kinaze - RAF-1 ili MAPKKK koja fosforilira iduću MEK ili MAPKK, a ona zatim fosforilira MAPK ili ERK. MEK kinaza je dvostruko-specifična kinaza koja fosforilira i tirozinske i treoninske ostatke MAPK čime ju aktivira. Aktivnost mnogih transkripcijskih faktora je regulirana fosforilacijom zbog čega MAP kinaze mogu utjecati na njihovu aktivnost putem fosforilacije (Slika 3) (Pecorino, 2016). Aktivirana MAPK se translocira u jezgru kako bi aktivirala transkripcijske faktore trostrukog kompleksnog faktora koji ima glavnu ulogu u indukciji neposrednih ranih gena (IEG, od engl. *immediate early gene*).

Produkti IEG gena uključuju c-FOS i c-MYC koji induciraju tzv. gene kasnog odgovora. MAP kinaza aktivira i c-JUN protein koji zajedno sa c-FOS proteinom čini jednu od sastavnica aktivacijskog proteina 1 (AP-1, od engl. *activator protein 1*). AP-1 kompleks ima ulogu transkripcijskog faktora koji se veže za promotor Cyclin D1 regulatora. Cyclin D1 je pokretač G₁ faze staničnog ciklusa te se vezanjem AP-1 potiče njegova transkripcija (Wee i Wang, 2017).



Slika 3. Ras-Raf-MAPK signalni put. A) Specifični ligand se veže za transmembranski receptor tirozin-kinazu, B) Aktivirani receptor translocira Grb2 i SOS prilikom čega se inaktivni RAS-GDP prevodi u aktivni RAS-GTP, C) RAS-GTP se translocira i fosforilira MAPKKK, MAPKKK fosforilira MAPKK koja konačno fosforilira MAPK, D) MAPK se translocira u jezgru gdje dovodi do fosforilacije AP-1 transkripcijskog faktora koji regulira ekspresiju ciljanih gena (Velloso i sur., 2017).

2.4. RAS-RAF-MAPK SIGNALNI PUT U KARCINOMIMA DOJKE

2.4.1. Amplifikacija i prekomjerna ekspresija *HER2* gena

Povećanje broja kopija određene kromosomske regije poznato je kao amplifikacija i predstavlja jedan od najčešćih mehanizama kojima se proto-onkogeni pretvaraju u onkogene. Amplifikacija gena je potaknuta dvolančanim lomovima DNA i događa se samo u stanicama koje mogu prolaziti kroz stanični ciklus s oštećenom DNA. Amplificirana DNA može formirati nizove uzastopno ponovljenih sekvenci, poput tzv. "head-to-head" i "head-to-tail" obrnutih uzastopnih ponavljanja, duž cijelog kromosoma. Navedena ponavljanja su citološki vidljiva kao homogeno obojana područja (HSR, od engl. *homogeneously staining region*). Alternativno, amplificirana DNA se može pohraniti u jedinice zvane "double minutes" (DM) koje se nalaze izvan kromosoma. Tijekom mitoze, HSR regije dijele se na isti način kao i ostale kromosomske regije, dok DM jedinice ne sadrže centromere i ne vežu se za diobeno vreteno, zbog čega nisu ravnomjerno raspoređene između stanica nastalih diobom.

Vicario i sur. (2015) dokazali su da se amplificirani *HER2* gen nalazi u DM ili HSR regijama u 30 do 60 % *HER2* pozitivnih karcinoma dojke. Analizu su proveli korištenjem dvostruke *in situ* hibridizacije prilikom koje su *HER2*-amplificirane stanične linije karcinoma dojke tretirali s kolhicinom, lijekom koji zadržava stanice u metafazi. Dobivena su dva uzorka, od kojih se jedan sastojao od gusto zbijenih točkica u razdvojenim dijelovima jezgre, dok se drugi sastojao od malih raspršenih točkica raspoređenih kroz cijelu jezgru. Prvi uzorak je predstavljao HSR regije koje su odgovarale nizu uzastopno ponovljenih sekvenci, a drugi uzorak je odgovarao amplifikaciji *HER2* gena u DM jedinicama (Vicario i sur., 2015).

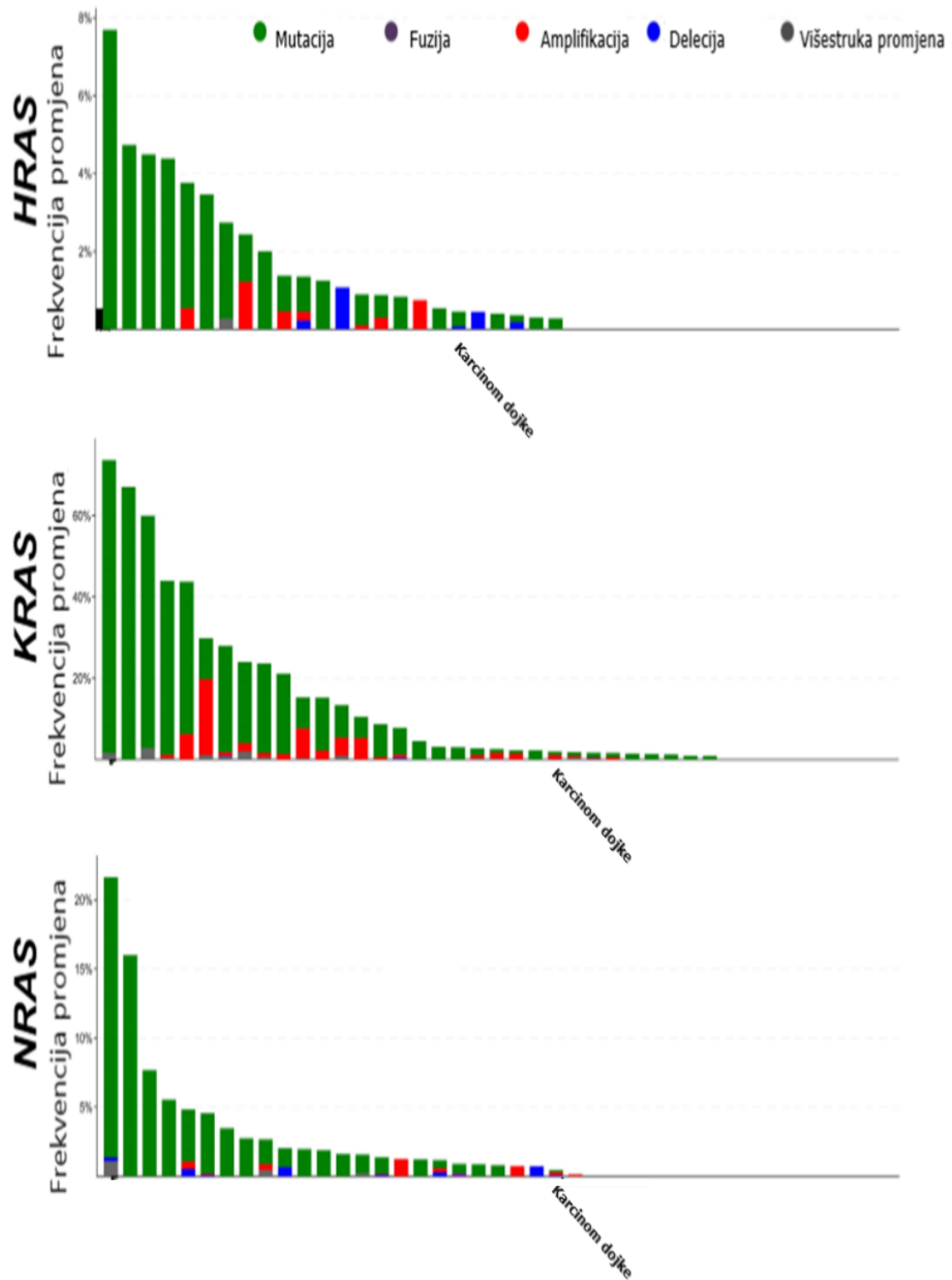
U otprilike 25% *HER2* pozitivnih karcinoma dojke, *HER2* gen je amplificiran do 20 puta više u odnosu na broj kopija kromosoma 17. Amplifikacijom *HER2* gena potiče se ekspresija *HER2* gena te posljedično dolazi do povećanja broja ERBB2 receptora na površini tumorskih stanica s normalnih 20 000 na dva milijuna molekula receptora po stanici (Hicks i Kulkarni, 2008). Prekomjerna ekspresija *HER2* gena u karcinomima dojke uzrokuje povećanu homodimerizaciju (ERBB2-ERBB2) i heterodimerizaciju (ERBB2-ERBB3) koje potiču snažnu pro-onkogenu signalizirajuću kaskadu (Yan i sur., 2015).

2.4.2. Onkogene mutacije u RAS-RAF-MAPK signalnom putu

Abnormalnosti u RAS-RAF-MAPK signalizaciji utječu na većinu staničnih procesa koji su obično povezani s razvojem karcinoma. Prema Velloso i sur. (2017), istraživanja su pokazala da je veća učestalost modificiranih stanica s aktiviranim RAS-RAF-MAPK signalnim putem prisutna u karcinomima dojke. U stanicama karcinoma, aktivacija RAS-RAF-MAPK signalnog puta događa se u ranijim koracima signalnog puta i posljedica je različitih faktora, kao što su prekomjerna ekspresija receptora, aktivacija mutacija u receptorima, autokrini ili produžena parakrinska produkcija aktivirajućih liganada. Mutacije duž RAS-RAF-MAPK signalnog puta, koje mogu dovesti do razvoja karcinoma, često se nalaze u genima koji kodiraju za RAS i BRAF proteine (Velloso i sur., 2017).

Onkogeni aktivacija RAS izoformi uzrokuje inicijaciju i progresiju tumora. Postoje četiri visoko homologne RAS izoforme molekulske mase oko 21 kDa - HRAS je kodiran genom *HRAS*, NRAS inačica kodirana je *NRAS* genom te varijante KRAS4A i KRAS4B nastale alternativnim splicingom *KRAS* gena (Galiè, 2019). Iako se navedene izoforme podudaraju u velikom dijelu sekvence, značajne razlike pojavljuju se u C-terminalnim tzv. hipervarijabilnim regijama i post-translacijskim modifikacijama. Razlike u sekvencama i modifikaciji omogućuju različito djelovanje RAS izoformi (Degirmenci i sur., 2020). RAS proteini funkcioniraju kao dvostruki prekidači koji se kreću između aktivnog GDP-veznog stanja i neaktivnog GTP-veznog stanja, ovisno o statusu aktivacije uzvodnih receptora. Prebacivanje između aktivnog i neaktivnog stanja modulirano je komplementarnim djelovanjem enzima koji potiču ili GDP u GTP pretvorbu (tzv. GEFs, od engl. *guanine exchange factors*) ili GTP u GDP pretvorbu (tzv. GAPs, od engl. *GTPase – activating proteins*).

Onkogeni aktivacija RAS gena je najčešće uzrokovana točkastom mutacijom koja blokira odgovor RAS-a na modulaciju posredovanu GEF i GAP proteinima te održava RAS proteine i njihove nizvodne signalne puteve u izrazito aktivnom stanju. Važna karakteristika RAS onkogeni je ta da ne može transformirati primarne stanice bez prisustva drugog onkogeni poput *MYC*. Unatoč navedenom, onkogeni funkcija RAS proteina se ne oslanja potpuno na mutacije izoformi. Prekomjerna ekspresija RAS proteina, hiperaktivacija uzvodnih RAS aktivatora i poremećaj aktivnosti RAS regulatora mogu doprinijeti promicanju i održavanju tumorske sposobnosti. Analizom učestalosti promjena pojedinih RAS izoformi u karcinomu dojke i ostalim tipovima tumora, Galiè je dobio rezultate prikazane na Slici 4.



Slika 4. Učestalost genskih promjena (mutacija, fuzija, amplifikacija, delecija, višestruka promjena) RAS gena (*HRAS*, *KRAS*, *NRAS*) u karcinomu dojke i različitim tipovima tumora (Galiè, 2019).

KRAS izoforma je najčešće mutirana RAS izoforma u karcinomu dojke te za razliku od mutiranih HRAS i NRAS izoformi, rezultira puno lošijim kliničkim ishodom. RAS i njegovi regulatori imaju naročito veliku ulogu u progresiji TNBC podtipa, posebice 3'-netranslatirana regija KRAS varijante koja regulira njegov razvoj. Također, divlji tip *NRAS* inačice gena se najčešće pojavljuje u navedenom podtipu (Galiè, 2019).

RAF proteini, ključne komponente RAS-RAF-MAPK signalnog puta, uključuju tri izoforme- CRAF, BRAF i ARAF. Sve RAF izoforme sadrže tri konzervirane regije, a to su konzervirana regija 1 koja sadrži RAS-vezujuću domenu i cisteinom bogatu regiju, konzerviranu regiju 2 koja je karakterizirana sekvencom bogatom serinom i treoninom te konzervirana regija 3 koja se sastoji od kinazne domene s kiselim N-terminalnim krajem (NTA, od engl. *acidic N-terminus*) i regulacijskim C-terminalnim krajem. Prema strukturi, RAF kinaze se mogu podijeliti na dvije funkcionalne regije, a to su regulacijska i kinazna domena. Iako su slične strukture, RAF izoforme imaju vrlo različitu aktivnost i drugačije uloge u stanici. CRAF pokazuje srednju kinaznu aktivnost i ima glavnu ulogu u induciranju RAS genskih sindroma. ARAF je rijetko genski promijenjen i pokazuje najnižu kinaznu aktivnost. BRAF je izoforma koja pokazuje najveću kinaznu aktivnost između sve tri izoforme zbog fosforiliranog NTA motiva. U genomima karcinoma, BRAF je glavna meta onkogenih točkastih mutacija te se BRAF(V600E) mutirana inačica javlja u više od 90% karcinoma (Degirmenci i sur., 2020).

U strukturi onkogenog BRAF-a, prisutni su fosfo-mimetički aminokiselinski ostatak Asp449 i osnovni fosforilirani Ser446 ostatak koji daje konstantan negativan naboj njegovoj funkcionalno ključnoj N-regiji. Takva struktura potiče aktivaciju BRAF-a, a dodatno uz prisutnost točkastih mutacija dolazi do pretvorbe BRAF-a u konstitutivno aktivnu kinazu. Prevladavajuća onkogeno mutacija koja uzrokuje povećanu BRAF aktivaciju je supstitucija glutamata s valinom na poziciji 600 (V600E) čime nastaje BRAF(V600E) mutirana inačica. Mutacija je lokalizirana u aktivacijskom segmentu BRAF kinazne domene između dva regulacijska fosforilacijska mjesta Thr599 i Ser602 te ju prevodi u aktivno stanje. V600E potiče stvaranje ionskih interakcija između aminokiselinskih ostataka Lys507 i Glu600, stabilizirajući na taj način aktivnu konformaciju aktivacijskog segmenta. Fosforilacijom aminokiselinskih ostataka Thr599 i Ser602 aktivacijskog segmenta ili supstitucijom nabijenih aminokiselina s Val600, potiče se prelazak BRAF kinaze iz inaktivne u aktivnu konformaciju.

Uz mutacije koje uzrokuju kinaznu aktivaciju, pojedine supstitucije mogu dovesti do srednje ili niske kinazne aktivnosti. Podgrupa takvih mutacija inicira MEK-MAPK signalizaciju heterodimerizacijom koja je potaknuta aktiviranjem CRAF-a. Neovisno o BRAF katalitičkoj funkciji, dimerizacija BRAF-a s RAF monomerima potiče aktivaciju CRAF-a vezanog za BRAF. BRAF mutanti koji imaju oštećenu kinaznu domenu koegzistiraju s RAS mutiranim izoformama.

Međutim, za razliku od BRAF mutanata divljeg tipa i mutanata s oštećenom kinaznom domenom, u karcinomima s BRAF(V600E) mutantom dolazi do hiperaktivacije MEK-MAPK signalnog puta koja rezultira povećanom proliferacijom i izbjegavanjem apoptoze te su neovisni o RAF dimerizaciji. Budući da BRAF(V600E) ne ovisi o dimerizaciji i uzvodnoj regulaciji, on zaobilazi inhibicijski učinak negativne povratne regulacije MAP kinaze koja rezultira niskom razinom RAS-GTP u stanicama karcinoma s BRAF mutacijama. BRAF(V600E) mutant nije vezan za RTK/RAS aktivaciju i djeluje kao funkcionalni monomer, stalno aktivirajući MEK te citoplazmatsku i nuklearnu MAPK signalizaciju (Stefan i Bister, 2017).

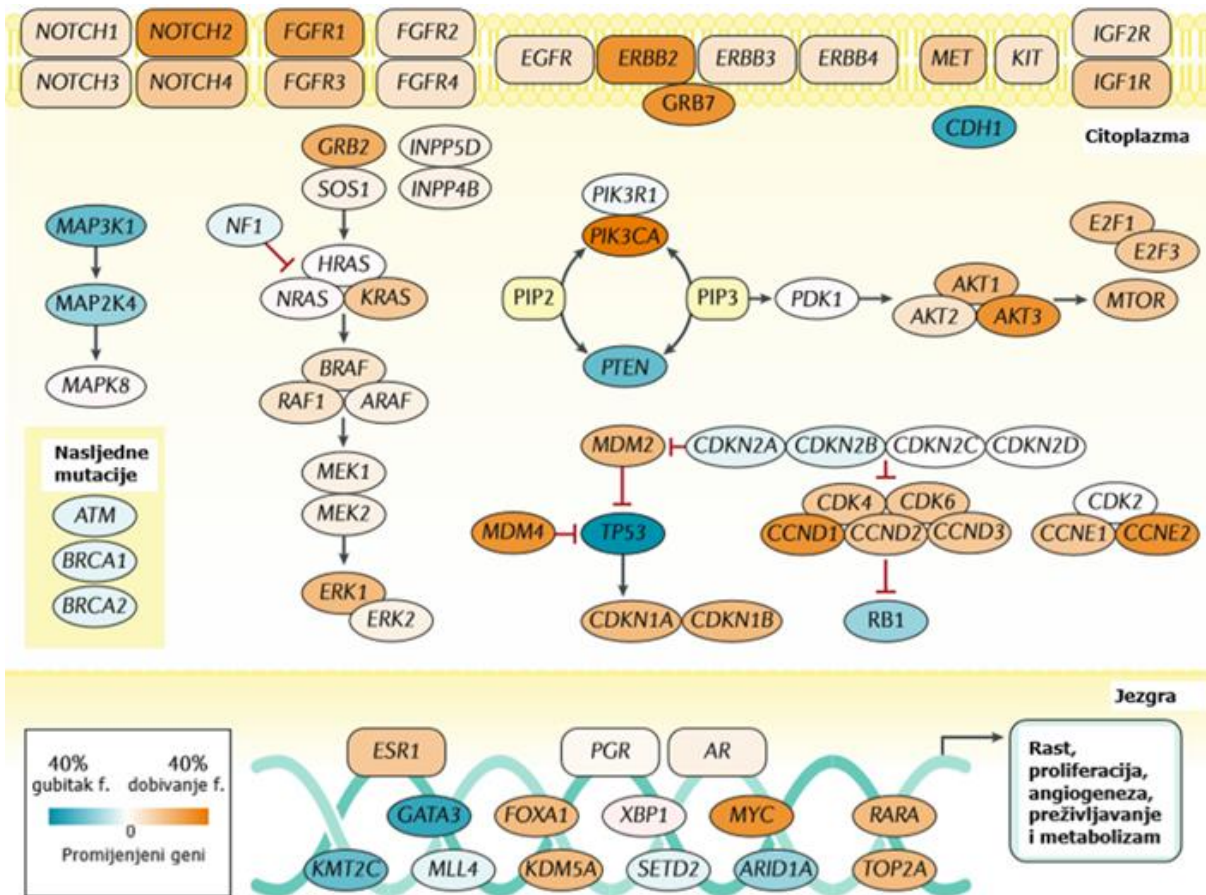
Jung i sur. (2016) proveli su istraživanje o lokalizaciji mutiranog BRAF-a u humanom tkivu karcinoma dojke koristeći protutijela specifična za BRAF(V600E) protein. Imunohistokemijsko bojanje za detekciju protutijela specifičnog za BRAF(V600E) protein provedeno je u 230 različitih uzoraka karcinoma dojke i 132 TNBC. U 30 (13%) uzoraka, od ukupnih 230, detektirana je prisutnost BRAF(V600E) u citoplazmi, dok je u 17 (7,4%) uzoraka detektirana prisutnost BRAF(V600E) u jezgri. U 4 (3%) uzorka, od ukupno 132 uzorka TNBC, detektirana je prisutnost BRAF(V600E) u citoplazmi, dok je u 10 (7,6%) detektirana prisutnost BRAF(V600E) u jezgri. Istraživanjem je otkriveno da je nenormalna prisutnost BRAF(V600E) u jezgri povezana s TNBC i kliničko-patološkim faktorima kao što su *ER* i *PR* negativnost (Jung i sur., 2016).

2.4.3. Integracija RAS-RAF-MAPK signalnog puta

Karcinom je vođen genskim i epigenetičkim promjenama koje su povezane sa signalnim putevima koji upravljaju staničnom proliferacijom, smrti, diferencijacijom i pokretljivošću. Aktivacijom mutacija proto-onkogeni dolazi do hiperaktivacije tih signalnih puteva, dok inaktivacijom tumor supresora dolazi do isključenja ključnih negativnih regulatora signalizacije. Prevladavajući signalni putevi koji reguliraju normalan razvoj mliječnih žlijezda i funkcije matičnih stanica karcinoma dojke su ER signalni put, *HER2* signalni put i kanonski Wnt signalni put. Deregulirani signalni putevi poput PI3K/AKT/mTOR signalnog puta, signalnog puta Cyclin-

ovisnih kinaza, tzv. Notch signalnog puta i Sonic Hedgehog signalnog puta, također doprinose razvoju karcinoma dojke (Feng i sur., 2018).

Karcinom dojke je heterogene prirode zbog mnoštva promjena na genskoj i molekularnoj razini koje utječu na navedene signalne puteve (Velloso i sur., 2017). Podaci TCGA o broju kopija DNA karcinoma dojke i somatskih mutacija korišteni su u svrhu određivanja frekvencije svake genomske promjene kod 792 pacijenta s različitim podtipovima karcinoma dojke. Dokazano je da su najčešće mutirani i/ili amplificirani geni u stanicama karcinoma dojke *TP53* (41 % karcinoma dojke), *PIK3CA* (30 %), *MYC* (20 %), *PTEN* (16 %), *CCND1* (16 %), *HER2* (13 %), *FGFR1* (11 %) i *GATA3* (10 %) (Slika 5). Većina mutacija koje pogađaju pokretače razvoja karcinoma dojke su izuzetno rijetke, stoga je većina karcinoma dojke uzrokovana višestrukim mutacijama koje djeluju kumulativno (Harbeck i sur., 2019).



Slika 5. Molekularne mutacije koje uzrokuju karcinom dojke (Harbeck i sur., 2019).

Kako bi se shvatila integrativna uloga navedenih signalnih puteva u različitim fiziološkim i patološkim uvjetima, nužno je uzeti u obzir njihovu kompleksnu umreženu komunikaciju (Velloso i sur., 2017). Steroidni hormoni doprinose karcinogenezi u karcinomu dojke djelujući na stanični rast, razvoj, diferencijaciju i homeostazu. Estrogeni aktiviraju receptore estrogena $ER\alpha$ i $ER\beta$ te membranske receptore estrogena mER. Ligandom aktivirani nuklearni ER dimeriziraju i premještaju se u jezgru gdje se vežu za DNA i reguliraju aktivnost različitih gena, dok mER aktiviraju različite signalne puteve, uključujući RAS-RAF-MAPK i PI3K/AKT/mTOR signalne puteve (Toss i sur., 2017). U estrogen-ovisnim podtipovima, estrogen aktivira faktore rasta koji povećavaju aktivnost RAS-RAF-MAPK signalnog puta, dok u estrogen-neovisnim podtipovima on stimulira rast nakon što je aktiviran drugim peptidnim hormonima poput EGF, inzulina i prolaktina. Aktivirani RAS-RAF-MAPK signalni put također može dovesti do fosforilacije ER direktno ili indirektno, povećavajući tako njegovu transkripcijsku efikasnost, što predstavlja važnu značajku hormonski-ovisnih karcinoma dojke (Velloso i sur., 2017).

Aktivacijom *ER* putem RAS-RAF-MAPK dolazi do pojačane ekspresije *ER*-povezanih gena, ubrzanja rasta tumora i pojačavanja *ER*-posredovane signalizacije. Istraživanjem je dokazano da je MAPK ekspresija veća u *ER*-pozitivnim u odnosu na *ER*-negativne stanične linije karcinoma dojke te u *ER+*/*HER2*- u odnosu na *ER+*/*HER2+* stanične linije karcinoma dojke. Isto tako, većina MAP kinaza je pokazala veću ekspresiju u *ER+*/*HER2*- u odnosu na *ER*-/*HER2*- stanične linije karcinoma dojke. U *ER*- staničnim linijama, utvrđena je pozitivna korelacija između MAP kinaza i *HER2* prekomjerne ekspresije (Ahmad i sur., 2016).

Osim što aktivacija ERBB2 receptora pokreće signalizaciju RAS-RAF-MAPK signalnog puta, ona pokreće i signalizaciju staničnih komponenti poput glikogen sintaze kinaze 3 te PI3K/AKT/mTOR signalnog puta, ističući važnost procesa integracije signala i njegove transdukcije u progresiji i razvoju karcinoma dojke. Važno je razumjeti da su RAS-RAF-MAPK i PI3K/AKT/mTOR signalni putevi povezani različitim točkama. GSK-3 ima važnu ulogu u regulaciji RAS-RAF-MAPK i PI3K/AKT/mTOR signalnih puteva i predstavlja složenost tih interakcija inhibicijom i aktivacijom različitih molekula koje su uključene u navedene signalne puteve (Ortega i sur., 2020). PKC i PAK1 koji su aktivirani u PI3K/AKT/mTOR signalnom putu, mogu fosforilirati RAF-1. Nakon što ga PI3K aktivira, AKT također može fosforilirati i inhibirati B-RAF (Velloso i sur., 2017).

Aktivacija i prekomjerna ERBB2 receptora su značajno povezane s invazivnim i agresivnim fenotipom karcinoma dojke i lošom prognozom bolesti. Nekoliko *in vitro* istraživanja

ukazalo je na potrebu dodatnih molekularnih udara kako bi se izazvala maligna transformacija posredovana prekomjernom ekspresijom ERBB2. U netransformiranoj MCF10A epitelnoj staničnoj kulturi dojke, ERBB2-posredovana stanična transformacija događa se nakon aktiviranja TGF β signalnog puta. Dodatna istraživanja MCF10A staničnih kultura dovela su do identifikacije signalnih proteina koji su već uključeni u organizaciju citoskeleta i invaziju stanica karcinoma. Konkretno, istraživanja sugeriraju da PAK obitelj serin-treonin kinaza zajedno s ERBB2 sudjeluje u transformaciji epitelnih stanica mliječne žlijezde aktivirajući RAS-RAF-MAPK i AKT signalne puteve (Camacho-Leal i sur., 2017).

2.4.4. Tretiranje RAS-RAF-MAPK signalnog puta u svrhu liječenja karcinoma dojke

U trostruko negativnom i *HER2* pozitivnom karcinomu dojke, preoperativna odnosno neoadjuvantna terapija postala je uobičajena opcija liječenja karcinoma dojke. Ovisno o podtipu karcinoma dojke, terapijska osnova uključuje endokrinu terapiju, ciljanje anti-HER2 i kemoterapiju (Harbeck i Gnant, 2017). U patogenezi karcinoma dojke, identificirane su dvije glavne molekularne mete, a to su ER α i ERBB2 receptori. Pacijenti s amplificiranim i prekomjerno eksprimiranim ERBB2 imaju koristi od ERBB2-ciljane terapije, uključujući anti-ERBB2 protutijela kao što su trastuzumab i pertuzumab te male molekule tirozin-kinaznih inhibitora kao što su lapatinib i neratinib (Waks i Winer, 2019).

Trastuzumab je humanizirano monoklonsko protutijelo koje ima visoki afinitet za subdomenu IV ekstracelularne domene ERBB2 receptora. Postoji nekoliko pretpostavljenih mehanizama kojima trastuzumab djeluje, a oni uključuju prevenciju ligand-neovisne dimerizacije, indukciju endocitotske destrukcije receptora, indukciju stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelu i inhibiciju cijepanja ekstracelularne domene. Trastuzumab učinkovito ometa stvaranje ligand-neovisnih dimera, ali ne uspijeva blokirati ligandom inducirane dimere (Monteiro i sur., 2015). Ovi mehanizmi rezultiraju smanjenjem aktivacije PI3K/AKT i MAPK signalnih puteva. Konačan rezultat direktnog i indirektnog djelovanja prethodno navedenih mehanizama trastuzumaba je dvostruki – dolazi do povećanog zaustavljanja staničnog ciklusa i apoptoze te suzbijanja stanične proliferacije i angiogeneze. Unatoč tome, glavni nedostaci upotrebe trastuzumaba su potencijalna kardiotskičnost i otpornost na liječenje (Maximiano i sur., 2016).

Lapatinib je dvostruki tirozin-kinazni inhibitor koji može ciljati tirozin-kinazne domene i EGFR i ERBB2, djelujući kao konkurent ATP-u. Interakcijom s receptorima sprječava fosforilaciju i daljnje provođenje signala MAPK i PI3K/AKT signalnih puteva, dovodeći do inhibicije proliferacije stanica i indukcije apoptoze. Međutim, neki pacijenti su rezistentni na liječenje lapatinibom i bolest napreduje zbog selekcije tumorskih stanica koje imaju stečenu rezistenciju na lapatinib. Pretpostavljeno je nekoliko mehanizama rezistencije na lapatinib, a među koje spadaju aktivacija kompenzatornih signalnih puteva, mutacije ERBB2 tirozin-kinazne domene i amplifikacija gena *HER2* (D'Amato i sur., 2015).

Pertuzumab je humanizirano monoklonsko protutijelo koje se veže za subdomenu II ekstracelularne domene ERBB2 receptora sprječavajući ligand-ovisnu dimerizaciju i inducirajući staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelu. Pertuzumab i trastuzumab pokazuju komplementarne mehanizme djelovanja i kada se kombiniraju djeluju sinergistički kako bi inhibirali preživljavanje stanica karcinoma dojke. Neratinib je ireverzibilni tirozin-kinazni inhibitor EGFR, ERBB2 i ERBB4 čije se aktivno djelovanje pojavljuje u stanicama s *HER2* mutacijama koje su rezistentne na lapatinib (Monteiro i sur., 2015).

RAF inhibitori prve generacije, vemurafenib, dabrafenib i encorafenib, razvijeni su i primijenjeni za liječenje karcinoma koji sadrže BRAF(V600E), kao pojedinačna sredstva ili zajedno s MEK inhibitorima (Degirmenci i sur., 2020). Djelotvornost ovih inhibitora u karcinomima koji sadrže BRAF(V600E) je posljedica inhibicije monomernog mutiranog BRAF-a koji je prisutan i aktivan u BRAF(V600E) mutiranim stanicama. U stanicama koje ne sadrže BRAF(V600E), djelotvornost ovih inhibitora je drugačija i složenija. Vezanje inhibitora na jedan protomer u RAF dimeru može dovesti do paradoksalne aktivacije RAF signalizacije transaktivacijom protomera u dimeru. Navedeni inhibitori nisu učinkoviti protiv karcinoma u kojima RAF signalizira kao dimer. Nepotpuna supresija signalnog puta ili njegova reaktivacija su glavni problemi RAF inhibitora (Yaeger i Corcoran, 2019).

Za razliku od ostalih inhibitora kinaza, MEK inhibitori osiguravaju visoku specifičnost vezanjem za hidrofobno mjesto koje se nalazi uz, ali ne preklapajući se s mjestom vezanja ATP-a. Takvo vezanje zaključava konformaciju MEK-a i sprječava njegovu interakciju s MAPK aktivacijskim petljama, što daje visoku učinkovitost MEK inhibitorima koja je izravno proporcionalna stupnju aktivacije MAPK u RAS-, RAF- ili EGFR-mutiranim tumorima. U nekim slučajevima koji uključuju RAS- ili RAF-mutirane tumore, MEK inhibitori aktiviraju RAS-RAF-MAPK signalni put uklanjanjem MAPK-ovisne negativne povratne regulacije, što dovodi do

prigušivanja inhibicije MEK-a. Tijekom rezistencije na MEK, inhibitori komponenti RAS-RAF-MAPK signalnog puta najvažniji su terapijski ciljevi i kombiniraju se s MEK inhibitorima kako bi se poboljšao njihov terapijski učinak (Li i sur., 2019).

O'Shea i sur. (2017) proveli su istraživanje nakon kojeg su prezentirali rezultate *in vitro* prekliničke evaluacije refametiniba, alosteričkog MEK inhibitora, u *HER2*-pozitivnim staničnim linijama karcinoma dojke, uključujući modele sa stečenom rezistencijom na trastuzumab ili lapatinib. Refametinib ima anti-proliferativni učinak kao monoterapija u nekim *HER2*-pozitivnim stanicama, uključujući modele sa stečenom rezistencijom na trastuzumab i lapatinib. Kombinacije refametiniba s lapatinibom ili PI3K inhibitorom, copanlisibom, također induciraju sinergističko anti-proliferativno djelovanje u određenim *HER2*-pozitivnim staničnim linijama karcinoma dojke. *HER2*-pozitivne stanične linije u kojima ERBB2 inhibitori, poput lapatiniba, inhibiraju MEK/MAPK i aktiviraju PI3K/AKT signalizaciju, smatraju se osjetljivijima na anti-proliferativni učinak refametiniba (O'Shea i sur., 2017).

Iako dokazi sugeriraju da RAF/MEK/MAPK signalni put ima važnu ulogu u TNBC, u stanicama TNBC primijećena je rezistencija na MEK inhibitore. Smatra se da su različiti mehanizmi uključeni u navedeni fenomen, uključujući RTK-ovisnu aktivaciju PI3K/AKT signalnog puta. Maiello i sur. (2015) analizirali su učinke selumetiniba, MEK inhibitora, u kombinaciji s EGFR inhibitorom gefitinibom u brojnim staničnim linijama TNBC koje su pokazale različite razine osjetljivosti na selumetinib. Tretiranjem TNBC stanica sa selumetinibom, došlo je do povećanja fosforilacije EGFR i u selumetinib-osjetljivim i u selumetinib-rezistentnim TNBC stanicama. Kombinacija selumetiniba i gefitiniba rezultirala je sinergističkim inhibitorynim efektom rasta u svim TNBC staničnim linijama. Učinak je bio povezan s gotovo potpunom supresijom MAPK aktivacije i redukcije selumetinibom inducirane AKT fosforilacije. U selumetinib-osjetljivim TNBC stanicama, kombinacija selumetiniba i gefitiniba inducirala je značajno G_0/G_1 zaustavljanje staničnog ciklusa i apoptozu (Maiello i sur., 2015).

Seo i sur. (2020) su predstavili prvo izvješće o pacijentu s BRAF(V600E) mutacijom i metastatskim metaplastičnim karcinomom dojke (TNBC) koji je bio rezistentan na kemoterapiju s antraciklinom te je liječen kombiniranom terapijom s dabrafenibom i MEK inhibitorom trametinibom. Pacijent je na početku liječenja imao BRAF i PIK3CA mutacije, što može objasniti razlog slabe učinkovitosti inhibicije BRAF-a i MEK-a. Potrebno je provesti više istraživanja za bolje razumijevanje odgovora i rezistencije na BRAF ciljanu terapiju kod pacijenata s BRAF-mutiranim karcinomom dojke (Seo i sur., 2020).

3. ZAKLJUČAK

Karcinom dojke je jedan od najčešćih malignih tumora koji nastaje nekontroliranim dijeljenjem stanica tkiva dojke, a do njegovog razvoja najčešće dolazi zbog prekomjerne aktivnosti signalnih puteva u stanici. Važnu ulogu u razvoju karcinoma dojke ima RAS-RAF-MAPK signalni put u koji je uključena ERBB2 obitelj receptora. Amplifikacija i prekomjerna ekspresija *HER2* gena, gena koji kodira za ERBB2 receptor, te mutacije pojedinih komponenti RAS-RAF-MAPK signalnog puta, dovode do njegove prekomjerne aktivacije i smatraju se jednim od bitnijih uzročnika nastanka karcinoma dojke.

Istraživanjem *HER2*-pozitivnih karcinoma dojke, utvrđena je bliska povezanost između amplifikacije i prekomjerne ekspresije *HER2* gena. Amplifikacija *HER2* gena djeluje na povećanje njegove ekspresije, što rezultira stvaranjem abnormalno velikog broja ERBB2 receptora na površini stanica karcinoma dojke, potičući tako jaku signalizirajuću kaskadu unutar stanice. Do onkogene aktivacije RAS i RAF gena dolazi uvođenjem točkastih mutacija koje blokiraju proteine i njihove nizvodne signalne puteve u hiperaktivnom stanju. Progresija TNBC podtipa najčešće je uzrokovana mutacijom RAS i RAF izoformi, od kojih najviše doprinose mutirana KRAS izoforma te mutirana inačica BRAF(V600E) koja uzrokuje stalnu MEK i MAPK signalizaciju, budući da nije povezana s RTK/RAS aktivacijom.

Osim RAS-RAF-MAPK signalnog puta, postoje i mnogi drugi signalni putevi koji doprinose razvoju karcinoma dojke. Većina mutacija koje pogađaju komponente signalnih puteva su izuzetno rijetke, no višestruke mutacije koje potječu iz različitih signalnih puteva djeluju kumulativno. Važno je poznavati svrhu pojedinog signalnog puta i njegovu integraciju s ostalim signalnim putevima kako bi se u potpunosti mogao razumjeti mehanizam nastanka karcinoma dojke. Liječenje karcinoma dojke anti-ERBB2 protutijelima kao što su trastuzumab i pertuzumab, tirozin-kinaznim inhibitorima poput lapatiniba i neratiniba te RAF i MEK inhibitorima, danas još uvijek nije u potpunosti uspješno. Potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se točno utvrdili svi mehanizmi signalnih puteva i ciljna mjesta unutar istih u svrhu sinteze lijekova koji će omogućiti potpuno izlječenje karcinoma dojke.

4. POPIS LITERATURE

1. Ahmad D. A. J., Negm O. H., Alabdullah M. L., Mirza S., Hamed M. R., Band V., Green A. R., Ellis I. O., Rakha E. A. (2016) Clinicopathological and prognostic significance of mitogen-activated protein kinases (MAPK) in breast cancers. *Breast Cancer Research and Treatment* **159**: 457 - 467
2. Albernaz M. S., Carmo F. S., Helal-Neto E., Nascimento S. S., Santos-Oliveira R. (2017) Breast cancer: carcinogenesis, diagnosing and treatment. *The European Journal of Oncology* **22**: 53 - 64
3. Al-thoubaity F. K. (2020) Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. *Annals of Medicine And Surgery* **49**: 44 - 48
4. ACS (2019) ACS – American Cancer Society, <<https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/breast-cancer-facts-figures.html>> . Pristupljeno 11. travnja 2020.
5. Camacho-Leal M. P., Sciortino M., Cabodi S. (2017) ErbB2 Receptor in Breast Cancer: Implications in Cancer Cell Migration, Invasion and Resistance to Targeted Therapy. *Breast Cancer: From Biology to Medicine*, 1.izd., IntechOpen. str. 168 - 169
6. D'Amato V., Raimondo L., Formisano L., Giuliano M., De Placido S., Rosa R., Bianco R. (2015) Mechanisms of lapatinib resistance in HER2-driven breast cancer. *Cancer Treatment Reviews* **41**: 877 - 883
7. Damjanov I., Seiwerth S., Jukić S., Nola M. (2014) Patologija, 4. izd., Medicinska naklada. str. 134 - 137
8. Degirmenci U., Wang M., Hu J. (2020) Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells* **9**: 198 - 232
9. Devi U.P (2000) Basics of Carcinogenesis. *Health Administrator* **17**: 16 - 24
10. Elizalde P. V., Cordo Russo R. I., Chervo M. F., Schillaci R. (2016) ErbB-2 Nuclear Function in Breast Cancer Growth, Metastasis and Resistance to Therapy. *Endocrine Related Cancer* **23**: 243 - 257
11. Feng Y., Spezia M., Huang S., Yuan C., Zeng Z., Zhang L., Ji X., Liu W., Huang B., Luo W., Liu B., Lei Y., Du S., Vuppapapati A., Luu H. H., Haydon R. C., He T. C., Ren G. (2018) Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases* **5**: 77 - 106

12. Fragomeni S. M., Sciallis A., Jeruss J. S. (2018) Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America Journal* **27**: 95 - 120
13. Galiè M. (2019) RAS as Supporting Actor in Breast Cancer. *Frontiers in Oncology* **9**: 1199 - 1208
14. GHR (2020) GHR – Genetics Home Reference, <<https://ghr.nlm.nih.gov/>>. Pristupljeno 14. travnja 2020.
15. Gorodetska I., Kozeretska I., Dubrovska A. (2019) BRCA Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance. *Journal of Cancer* **10**: 2109 - 2127
16. Harbeck N., Gnant M. (2017) Breast cancer. *Lancet* **389**: 1134 - 1150
17. Harbeck N., Penault- Llorca F., Cortes J., Gnant M., Houssami N., Poortmans P., Ruddy K., Tsang J., Cardoso F. (2019) Breast cancer. *Primer* **5**: 66 - 97
18. Hicks D. G., Kulkarni S. (2008) HER2+ Breast Cancer: Review of Biologic Relevance and Optimal Use of Diagnostic Tools. *American Journal of Clinical Pathology* **129**: 263 - 273
19. Jung Y. Y., Jung W. H., Koo J. S. (2016) BRAF mutation in breast cancer by BRAF V600E mutation-specific antibody. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **9**: 1545 - 1556
20. Li Y., Dong Q., Cui Y. (2019) Synergistic inhibition of MEK and reciprocal feedback networks for targeted intervention in malignancy. *Cancer Biology & Medicine* **16**: 415 - 434
21. Maiello M. R., D'Alessio A., Bevilacqua S., Gallo M., Normanno N., De Luca A. (2015) EGFR and MEK Blockade in Triple Negative Breast Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **116**: 2778 – 2785
22. Marchini C., Pietrella L., Kalogris C., Garulli C., Gabrielli F., Amici A. (2013) Oncogene and Cancer: From Bench to Clinic, 1. izd., IntechOpen. str. 42
23. Maximiano S., Magalhaes P., Pereira Guerreiro M., Morgado M. (2016) Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer. *Biodrugs* **30**: 75 - 86
24. Moasser M. M. (2017) The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncology* **26**: 6469 - 6487
25. Molina J. R., Adjei A. A. (2006) The Ras/Raf/MAPK Pathway. *Journal Thoracic Oncology* **1**: 7 - 9
26. Monteiro I. P. C., Madureira P., De Vasconcelos A., Pozza D. H., De Mello R. A. (2015) Targeting HER family in HER2-positive metastatic breast cancer: potential biomarkers and novel targeted therapies. *Pharmacogenomics* **16**: 257 - 271

27. Ortega M. A., Fraile-Martinez O., Asunsolo A., Bujan J., Garcia-Honduvilla N., Coca S. (2020) Signal Transduction Pathways in Breast Cancer: The Important Role of PI3K/Akt/mTOR. *Journal of Oncology* **2020**: 1 - 11
28. O'Shea J., Cremona M., Morgan C., Milewska M., Holmes F., Espina V., Liotta L., O'Shaughnessy J., Toomey S., Madden S. F., Carr A., Elster N., Hennessy B. T., Eustace A.J. (2017) A preclinical evaluation of the MEK inhibitor refametinib in HER2-positive breast cancer cell lines including those with acquired resistance to trastuzumab or lapatinib. *Oncotarget* **8**: 85120 - 85135
29. Pecorino L. (2016) *Molecular Biology of Cancer*, 4. izd., Oxford University Press. str. 7 - 8, 79 - 86
30. Provenzano E., Ulaner G. A., Chin S. F. (2018) Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clinics Journal* **13**: 325 - 338
31. Roskoski R. (2014) The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacological Research* **79**: 34 - 74
32. Seo T., Noguchi E., Yoshida M., Mori T., Tanioka M., Sudo K., Shimomura A., Yonemori K., Fujiwara Y., Tamura K. (2020) Response to Dabrafenib and Trametinib of a Patient with Metaplastic Breast Carcinoma Harboring a BRAFV600E Mutation. *Case Reports in Oncological Medicine* **2020**: 1 - 6
33. Sidhanth C., Manasa P., Krishnapriya S., Sneha S., Bindhya S., Nagare R. P., Garg M., Ganesan T. S. (2017) A systematic understanding of signaling by ErbB2 in cancer using phosphoproteomics. *Biochemistry and Cell Biology* **96**: 1 - 11
34. Sinha T. (2018) Tumors: Benign and Malignant. *Cancer Therapy & Oncology* **10**: 1 - 3
35. Stefan E., Bister K. (2017) MYC and RAF: Key effectors in cellular signaling and major drivers in human cancer. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **407**: 117 - 151
36. Tang Y., Wang Y., Kiani M. F., Wang B. (2016) Classification, treatment strategy and associated drug resistance in breast cancer. *Clinical Breast Cancer* **16**: 335 - 343
37. Toss A., Venturelli M., Peterle C., Piacentini F., Cascinu S., Cortesi L. (2017) Molecular Biomarkers for Prediction of Targeted Therapy Response in Metastatic Breast Cancer: Trick or Treat?. *International Journal of Molecular Sciences* **18**: 85 - 109
38. Uscanga-Perales G. I., Santuario-Facio S. K., Ortiz-Lopez R. (2016) Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity. *Medicina Universitaria* **18**: 105 - 114
39. Van Bockstal M. R., Agahozo M. C., Van Marion R., Atmodimedjo P. N., Sleddens H. F. B. M., Dinjens W. N. M., Visser L. L., Lips E. H., Wesseling J., Van Deurzen C. H. M.

- (2020) Somatic mutations and copy number variations in breast cancers with heterogeneous HER2 amplification. *Molecular Oncology* **14**: 671 - 685
40. Velloso F. J., Bianco A. F., O' Farias J., Torres N. E., Ferruzo P. Y., Anschau V., Jesus-Ferreira H. C., Hung-Tse Chang T., Sogayar M. C., Zerbini L. F., Correa R. G. (2017) The crossroads of breast cancer progression: insights into the modulation of major signaling pathways. *Oncotargets and Therapy* **10**: 5491 – 5524
41. Vicario R., Peg V., Morancho B., Zacarias-Fluck M., Zhang J., Martínez-Barriocanal A., Navarro Jiménez A., Aura C., Burgues O., Lluch A., Cortés J., Nuciforo P., Rubio I. T., Marangoni E., Deeds J., Boehm M., Schlegel R., Tabernero J., Mosher R., Arribas J. (2015) Patterns of HER2 Gene Amplification and Response to Anti-HER2 Therapies. *PLoS One* **10**: 1 - 12
42. Vuong D., Simpson P. T., Green B., Cummings M. C., Lakhani S. R. (2014) Molecular classification of breast cancer. *Virchows Archiv* **465**: 1 - 14
43. Yaeger R., Corcoran R. B. (2019) Targeting Alterations in the RAF–MEK Pathway. *Cancer Discovery* **9**: 329 - 341
44. Yan M., Schwaederle M., Arguello D., Millis S. Z., Gatalica Z., Kurzrock R. (2015) HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients. *Cancer and Metastasis Reviews* **34**: 157 - 164
45. Waks A. G., Winer E. P. (2019) Breast Cancer Treatment. *Jama* **321**: 288 - 300
46. Wee P., Wang Z. (2017) Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers* **9**: 52 - 97

5. PRILOZI

5.1. POPIS KRATICA

AKT- protein kinase B

APOBEC- apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like

AP-1- activator protein 1

AR- androgen receptor

ARAF- V-Raf Murine Sarcoma 3611 Viral Oncogene Homolog 1

ATM- Ataxia Telangiectasia Mutated Serine/Threonine Kinase

ATP- adenosine triphosphate

BL1- basal-like 1

BL2- basal-like 2

BRAF(V600E)- V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B

BRCA1- Breast Cancer Type 1 Susceptibility Gene

BRCA2- Breast Cancer Type 2 Susceptibility Gene

CCND1- Cyclin D1

c-FOS- V-Fos FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog

c-MYC- V-Myc Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog

c-JUN- V-Jun Avian Sarcoma Virus 17 Oncogene Homolog

CRAF- V-Raf-1 Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1

CSC- cancer stem cell

Cyclin D1- G1/S-Specific Cyclin D1

DM- double minutes

DNA- deoxyribonucleic acid

EMT- epithelial-to-mesenchymal transition

ER- *estrogen receptor*

FGFR1- *Fibroblast Growth Factor Receptor 1*

FGFR4- *Fibroblast Growth Factor Receptor 4*

FOXA1- *Forkhead box protein A1*

GAP- *GTPase-activating protein*

GATA3- *GATA-binding protein 3*

GDP- *guanosine diphosphate*

GEF- *guanine exchange factor*

GTP- *guanosine triphosphate*

Grb2- *growth factor receptor-bound protein 2*

GSK-3- *glycogen synthase kinase 3*

HER1/EGFR/ERBB1- *epidermal growth factor receptor*

HER2/ERBB2/NEU – *human epidermal growth factor receptor 2*

HER3/ERBB3- *human epidermal growth factor receptor 3*

HER4/ERBB4- *human epidermal growth factor receptor*

HRAS- *Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*

HSR- *homogeneously staining regions*

IEG- *immediate early gene*

IM- *immunomodulatory subtype*

Ki67- *marker of proliferation Ki67*

KRAS- *Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog*

KRAS4A- *Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog 4A*

KRAS4B- *Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog 4B*

KRT1- *Keratin Type II Cytoskeletal 1*

KRT5- *Keratin Type II Cytoskeletal 5*

KRT7- *Keratin Type II Cytoskeletal 7*

LAR- *luminal androgen receptor subtype*

MAPK/ERK- *mitogen-activated protein kinase*

MAPKK/MEK- *mitogen-activated protein kinase kinase*

MAP3KI- *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1*

MDM2- *murine double minute 2*

MSL- *mesenchymal subtype*

Notch1 (2,3,4)- *Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 1 (2,3,4)*

NRAS- *neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*

NTA- *acidic N-terminus*

PAK1- *p21 activated kinase 1*

PIK3CA- *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-3-kinase catalytic subunit alpha*

PI3K- *phosphatidylinositol 3-kinase*

PKC- *protein kinase C*

P53- *Tumor Suppressor p53*

PR- *progesterone receptor*

PTEN- *Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate 3-Phosphatase And Dual-Specificity Protein Phosphatase*

RAF/MAPKK- *rapidly accelerated fibrosarcoma*

RAS- *rat sarcoma viral oncogene homolog*

RTK- *receptor tyrosine kinase*

SGK-3- *Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase Family Member 3*

SH2 (3)- *Src homology 2 (3)*

SOS- *son of sevenless*

TCGA- *The Cancer Genome Atlas*

TGF β - *transforming growth factor β*

TNBC- *triple negative breast cancer*

TP63- *Tumor Protein 63*

Wnt- *Wingless-Type*

XPB1- *X-Box Binding Protein 1*

Izjava o izvornosti

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

Karla Demir

ime i prezime studenta