

Stvaranje kristalne strukture kimernih molekula faktora rasta EGF receptora

Žuljević Escobar, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:990899>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
INTEGRIRANI SVEUČILIŠNI STUDIJ
FARMACIJA

Sara Žuljević Escobar

**STVARANJE KRISTALNE STRUKTURE KIMERNIH MOLEKULA FAKTORA
RASTA EGF RECEPTORA**

DIPLOMSKI RAD

Mentor:

doc. dr. sc. Jasminka Omerović

Split, 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI SVEUČILIŠNI STUDIJ

FARMACIJA

Sara Žuljević Escobar

**STVARANJE KRISTALNE STRUKTURE KIMERNIH MOLEKULA FAKTORA
RASTA EGF RECEPTORA**

**CRYSTAL STRUCTURE MODELLING OF THE CHIMERIC GROWTH FACTOR
MOLECULES OF THE EGF RECEPTOR**

Diplomski rad/Master's thesis

Mentor:

doc. dr. sc. Jasminka Omerović

Split, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Imunologija i molekularna biologija s genetikom
Tema rada: je odobrena na 74. sjednici Vijeća studija Farmacije
Mentor: doc. dr. sc. Jasminka Omerović

Stvaranje kristalne strukture kimernih molekula faktora rasta EGF receptora

Sara Žuljević Escobar, broj indeksa 239

Sažetak: Heterogeni izražaj molekula faktora rasta u tumorskim tkivima jedan je od čestih uzroka *de novo* rezistencije. Liječenje tumora ovisnih o signalima EGF receptora primarno je usmjereno na inhibiciju aktivacije receptora vezanih za istovrsne molekule faktora rasta. Shodno tome, izostavljeno je u cijelosti djelovanje heterogenog izražaja molekula faktora rasta u tumorskom tkivu. U cilju istraživanja djelovanja izražaja različitih faktora rasta na razvoj i rezistenciju tumora, izrađene su uz pomoć računalnih programa i alata, PyMOL i PyMod 3, strukture proteinskih kimernih molekula građene od dvije molekule faktora rasta EGF receptora, međusobno povezane fleksibilnim ili krutim povezičavčem. Aminokiselinski slijed oba povezičavača (fleksibilni ili GG-GSAT*-GG i kruti ili GGG-MYO6*-GGG) modificiran je kako bi se omogućila bolja fleksibilnost kimerne molekule te je dodatno slijed aminokiselina krutog povezičavača skraćen kako bi se optimizirala udaljenost između dvije molekule faktora rasta. Sekvence kimernih molekula analizirane su koristeći PyMOL i ProtParam; analizirana je molekularna masa, teorijski pI, hidrofobnost, indeks nestabilnosti i alifatski indeks kimernih molekula. Prema dobivenim podacima može se zaključiti da model Kimera 1 ima najbolju termostabilnost, Kimera 3 ima najviši pI, a Kimera 2 se pokazao kao najhidrofilniji od svih modela. Predviđena stabilnost kimernih modela koji sadrže fleksibilni povezičavč bila je veća u odnosu na modele s krutim povezičavčem. Modeliranje struktura kimernih molekula s fleksibilnim povezičavčem moglo bi rezultirati boljim razumijevanjem utjecaja heterogenog izražaja molekula faktora rasta, dok bi kimerne molekule s krutim povezičavčem mogle spriječiti aktivaciju receptora. U konačnici, ovo bi bili ključni alati za istraživanja rasta, razvoja i rezistencije samoga tumora, te inhibicije tumorigeneze.

Ključne riječi: EGF receptor, molekule faktora rasta, dimer, konformacija, kimerne molekule

Rad sadrži: 89 stranica, 68 slika, 1 tablica, 0 priloga, 105 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. prof. dr. sc. Anita Markotić, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, član
3. doc. dr. sc. Jasminka Omerović, član-mentor

Datum obrane: 27. listopada 2022.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Medicinskog fakulteta u Splitu, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

**Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia**

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title: Immunology and molecular biology and genetics
Thesis subject: was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no.74
Mentor: Asst. Prof. Jasminka Omerović, PhD

Crystal structure modelling of the chimeric growth factor molecules of the EGF receptor
Sara Žuljević Escobar, index number 239

Summary: Heterogeneous expression of growth factor molecules in tumor tissues is one of the most frequent causes of *de novo* resistance. Treatment of EGFR signal-dependent tumors primarily targets the inhibition of receptor activation induced by two growth factor molecules. Thus, the heterogeneous expression of growth factor molecules in tumor tissue was ignored. In order to investigate the effect of the expression of different growth factors on tumor growth and resistance, with the help of computer programs and tools, PyMOL and PyMod 3, we modelled chimeric protein structures harbouring two molecules of growth factors of EGF receptor, interconnected with a flexible or rigid linker. The protein sequences of both linkers (flexible or GG-GSAT*-GG and rigid or GGG-MYO6*-GGG) were modified to improve the mobility of the chimeric molecule and the rigid linker was further shortened to optimize the distance between the two growth factor molecules. The protein sequences of chimeric molecules were analyzed using PyMOL and ProtParam, and the protein molecular mass, theoretical pI, hydrophobicity, instability index, and aliphatic index of chimeric molecules were determined. According to the obtained data, the model Chimera 1 has the best thermostability, Chimera 3 has the highest pI value, and Chimera 2 proved to be the most hydrophilic of all models. The predicted stability of the chimeric models containing a flexible linker was higher than that of models with a rigid linker. Modelling the structures of chimeric molecules with a flexible linker could result in a better understanding of the impact of heterogeneous expression of growth factor molecules, whereas chimeric molecules with a rigid linker could prevent receptor activation. In conclusion, these would be the key research tools by which we could define the mechanisms of microenvironment impact on tumor growth, progression, and resistance, as well as tumor inhibition.

Key words: EGF receptor, growth factor molecules, dimer, conformation, chimeric molecules

Thesis contains: 89 pages, 68 figures, 1 table, 0 supplements, 105 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. Prof. Anita Markotić, PhD, chair person
2. Assoc. Prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD, member
3. Asst. Prof. Jasminka Omerović, PhD, member - supervisor

Defense date: October 27th 2022.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici, doc. dr. sc. Jasminki Omerović, na razumijevanju, strpljenju, pomoći i velikoj podršci pri izradi ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se obitelji i prijateljima koji su me podržavali i bodrili tijekom čitavog mog školovanja.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. ErbB porodica tirozin kinaznih receptora	2
1.2. Struktura EGF receptora.....	3
1.3. Aktivacija	4
1.4. Ligandi	9
1.4.1. Epidermalni faktor rasta (EGF)	11
1.4.2. Transformirajući faktor rasta (TGF- α).....	11
1.4.3. Heparin vezujući-EGF (HB-EGF)	12
1.4.4. Amfiregulin (AREG)	12
1.4.5. Betacelulin (BTC).....	13
1.4.6. Epiregulin (EREG).....	13
1.4.7. Epigen (EPGN).....	13
1.4.8. Neuregulini	14
1.5. Endocitoza	18
1.5.1. Endocitoza ovisna o klatrinu	19
1.5.2. Endocitoza neovisna o klatrinu.....	19
1.6. Nizvodni signalni putevi	21
1.6.1. RAS-RAF-MEK-ERK MAPK	21
1.6.2. PI3K-Akt-mTOR.....	22
1.6.3. PLC- γ 1-PKC.....	22
1.7. Vrste terapije i mehanizmi djelovanja na stanice tumora	24
1.7.1. Karcinom pluća ne-malih stanica (engl. <i>non-small cell lung cancer</i> - NSCLC).....	24
1.7.2. Glioblastom (GBM).....	27
1.7.3. Kolorektalni karcinom (CRC)	30
1.7.4. Terapija usmjerena na EGFR ligande.....	30
1.7.5. Tumorski mikrookoliš	32
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	34

3.	MATERIJALI I METODE.....	35
4.	REZULTATI.....	42
5.	RASPRAVA.....	64
6.	ZAKLJUČAK.....	66
7.	LITERATURA.....	67
8.	SAŽETAK.....	76
9.	SUMMARY.....	77
10.	ŽIVOTOPIS.....	78

KRATICE

ADAM – dezintegrin i metaloproteinaza (engl. *a disintegrin and metalloproteinase*)

A – aminokiselina alanin, Ala (engl. *alanine*)

AP2 – adaptorski protein 2 (engl. *adaptor protein 2*)

AREG – amfiregulin (engl. *amphiregulin*)

ATP – adenzin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)

BAD – BCL2 pridružen agonist stanične smrti (engl. *BCL2 associated agonist of cell death*)

BBB – krvno-moždana barijera (engl. *blood-brain barrier*)

BRAF – B-Raf protoonkogen, serin/treonin kinaza (engl. *B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase*)

BTC – betacelulin (engl. *betacellulin*)

C – aminokiselina cistein, Cys (engl. *cysteine*)

CSF – cerebrospinalna tekućina (engl. *cerebrospinal fluid*)

CR – bogata cisteinima (engl. *cystein rich*)

c-SRC – protoonkogen tirozin-protein-kinaza Src (engl. *proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*)

D – aminokiselina aspartat, Asp (engl. *aspartic acid*)

E – aminokiselina glutamat, Glu (engl. *glutamic acid*)

EGF – epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor*)

EGFR – receptor za epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)

EGFRvIII – varijanta III receptora za epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor receptor variant III*)

EPGN – epigen (engl. *epigen*)

Eph – hepatocelularni karcinom koji proizvodi eritropoetin (engl. *erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma*)

EREG – epiregulin (engl. *epiregulin*)

ERK – kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (engl. *extracellular signal regulated kinase*)

FOXC1 –forkhead box C1 protein (engl. *forkhead box C1 protein*)

G – aminokiselina glicin, Gly (engl. *glycine*)

GBM – glioblastom (engl. *glioblastoma*)

Grb2 – protein vezan za receptor faktora rasta (engl. *growth factor receptor bound protein 2*)

GTP – gvanozin trifosfat (engl. *guanosine triphosphate*)

H – aminokiselina histidin, His (engl. *histidine*)

HB-EGF – heparin-vežući epidermalni faktor rasta (engl. *heparin-binding EGF*)

HER - ljudski EGF receptor (engl. *human EGF receptor*)

I – aminokiselina izoleucin, Ile (engl. *isoleucine*)

IL-6 – interleukin-6 (engl. *interleukin 6*)

IP3 – inozitol trifosfat (engl. *inositol triphosphate*)

JM – jukstamembranski (engl. *juxtamembrane*)

K – aminokiselina lizin, Lys (engl. *lysine*)

KRAS – Kirstenov virus štakorskog sarkoma (engl. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*)

L – aminokiselina leucin, Leu (engl. *leucine*)

LIF – inhibitorni faktor leukemije (engl. *leukemia inhibitory factor*)

M – aminokiselina metionin, Met (engl. *methionine*)

mAbs – monoklonska protutijela (engl. *monoclonal antibodies*)

MAPK, MEK – mitogenom-aktivirane proteinske kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinase*)

MET – mezenhimalno-epitelni prijelaz (engl. *mesenchymal-epithelial transition*)

mCRC – metastatski kolorektalni karcinom (engl. *metastatic colorectal cancer*)

mTOR – meta rapamicina kod sisavaca (mTOR) (engl. *mammalian target of rapamycin*)

MVB – multivezikularno tijelo (engl. *multivesicular body*)

N – aminokiselina asparagin, Asn (engl. *asparagine*)

NMDA – N-metil-D-aspartat (engl. *N-methyl-D-aspartate*)

NRG – neuregulin (engl. *neuregulin*)

NSCLC – karcinom pluća nemalih stanica (engl. *non-small cell lung cancer*)

OS – ukupno preživljenje (engl. *overall survival*)

P – aminokiselina prolin, Pro (engl. *proline*)

PDGF – trombocitni faktor rasta (engl. *platelet-derived growth factor*)

(m)PFS – preživljenje bez progresije bolesti (engl. *(median) progression free survival*)

PI3K – fosfoinozimid 3-kinaze (engl. *phosphoinositide 3-kinases*)

PKC – proteinska kinaza C (engl. *protein kinase C*)

PLC- γ 1 – fosfolipaza C, gama 1 (engl. *phospholipase C, gamma 1*)

PTB – fosfotirozin vezujuća domena (engl. *phosphotyrosine-binding domain*)

R – aminokiselina arginin, Arg (engl. *arginine*)

RAF – faktor rapidnog ubrzavanja fibrosarkoma (engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma*)

RAS – virus štakorskog sarkoma (engl. *rat sarcoma virus*)

RSK – kinaza ribosomalnog proteina S6 engl. *ribosomal S6 kinase*

RTK – receptorske tirozin kinaze (engl. *receptor tyrosine kinase*)

S – aminokiselina serin, Ser (engl. *serine*)

SH2 – Src homologija 2 (engl. *Src homology 2*)

SHC – Src homologija i kolagen (engl. *Src homology and collagen*)

SOS – son of sevenless (engl. *son of sevenless*)

T – aminokiselina treonin, Thr (engl. *threonine*)

TGF- α – transformirajući faktor rasta alfa (engl. *transforming growth factor alpha*)

TKI – tirozin kinazni inhibitori (engl. *tyrosin kinase inhibitors*)

V – valin, Val (engl. *valine*)

VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)

wtEGFR – divlji tip EGFR (engl. *wild-type EGFR*)

Y – aminokiselina tirozin, Tyr (engl. *tyrosine*)

1. UVOD

Poznato je 518 kinaza u ljudi od kojih 90 spada u tirozin kinaze. Radi se o proteinima koji su odgovorni za kataliziranje fosforilacije tirozinskih ostataka koristeći ATP molekulu kao donora fosfata [1]. Podskupina proteina tirozin kinaza su tirozin kinazni receptori (RTK) sastavljeni od vanstanične domene koja veže ligand, transmembranske regije i citoplazmatske domene koja nosi kinaznu aktivnost. Opisano je 58 različitih RTK u ljudi i svrstani su u 20 različitih porodica na temelju strukturnih karakteristika [2]. EGF (*epidermal growth factor*) receptori predstavnici su ErbB porodice receptora čija se aktivacija temelji na ligandom induciranoj dimerizaciji [3]. EGFR (nazivaju se i ErbB1 ili HER1) mogu vezati sedam različitih faktora rasta koji nakon vezanja za vanstaničnu domenu izazivaju konformacijske promjene strukture receptora i aktiviraju određene nizvodne signalne puteve [4]. EGFR imaju ključnu ulogu u aktivaciji stanične proliferacije, diferencijacije i migracije stanica i njihova je abnormalna aktivacija povezana s razvojem različitih tumora u ljudi [5]. Najčešće primijenjivani lijekovi kod spomenutih patoloških stanja su EGFR inhibitori koji se dijele na tirozin kinazne inhibitore (TKI) i monoklonska protutijela (mAbs). Zbog neželjenih reakcija koje izazivaju i zbog rezistencije koja se u konačnici razvije na TKI i mAbs, istraživanja se sve više usmjeravaju prema pronalaženju i usavršavanju novih terapijskih pristupa koji će pokazati veću selektivnost, imati bolju učinkovitost i manje neželjenih reakcija. Takvom se do sada pokazala terapija malim visoko selektivnim molekulama tzv. alosteričkim inhibitorima [1].

1.1. ErbB porodica tirozin kinaznih receptora

ErbB porodici pripadaju 4 člana EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 i ErbB4/HER4 (40%–45% se strukturno preklapaju). ErbB receptori su eksprimirani u raznim tkivima epitelnog, mezenhimalnog i živčanog porijekla. Imaju važnu ulogu u staničnoj proliferaciji, diferencijaciji, migraciji i supresiji apoptoze. Članovi ErbB porodice često su mutirani ili prekomjerno eksprimirani što potiče razvoj mnogih oblika karcinoma čineći ih bitnim terapijskim metama. Primjerice, na stanicama glioblastoma prisutna je varijanta III EGF receptora (EGFRvIII) koja je rezistentna na degradaciju zbog nedostatka vanstanične domene [6]. Nadalje, delecija egzona 19 i L858R mutacija čine oko 85% EGFR mutacija nađenih kod pacijenata s karcinomom pluća ne-malih stanica (NSCLC), a *HER2* amplifikacije gena uočene su kod karcinoma dojke, jajnika, mokraćnog mjehura i drugih tumora [7, 8].

Ime porodice potječe od v-ErbB onkogeni koji je strukturno sličan članovima ErbB porodice [8]. Geni koji kodiraju ErbB smješteni su na različitim kromosomima. Ljudski *EGFR* gen lociran je na kromosomu 7p12, *HER2* na 17q11.2-q12, *ErbB3* na 12q13, a *ErbB4* na 2q33.3-q34 [9, 10, 11]. EGFR i ErbB4 smatraju se potpuno funkcionalnim receptorima sa sposobnošću da vežu ligande i fosforiliraju tirozinske ostatke na C terminalnim repovima pomoću unutarstanične tirozin kinazne domene. HER2 receptor ne veže nijedan od poznatih faktora rasta, ali služi kao preferirani partner za heterodimerizaciju s ostalim ErbB članovima zbog svoje strukture koja ga čini konstitutivno aktivnim. ErbB3 je jedinstven jer ne posjeduje intrinzičnu tirozin kinaznu aktivnost ali sudjeluje u inicijaciji signalnih puteva kroz interakciju s EGFR, HER2 ili ErbB4 [12].

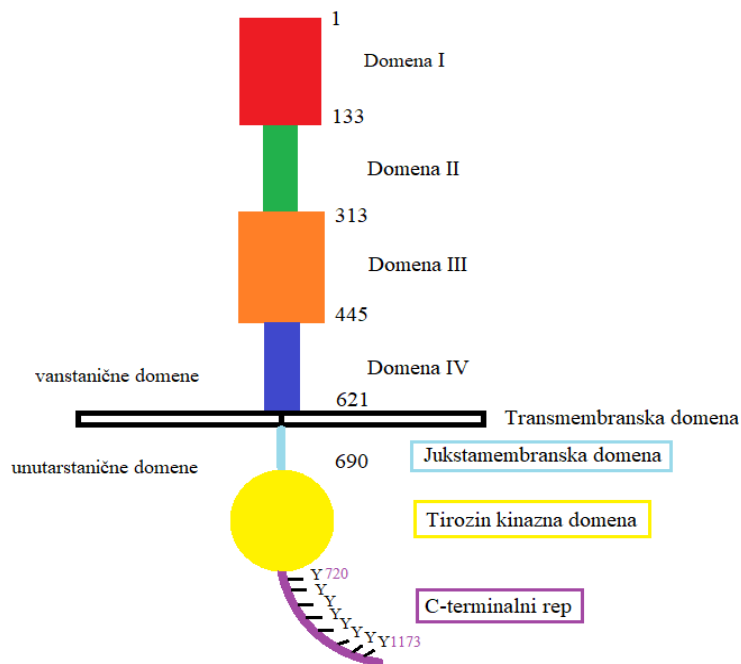
Vežanje topljivog faktora rasta za vanjsku domenu potiče homo- i heterodimerizaciju. EGF, TGF- α i amfiredulin ciljano se vežu za EGFR. ErbB3 veže neuregulin-1 i neuregulin-2 te jedini veže neuroglikan C. ErbB4 također veže neuregulin-1 i neuregulin-2 te jedini veže neuregulin-3, neuregulin-4 i tomeregulin. EGFR i ErbB4 vežu HB-EGF, betacelulin, epiregulin i epigen. Navedeni ligandi vežu se različitim afinitetom za receptore i izazivaju različite konformacijske promjene u strukturi receptora, a time i odgovore u stanici [12].

1.2. Struktura EGF receptora

EGFR je transmembranski protein koji se sastoji od 3 domene. Od N-terminalnog kraja do C-terminalnog kraja građen je od vanstanične ligand vezujuće domene, hidrofobne transmembranske domene i unutarstanične tirozin kinazne domene s C-terminalni repom [13].

Vanstanična domena sadrži 621 aminokiselinu i podijeljena je na 4 sastavne regije: domenu I (aminokiselina 1–133), II (aminokiselina 134–312), III (aminokiselina 313–445) i IV (aminokiselina 446–621) [13]. Domene I i III bogate su leucinima koji sudjeluju u vezanju liganda (faktora rasta). Domena II sudjeluje u homo- i heterodimerizaciji s istovrsnom domenom ostalih članova porodice. Domene II i IV (CR1 i CR2) bogate su cisteinima koji tvore disulfidne veze odgovorne za stabilizaciju proteinske strukture samoga dimera. Slična struktura je uočena kod laminina i receptora čimbenika tumorske nekroze [1]. Domena IV vezana je na transmembransku domenu koja sadrži 23 aminokiseline, hidrofobne je prirode i samo jednom prolazi fosfolipidni dvosloj stanične membrane [13].

Unutarstanična domena ima 542 aminokiseline, uključuje fleksibilnu jukstamembransku domenu (dugu ~40 aa), tirozin kinaznu domenu (aminokiselina 690–953) i karboksiterminalni rep s tirozinskim ostacima. Protein kinazna domena dijeli se na N-režanj (sadrži većim dijelom β -ploče) i C-režanj (uglavnom sadrži α -zavojnice), između kojih se nalazi mjesto za vezanje molekule ATP. Proces transfosforilacije temelji se na interakciji N-režnja jednog s C-režnjem drugog receptora. Lizini kinazne domene primarna su mjesta ubikvitinacije, odnosno selektivne razgradnje receptora. C-terminalni kraj uključuje tirozine Y703, Y920, Y992, Y1045, Y1068, Y1086, Y1148 i Y1173 koji podliježu fosforilaciji. Ovi tirozini služe kao mjesta za vezanje proteina koji sadrže SH2 (*Src homology domain*) i PTB (*phosphotyrosine binding*) domene i posreduju aktivaciju nizvodnih signalnih puteva i staničnih odgovora koji su posljedica stimulacije receptora faktorima rasta [13].



Slika 1. Struktura EGF receptora

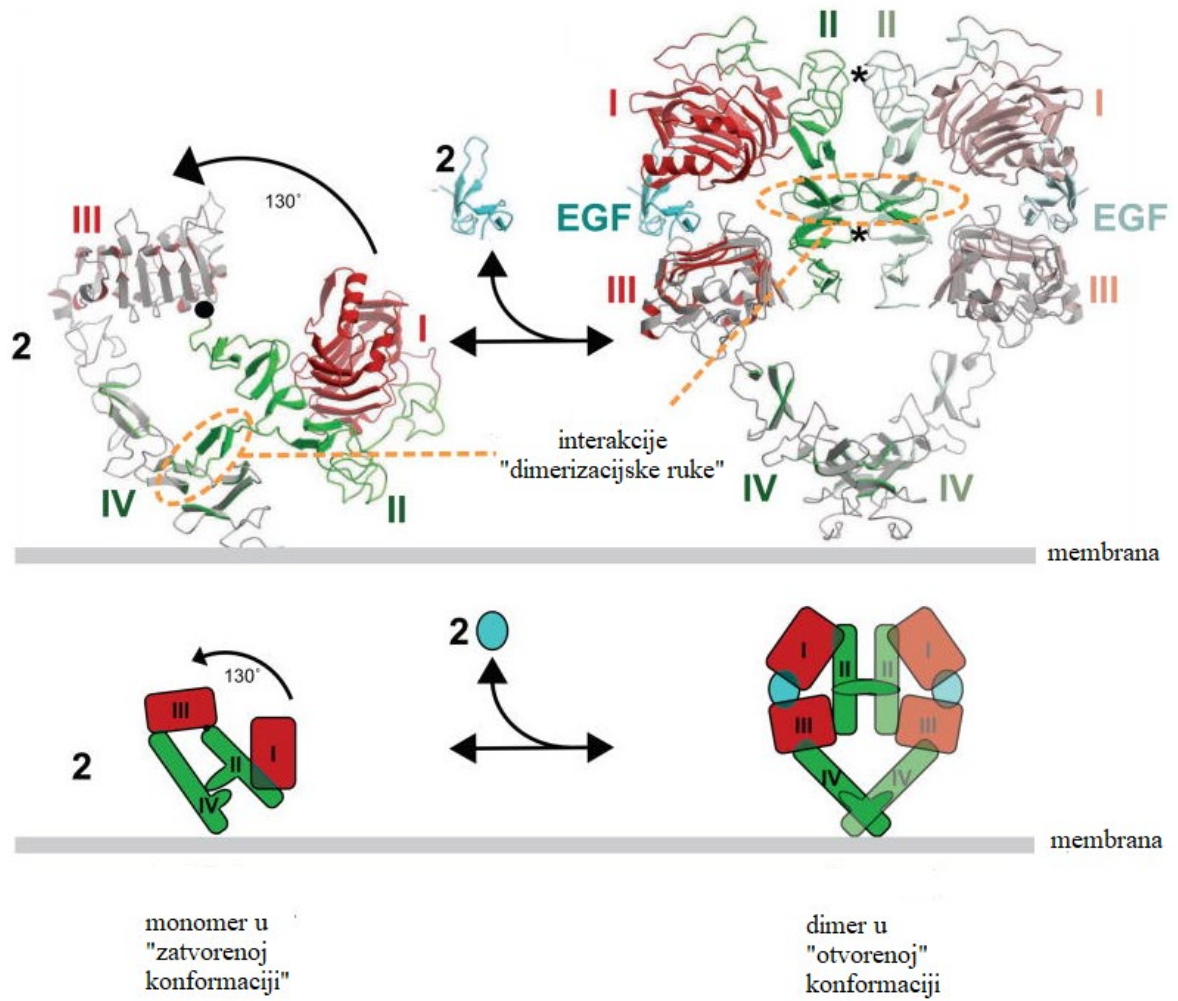
1.3. Aktivacija

EGF receptor prvotno se nalazi u obliku monomera, ali može graditi i inaktivni simetrični dimer. Prije vezanja liganda, receptori se mogu naći na površini stanice u obliku monomera odnosno "zatvorenoj" konformaciji ili oligomera odnosno "djelomično otvorenoj" strukturnoj konformaciji. Ligandi pokazuju veći afinitet prema "otvorenoj" konformaciji [14]. U zatvorenoj konformaciji "dimerizacijska ruka" domene II je u intramolekulskoj interakciji s domenom IV što ima važnu ulogu u autoinhibiciji dimerizacije. Kako bi se ligand istovremeno vezao za domene I i III, potrebna je rotacija segmenta I/II za $\sim 130^\circ$ (Slika 2.). Na taj način se prekida interakcija između domena II i IV [15, 16]. Vezanjem liganda otkrivaju se β -ukosnice "dimerizacijske ruke" vanstanične domene koje ulaze u interakciju, čime se stabilizira "otvorena" konformacija receptora.

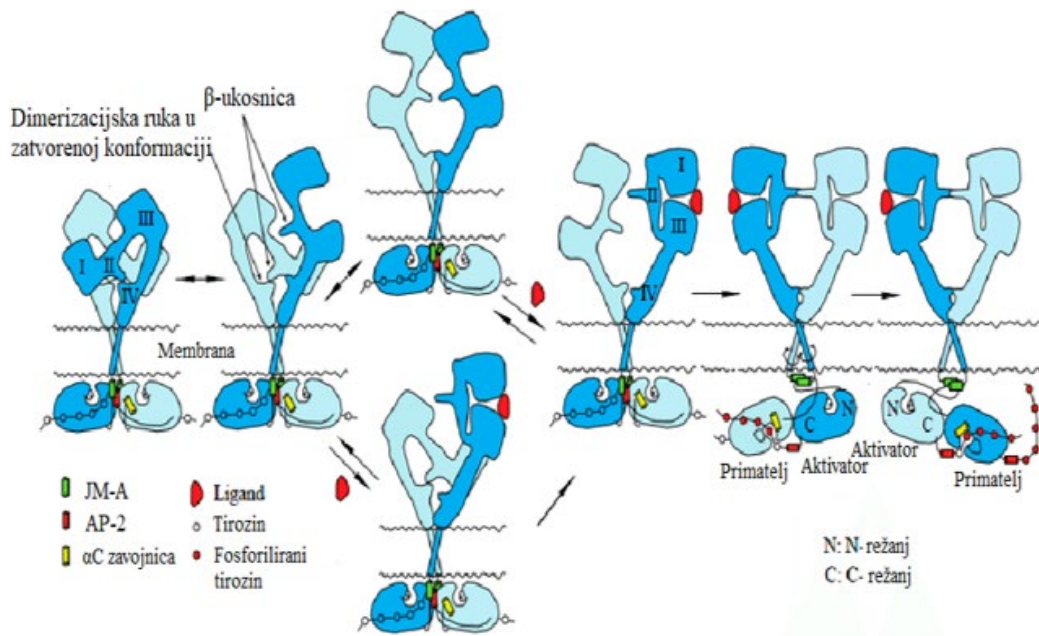
Ovakva promjena izaziva rotaciju transmembranskih domena za 140° (Slika 3.). Jukstamembranska domena tvori interakcije s kinaznom domenom koje su važne za postojanost i stabilizaciju EGFR dimera. N-terminalni krajevi JM domena ulaze u interakciju tvoreći antiparalelnu superzavijenu strukturu. Ovim promjenama nastaje aktivni asimetrični EGFR dimer u kojem je regija C-režnja kinazne domene ("aktivator") okrenuta prema N-režnju druge kinazne domene ("primatelj") [14]. Nakon vezanja EGF za EGFR, C-režanj "aktivatora" ostvaruje kontakt s N-režnjem "primatelja" preko dodirne površine, odnosno preko aminokiselina M945, V948 i M952 H-zavojnice, koji je ključan za daljnje odvijanje transfosforilacije (Slika 4.). U odnosu na većinu receptora čije kinaze tvore simetričan dimer, za aktivaciju EGFR nije nužna fosforilacija aktivacijske petlje (A-petlje) [16]. Nadalje, u procesu transfosforilacije C-terminalni rep aktivatora ulazi u aktivno mjesto primatelja čime se fosforiliraju tirozinski ostatci kinaznih domena. Time se otvaraju mjesta za vezanje nizvodnih efektorskih proteina [14]. Substitucije aminokiselina I706Q N-režnja ili V948R C-režnja inhibiraju fosforilaciju EGFR dimera nakon vezanja EGF, a istovremeni izražaj navedenih mutacija pogoduje aktivaciji dimera [17]. U konačnici, fosforilacija Y ostataka potiče daljnju aktivaciju nizvodnih signalnih puteva u koje su uključeni proteini koji sadrže fosfotirozin vezujuće SH2 i PTB proteinske domene [13].

U sklopu EGFR dimera hidrofobne interakcije nastaju između aminokiselina domena II: Y246, P248, Y251 jednog monomera i F230, F263, A265, Y275, R285 drugog monomera kao i vodikove veze (između Y251 i R285, Q252 i A286, Y246 i C283) [18]. Poznato je da delecije i točkaste mutacije u regiji "dimerizacijske ruke" domene II mogu spriječiti ligandom induciranu aktivaciju EGFR [19, 20]. Osim interakcija između domena II, unutar EGFR dimera koji je nastao vezanjem EGF, prisutna je vodikova veza između T249 "dimerizacijske ruke" jednog monomera (molekule A) i N86 domene I drugog monomera (molekule B) (Slika 5.) [18].

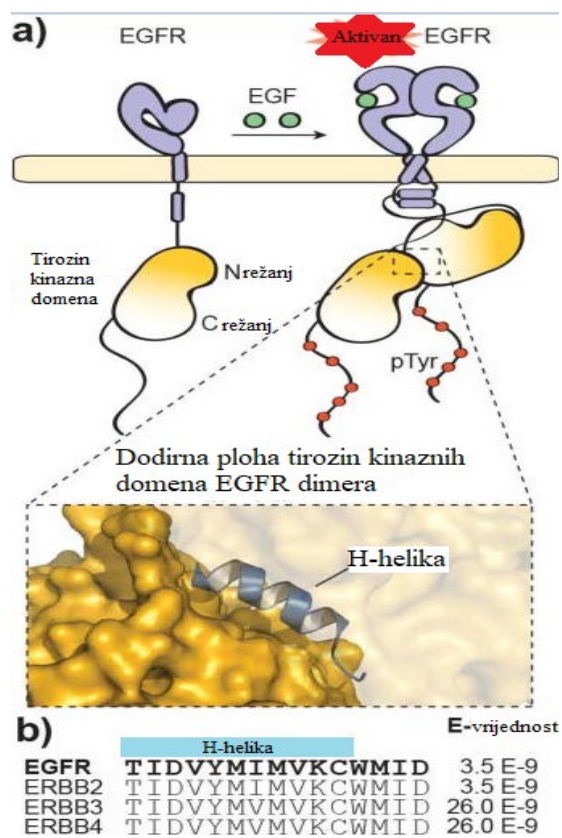
Unutar EGFR dimera koji je vezao TGF- α , aminokiseline T249 i N86 ne tvore vodikovu vezu, ali zato kontaktna mjesta nastaju između aminokiselinske sekvence 244–253, regije bogate cisteinom, molekule A i sekvence 229–239, 262–278, 282–288, cisteinske regije, molekule B. Određene aminokiseline koje grade CR1 regiju, sastavni dio domene II EGFR, zajedničke su svim članovima ErbB porodice. Primjer očuvane aminokiseline je Y246. Kontakt između monomera receptora ostvaruje se i preko aminokiselina D279 i H280 (Slika 6.). Aminokiseline N247 i N256 stabiliziraju konformaciju CR1 regije, ali ne vežu drugi monomer [21].



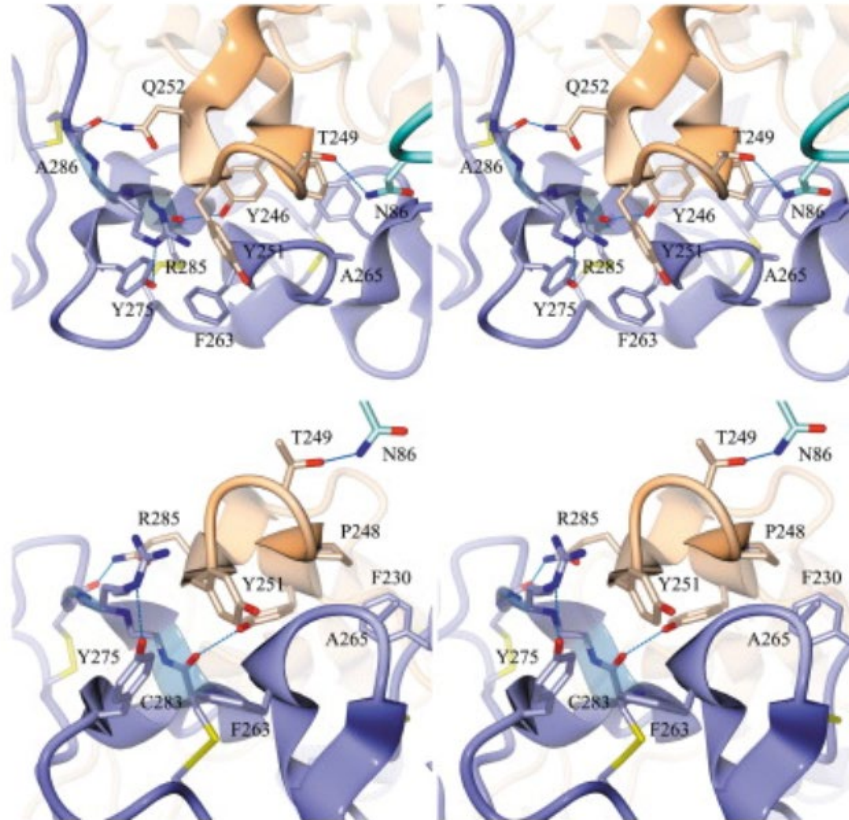
Slika 2. Otvaranje konformacije receptora inducirano vezanjem liganda [15]



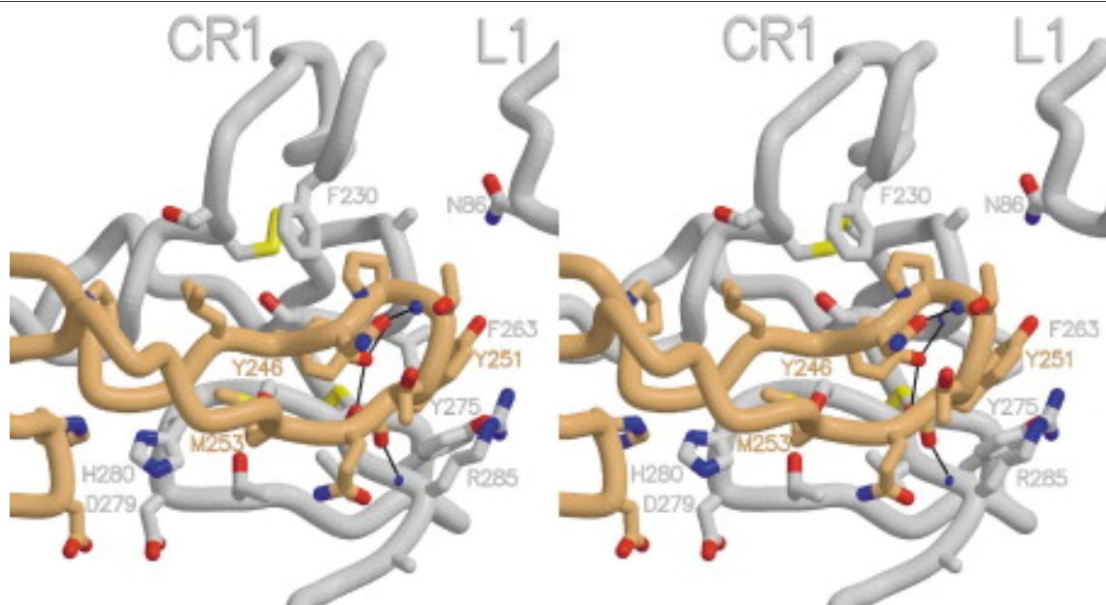
Slika 3. Model aktivacije EGFR dimera inducirane vezanjem liganda [14]



Slika 4. Dodirna ploha između kinaznih domena EGFR dimera [16]



Slika 5. Kontaktna mjesta između aminokiselina EGFR dimera nakon vezanja EGF [18]

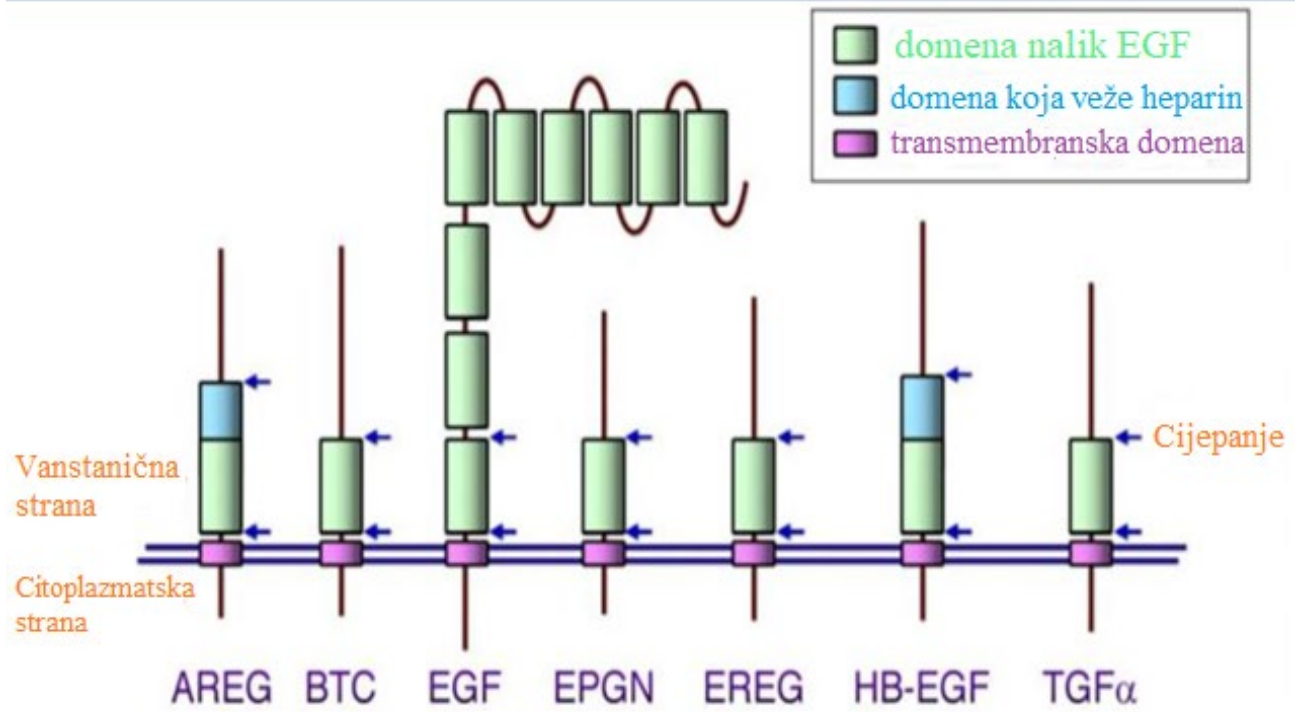


Slika 6. Kontaktna mjesta između aminokiselina EGFR dimera nakon vezanja TGF- α [21]

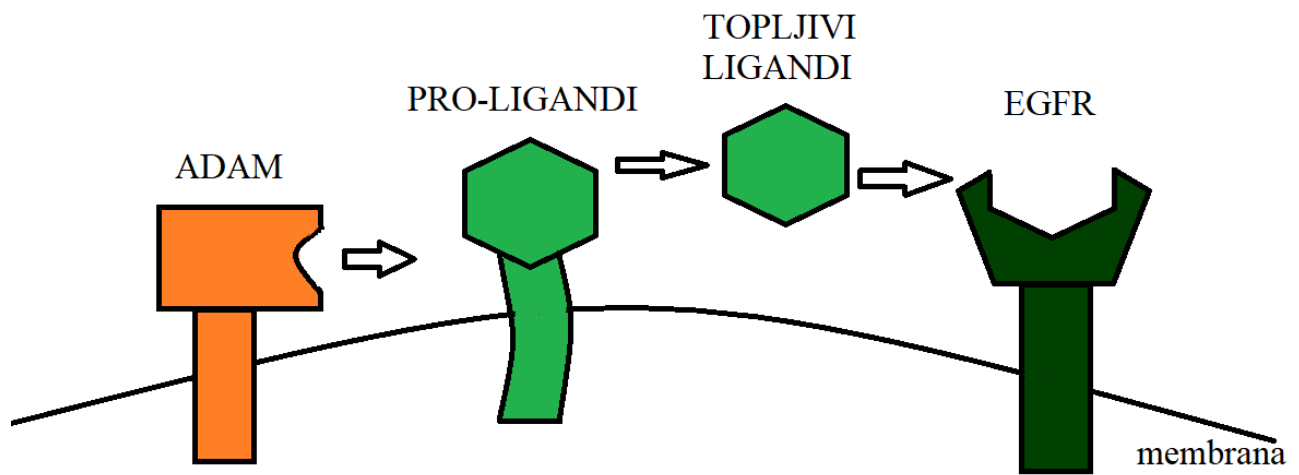
ErbB3 i ErbB4 prije vezanja liganda zauzimaju zatvorenu konformaciju i zato se prepostavlja sličan princip autoinhibicije dimerizacije kao kod ErbB1. U potpunosti se suprotno ponaša receptor HER2, koji ima konstitutivno otvorenu konformaciju što ga čini sposobnim za heterodimerizaciju s receptorima ErbB porodice kao i homodimerizaciju naročito kod prekomjernog izražaja HER2. Stoga su stanice s povećanim izražajem HER2 podložne transformaciji u maligne tumorske stanice (primjerice rak dojke koji odgovara na biološki lijek Herceptin – trastuzumab). Zbog strukturnih i funkcionalnih nedostataka, HER2 i ErbB3 receptori imaju potrebu za heterodimerizacijom s drugim ErbB receptorima [22]. Za razliku od ErbB porodice, kod drugih porodica RTK (IGF receptor, MET receptor, Eph, PDGF receptor) fosforilacija aktivacijske petlje na receptoru dovoljna je za aktivaciju receptorske tirozin kinaze [8].

1.4. Ligandi

EGFR veže 7 različitih molekula faktora rasta koji se mogu podijeliti na one koje pokazuju veći afinitet (EGF, TGF- α , BTC i HB-EGF) i na one koji pokazuju manji afinitet prema receptoru (AREG, epiregulin, i epigen) [23]. Aktivacija receptora odvija se na sličan način: faktori rasta vežu se za vanstanične domene, izazivaju dimerizaciju receptora i posljedičnu transfosforilaciju kao i aktivaciju nizvodnih staničnih signalnih puteva. Unatoč ovim sličnostima, aktivacija dimera različitim ligandima izaziva različite konformacijske promjene u strukturi receptora što dalje dovodi do aktivacije različitih bioloških aktivnosti [24]. Sintetiziraju se kao proteinski prekursori sadržavajući vanstaničnu, transmembransku i citoplazmatsku domenu (Slika 8.). Vanstaničnu domenu liganda TGF- α , amfiregulina, HB-EGF cijepa metaloproteinaza ADAM17, dok se EGF i betacelulin preuređuju proteinazom ADAM10 [25]. Na taj se način oslobađaju topljivi faktori rasta koji se potom vežu za receptore i aktiviraju ih u sklopu endokrine, parakrine ili autokrine stimulacije. Kod endokrine stimulacije faktori rasta ulaze u cirkulaciju i stimuliraju udaljene stanice. Parakrini put odnosi se na stimulaciju susjednih stanica, a autokrini put podrazumijeva stimulaciju stanice vlastitim faktorima rasta [26].



Slika 7. Membranski vezani faktori rasta [26]



Slika 8. Cijepanje prekursora molekula faktora rasta metaloproteinazama [25]

1.4.1. Epidermalni faktor rasta (EGF)

Epidermalni faktor rasta (EGF) ponaša se kao mitogen tj. veže se većim afinitetom za EGFR i izaziva dimerizaciju što posljedično dovodi do aktivacije ključnih odgovora u stanici [27]. Prekursor duljine 1207 aa ($M_r = 130\text{--}160$ kDa) proteolitički se cijepa čime nastaje zreli EGF polipeptid duljine 53 aa ($M_r = 6\text{--}8$ kDa) [28]. Kristalna struktura EGF sastoji se od domene A (aminokiselina 6-19, strukture α -zavojnice), domene B (aminokiselina 20-31, strukture β -ploče) i domene C (aminokiselina 33-42) [18]. EGF je prisutan u visokim koncentracijama u tjelesnim tekućinama poput žuči, urina, mlijeka i ključan je u razvoju zubiju, mozga, kože, probavnog i reproduktivnog sustava [18]. Zapaženo je da nepravilnosti i mutacije ovoga gena mogu dovesti do narušene ravnoteže magnezija u organizmu (hipomagnezijemije tipa 4) kao i do razvoja određenih vrsta karcinoma [29].

1.4.2. Transformirajući faktor rasta (TGF- α)

Transformirajući faktor rasta (TGF- α) je biološki aktivan polipeptid koji se strukturalno podudara sa srodnim EGF (slažu se u 40% sekvence). S obzirom na sličnosti u homologiji, oba se liganda natječu za vezno mjesto na vanstaničnoj domeni EGFR. Mutacije TGF- α povezane su s pojavom melanoma, seboroične keratoze i sličnih kožnih manifestacija [30]. TGF- α je polipeptid sastavljen od 50 aminokiselina, eksprimiraju ga stanice duž probavnog sustava. Unutar tankog crijeva i kolona, izražaj TGF- α odvija se u gornjim (neproliferativnim) zonama, što ukazuje na to da je fiziološka uloga liganda usmjerena na diferencijaciju i migraciju stanica više nego na samu proliferaciju [31].

1.4.3. Heparin vezujući-EGF (HB-EGF)

HB-EGF je polipeptid duljine 86 aa koji nastaje proteolizom iz prekursora duljine 208 aa [32]. HB-EGF sudjeluje u staničnoj proliferaciji posredovanoj makrofagima. HB-EGF u organizmu nalazimo u topljivom i membranski vezanom obliku. Membranski vezani faktor rasta i receptor toksina difterije ista su molekula. Toksin difterije veže se za HB-EGF i nakon internalizacije dolazi do apoptoze stanice. HB-EGF eksprimiraju monociti/makrofagi, limfociti, stanice mišićnog sloja krvni žila, endotelne, normalne i neoplastične epitelne stanice i mnoge druge. HB-EGF veže se za EGFR i ErbB4 te inducira formiranje različitih homo- i heterodimera. HB-EGF izaziva mitotske i kemotatske učinke usmjerene prema monocitima, fibroblastima, normalnim, neoplastičnim epitelnim stanicama i brojnim drugim tjelesnim stanicama. Sudjeluje u upalnim zbivanjima, razvoju aterosklerotskog plaka, ali i u zarastanju rana. Njegova uloga u razvoju neoplazmi uključuje stimulaciju stromalne proliferacije, promicanje rasta tumora i angiogeneze. Zbog heparin vezujuće domene, HB-EGF može se vezati za heparan-sulfat proteoglikane [32].

1.4.4. Amfiregulin (AREG)

Amfiregulin je polipeptid dužine 78 aa. Djeluje mitotski na ciljane stanice poput astrocita, Schwannovih stanica, fibroblasta keratinocita, urotelnih i epitelnih stanica. Dokazano je da djeluje na razvoj i sazrijevanje mliječnih žlijezda, kostiju i placente. Radi se o još jednom EGFR ligandu koji utječe na rast i progresiju tumora. AREG posjeduje autokrinu, parakrinu i jukstakrinu funkciju. Nadalje, regulira stanične funkcije poput proliferacije, preživljenja, migracije, diferencijacije, adhezije i angiogeneze. Njegov prekomjerni izražaj je zapažen u uzorcima tkiva kolorektalnog karcinoma te kod karcinoma dojke i gušterače. Povišeni izražaj amfiregulina zabilježen je u metastatskom tumoru jetre [33, 34]. Pokazalo se da se AREG ponaša kao parcijalni agonist; stimulira skoro upola manje fosforilacije receptora u odnosu na EGF i TGF- α . AREG karakterizira bifazična kinetika formacije dimera, što znači da aktivira receptore vezujući se za monomere i postojeće dimere [23].

1.4.5. Betacelulin (BTC)

Betacelulin je polipeptid dužine 80 aa i molekularne mase 9 kDa. Kod raka dojke, povećani izražaj BTC povezan je sa smanjenim preživljenjem. Također, BTC se pokazao kao autokrini čimbenik u promicanju rasta raka gušterače. Postoji vjerojatnost da su mutacije gena povezane s tipom 2 šećerne bolesti u ljudi. BTC ima važnu ulogu u regulaciji razvoja folikula jajne stanice i stimulira sazrijevanje oocite [35]. Potentan je mitogen za stanice mrežnice i povećava permeabilnost krvnih žila. Stimulira proliferaciju stanica gušterače i sekreciju inzulina. Molekula BTC veže se za ErbB1 i ErbB4 koji posljedično tvore dimere [35].

1.4.6. Epiregulin (EREG)

Epiregulin je protein sastavljen od 46 aminokiselina i slaže se u 24–50% sekvence s ostalim članovima EGF porodice. [36]. EREG se veže za EGFR receptor i ErbB4, ali može stimulirati i heterodimerizaciju HER2 s ErbB3. Epiregulin sudjeluje u normalnim fiziološkim stanjima, ali odgovoran je i za nastanak brojnih patoloških stanja. Doprinosi zacjeljivanju rana i tkiva, sazrijevanju oocita, regulaciji angiogeneze, proliferacije i upale. Poremećena aktivnost epiregulina doprinosi razvoju brojnih maligniteta uključujući rak mokraćnog mjehura, želuca, kolona, dojke, pluća, glave i vrata te jetre [37].

1.4.7. Epigen (EPGN)

Epigen je epitelni mitogen koji nastaje iz prekursora (duljine 154 aa) djelovanjem ADAM17 proteinaze [38, 39]. EPGN izaziva visoku stopu proliferacije u slučajevima pojačanog izražaja ErbB1 i HER2. Suprotno njegovoj potentnoj mitotskoj funkciji, EPGN ima manji afinitet vezanja za receptor i u manjoj mjeri izaziva fosforilaciju receptora u odnosu na EGF. Međutim, za razliku od EGF, EPGN ne pokazuje sklonost degradaciji nakon disocijacije s receptora.

Na taj način EPGN se odupire signalnoj desenzitizaciji i ubraja se u visoko potentne ligande. Ekspirira se u velikoj mjeri u tkivu jednjaka [40]. EPGN je pronađen u korijenu folikula dlaka i ekspirira se u invazivnim adenokarcinomima dojke i prostate [38].

1.4.8. Neuregulini

Neuregulini su skupina čimbenika rasta koji su srodni EGF. Ulaskom u interakciju s ErbB receptorima posljedično dovode do pojačanog rasta i diferencijacije epitelnog, živčanog tkiva i ostalih vrsta stanica. Neuregulini se vežu za ErbB3 i ErbB4 receptor. Posebica je važna njihova uloga u proliferaciji, diferencijaciji Schwannovih stanica na periferiji živčanog sustava [41].

1.4.8.1. Neuregulin 1 (NRG1)

Neuregulin 1 (NRG1) ligand je za ErbB3 i ErbB4 receptor. Alternativnim prekrajanjem NRG1 mRNA nastaje ~15 “klasičnih” NRG1 izoformi. Sve izoforme posjeduju domenu nalik EGF, koja je ključna za biološke učinke liganda NRG1. Izoforme imaju ulogu u poticanju rasta i diferencijacije epitelnog, glijalnog, živčanog, srčanog i skeletno-mišićnog tkiva; potiču izražaj acetilkolinških receptora u neuromišićnoj spojnici i stimuliraju proliferaciju Schwannovih stanica; utječu na proizvodnju mlijeka i diferencijaciju tumorskih stanica dojki [42].

1.4.8.2. Neuregulin 2 (NRG2)

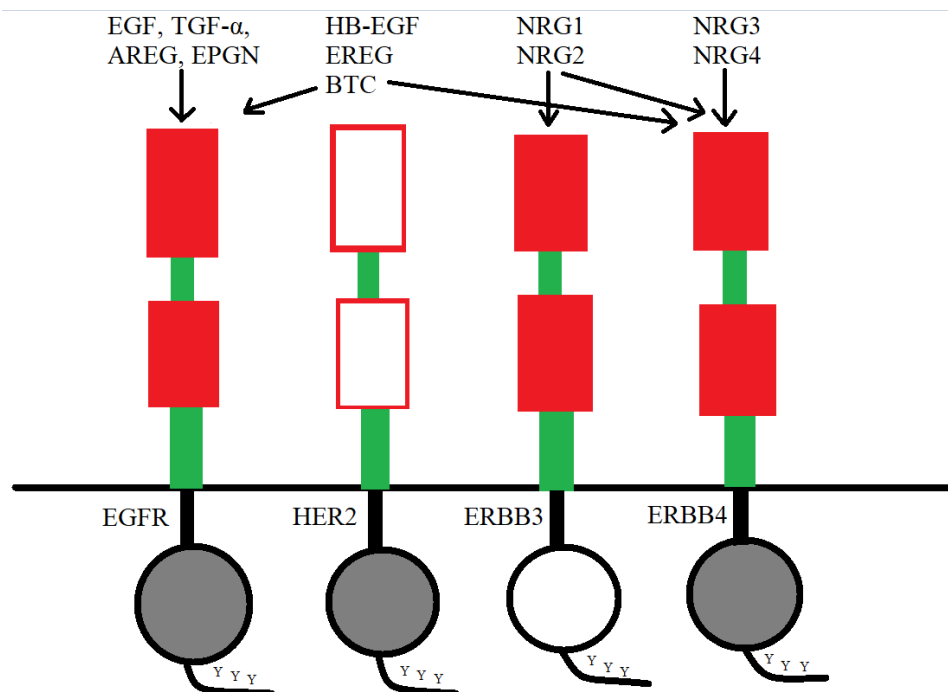
Neuregulin 2 (NRG2) ligand je za ErbB3 i ErbB4 tirozin kinazne receptore. Gen za prekursor nalazi se na lokusu 5q31.2. Sukladno tome dolazi do dimerizacije ErbB1 i HER2 što rezultira aktivacijom receptora i pridruženih nizvodnih signalnih puteva [41].

1.4.8.3. Neuregulin 3 (NRG3)

Neuregulin 3 (NRG3) veže se samo za ErbB4 receptor. Gen za prekursor nalazi se na lokusu 10q23.1. Alternativnim prekrajanjem nastaju transkripti koji se mogu podijeliti u 4 skupine. Strukturalne i polimorfne varijacije NRG3 povezane su s pojavnošću zaostajanja u razvoju, kognitivnog oštećenja, autizma i shizofrenije. Po tome se zaključuje da je NRG3 bitan za razvoj živčanog sustava [43].

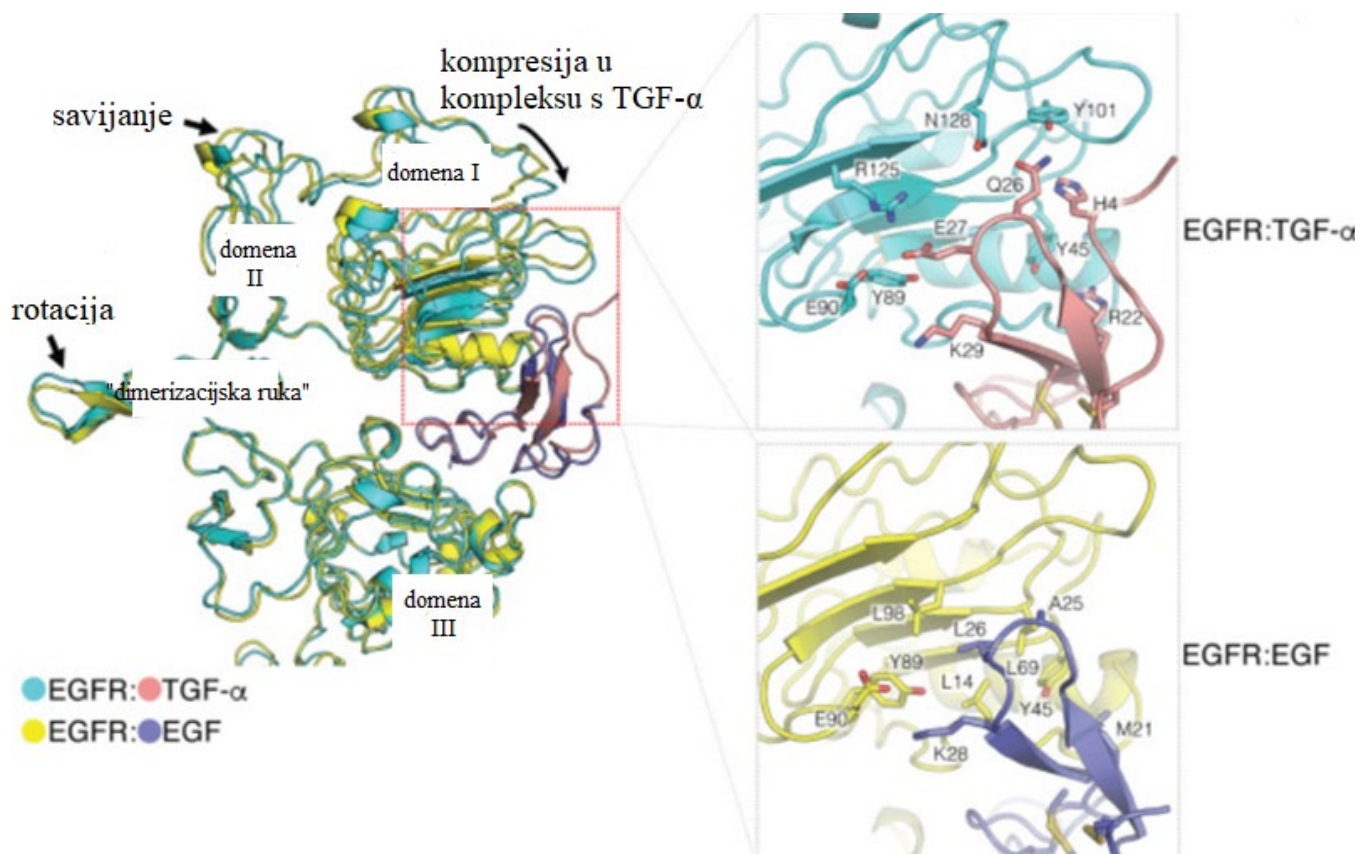
1.4.8.4. Neuregulin 4 (NRG4)

Neuregulin 4 (NRG4) isključivo se veže za ErbB4. Smanjeni izražaj NRG4 uvelike korelira sa stadijem, težinom i tipom karcinoma mokraćnog mjehura. Izražaj NRG4 smanjuje se s progresijom bolesti. Također, manji je izražaj NRG4 kod invazivnih tumora u odnosu na neinvazivne. Stoga se povećani i udruženi izražaj ErbB3, ErbB4 i NRG4 povezuje s boljom prognozom i preživljenjem [44].



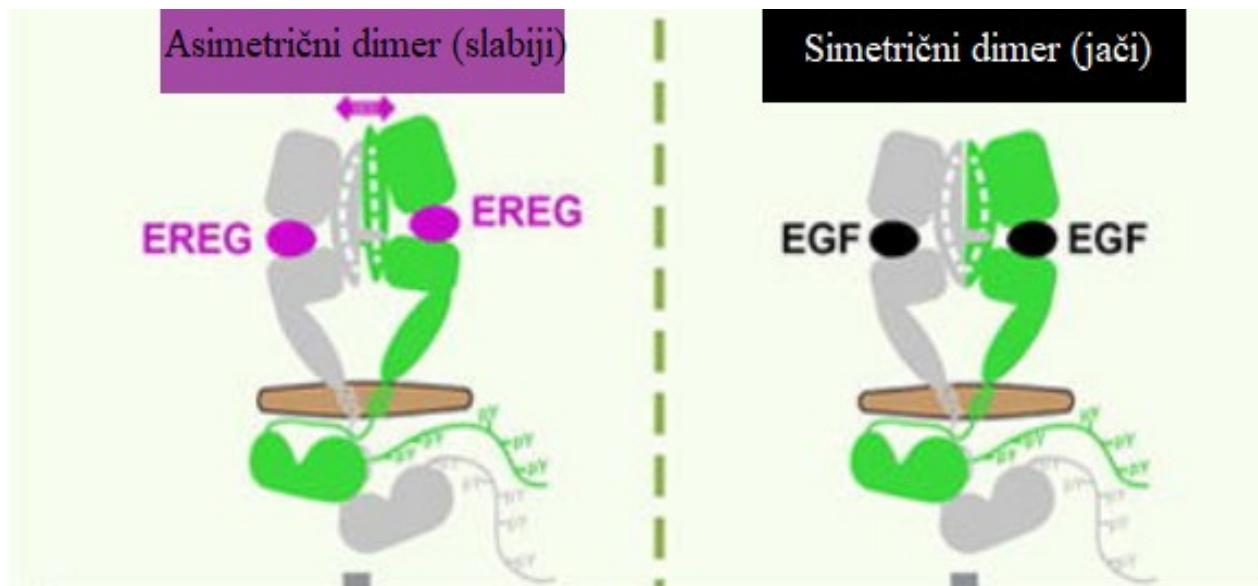
Slika 9. ErbB receptori i njihovi ligandi

Iako pripadaju ligandima većeg afiniteta, EGF i TGF- α izazivaju različite promjene konformacije receptora te različite odgovore nizvodno. Analizama je ustanovljeno da je "džep", kojeg tvore vezujuće domene s ligandom, više komprimiran u kompleksu receptora s TGF- α u odnosu na kompleks receptora s EGF (Slika 10.). Aktivnija konformacija kinaznih domena je ona u kojoj su N-terminalni krajevi transmembranskih domena (locirani uz ekstracelularnu stranu stanične membrane) EGFR orijentirani jedan prema drugom. Ovakvo prostorno uređenje podjedinica receptora dovodi do međusobnog udaljavanja krajeva domena IV. Pokazalo se da EGF svojim vezanjem stabilizira i održava ovakvu konformaciju bolje nego TGF- α i time izaziva veću kinaznu aktivnost od TGF- α [45].



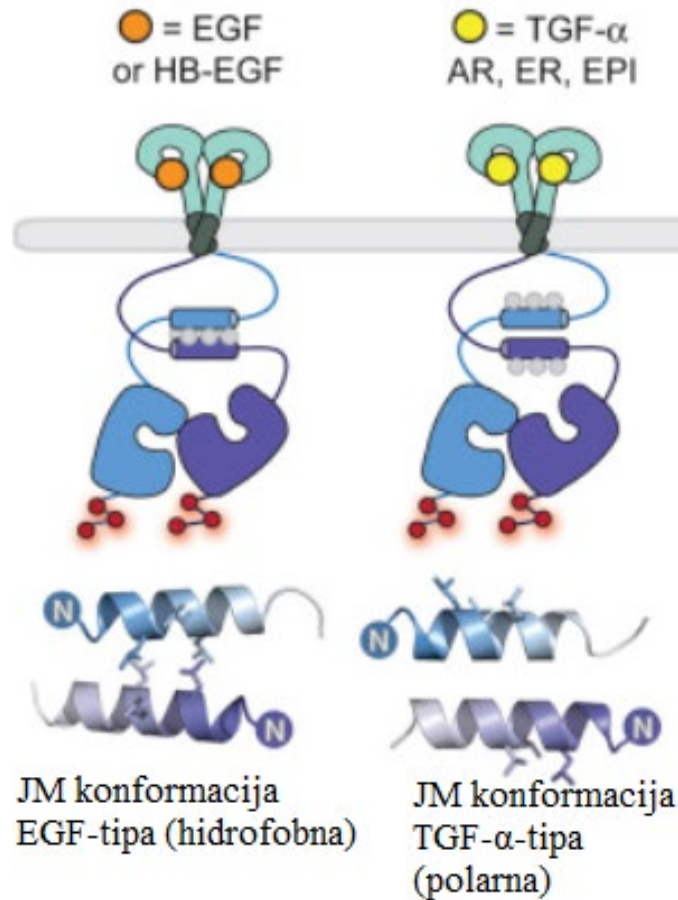
Slika 10. Usporedba vanstaničnih domena koje su vezale EGF odnosno TGF- α [45]

Struktura EREG/EGFR kompleksa bitno se razlikuje od struktura koje tvore EGF i TGF- α s receptorom zato što se domena II kod EREG/EGFR dimera ne savija prilikom vezanja za domene I i III. Zbog takvog nepovoljnog položaja dimerizacijske ruke, EREG/EGFR dimer smatra se slabijim u odnosu na one koje tvore EGF i TGF- α (Slika 11.) [46].



Slika 11. Usporedba kompleksa EREG/EGFR i EGF/EGFR s obzirom na konformaciju vanstaničnih domena i jačinu dimera [46]

Promjene u transmembranskoj regiji utječu na konformaciju jukstamembranske domene. Faktori rasta poput EGF i HB-EGF induciraju nastanak hidrofobne, leucinom bogate strukture unutar JM domene (namotana zavojnica EGF tipa). TGF- α , AREG, EREG i EPGN dovode do nastanka polarne strukture (namotana zavojnica TGF- α tipa). Dvije JM-A zavojnice rotirane su za 150° u obrnutom smjeru što znači da su leucini u ovoj konformaciji s vanjske strane zavojnice. Moglo bi se reći da postoji korelacija između strukture JM domene i različitih nizvodnih zbivanja. Naime, EGF i HB-EGF izazivaju kratkotrajniji signal nakon stimulacije zbog veće stope degradacije receptora u odnosu na ligande koji izazivaju dugotrajniji signal s većom stopom recikliranja receptora. Također je pretpostavka da proteini (npr. PKC, kalmodulin) koji se preferirano vežu na jednu od konformacija JM domene izazivaju aktivaciju različitih signalnih puteva [47, 48].



Slika 12. Različite konformacije JM domene [47]

1.5. Endocitoza

Važan regulator signalizacije putem tirozin kinaznih receptora je endocitoza. Dio stanične membrane uvrće se i obavlja receptor zajedno s vanstaničnom tekućinom. Formirana vezikula otkida se i transportira receptor unutar stanice. S obzirom na to da su nađene visoke koncentracije EGF i aktiviranog EGFR u klatrinom obloženim vezikulama, može se zaključiti da se internalizacija EGFR uglavnom odvija putem endocitoze ovisne o klatrinu. Osim toga, poznata je činjenica da su mutacije proteina koji sudjeluju u klatrinom ovisnoj endocitozi odgovorne za inhibiciju internalizacije aktiviranog EGFR u normalnim (fiziološkim) uvjetima.

Istraživanja su pokazala da mutacije proteina iz klatrinskog puta ne utječu na stopu internalizacije u slučaju kada se radi o povećanom izražaju EGF, što bi značilo da se u takvim uvjetima internalizacija odvija putem endocitoze neovisne o klatrinu [49].

1.5.1. Endocitoza ovisna o klatrinu

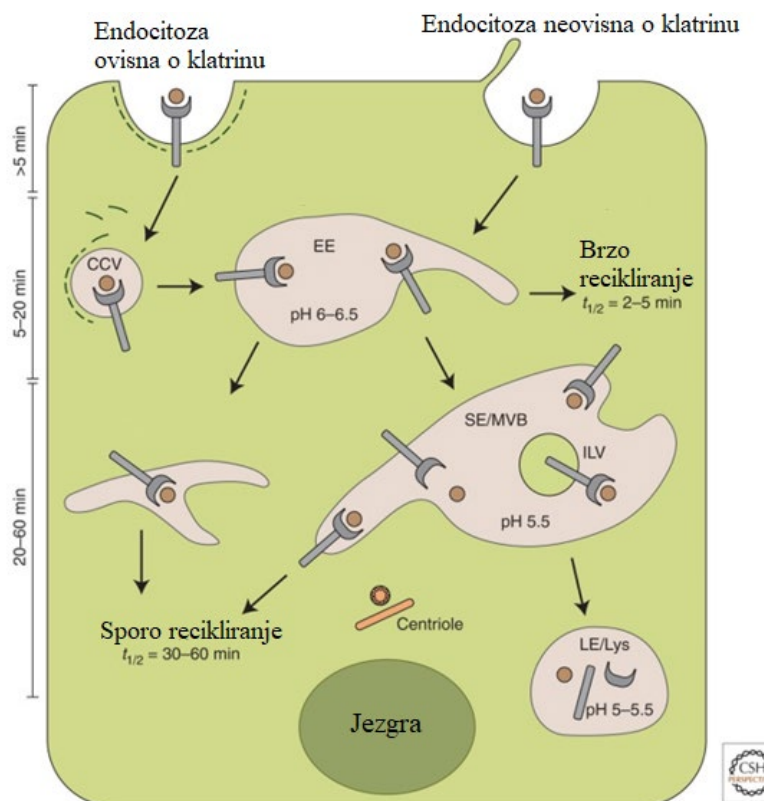
Klatrinom predvođena endocitoza je najbolje reguliran i najbrži put internalizacije integralnih proteina. Najviša stopa internalizacije putem klatrina je zapažena kod fizioloških koncentracija liganda. Međutim, klatrinsku endocitozu karakterizira ograničeni kapacitet i kod visokih koncentracija EGF dolazi do aktivacije drugog puta neovisnog o klatrinu. Alosterička regulacija AP2 kontrolira inicijaciju, rast, stabilizaciju klatrinom obloženih vezikula. Dinamin je velika GTP-aza koja sudjeluje u kasnijim fazama endocitoze ovisne o klatrinu. Gradi prestenove i spirale oko suženja duboko uvučenih vezikula i na taj način katalizira otkidanje samih vezikula od membrane [50].

1.5.2. Endocitoza neovisna o klatrinu

Endocitoza neovisna o klatrinu odnosi se na više različitih puteva u kojima dolazi do internalizacije receptora mehanizmima u kojima ne sudjeluje klatrin. Jedan od tih puteva uključuje nabiranje stanične membrane i stvaranja mikro ili makropinocitoznih vezikula koje služe za prijenos molekula. Također, kao mogući putevi navode se endocitoza ovisna o kolesterolu i endocitoza putem kaveola [49]. Ovakvi putevi aktivni su u stanjima visokih koncentracija EGF i izrazito su sporiji od endocitoze ovisne o klatrinu [51].

Nakon internalizacije, klatrinske vezikule koje sadrže kompleks ligand-EGFR stapaju se s ranim endosomom unutar kojeg vlada blago kiseli pH (6.0 – 6.5). EGF/EGFR kompleks stabilan je pri vrijednostima pH unutar ranog endosoma zbog čega ostaje dimeriziran i fosforiliran što je preduvjet za ubikvitinaciju receptora. Proces ubikvitinacije odvija se vezanjem c-Cbl ubikvitin ligaze za EGF receptor preko fosforiliranog Y1045.

Rani endosom dalje sazrijeva do kasnog endosoma ili MVB (*multivesicular body*) vezikule. Fuzija MVB i primarnih lizosoma dovodi do proteolitičke razgradnje EGF/EGFR kompleksa [49]. Ipak, dokazano je da ligand-receptor kompleks nastavlja signalizirati unutar endosoma što je dokaz da je endocitoza receptora ujedno i pozitivan i negativan regulator staničnih procesa. HB-EGF i BTC su izrazito otporni na utjecaj kiselog pH i poput EGF nakon ubikvitinacije odlaze u lizosom. AREG je također otporan na djelovanje niskih pH vrijednosti unutar endosoma, međutim, karakterizira ga zanemariva stopa degradacije receptora. Brza disocijacija AREG s receptora najvjerojatnije je uzrok smanjenog afiniteta kojim se veže za EGFR. TGF- α u kiselom okruženju ranog endosoma disocira s receptora koji se potom deubikvitinira, reciklira i vraća na površinu. Razlog tome je činjenica da TGF- α disocira s receptora pri pH vrijednosti od 6.5, dok EGF disocira pri 5.5. Nakon recikliranja receptora, stanica je iznova spremna za aktivaciju što znači da stimulacija TGF- α izaziva dugotrajniji signal u odnosu na EGF. Nadalje, visoku stopu recikliranja pokazuju receptori nakon vezanja EREG [52].



Slika 13. Prikaz procesa endocitoze [51]

1.6. Nizvodni signalni putevi

Vežanjem EGF za EGFR dolazi do transfosforilacije tirozinskih ostataka nakon čega se na njih vežu signalni proteini s SH2 ili PTB domenama. Od svih ostalih članova porodice, EGFR se izdvaja kao član koji sudjeluje u najviše signalnih puteva. RAS-RAF-MEK-ERK MAPK, PI3K-AKT i PLC- γ 1-PKC navode se kao jedni od ključnih puteva za odvijanje staničnih procesa. Rezultati aktivacije ovakvih puteva su rast, proliferacija, diferencijacija, migracija i preživljenje stanica [13, 53].

1.6.1. RAS-RAF-MEK-ERK MAPK

SH2 domena Grb2 proteina veže se na fosforilirane ostatke aktiviranog EGFR (Y1068 i Y1086). SH2 domena ili PTB domena SHC proteina veže se na Y1148 i Y1173. Nakon vezanja za EGFR dolazi do fosforilacije SHC proteina koji potom veže Grb2. SOS1 ulazi u interakciju s Grb2 proteinom preko njegove SH3 domene. SOS predstavlja faktor izmjene nukleotida gvanina i aktivira Ras pretvorbom GDP-a u GTP. Ras ulazi u interakciju s Raf-1 koji nakon fosforilacije ključnih točaka veže MEK1/2, kinazu dvostruke specifičnosti koja aktivira ERK1/2. Aktivnost Ras inhibira intrinzična GTP-azna aktivnost i fosforilacija Y32 posredovana Src kinazom čime se onemogućuje vezanje Ras na Raf-1. Fosfataza SHP2 postiže suprotan učinak, defosforilira Y32 i time aktivira Ras. Oko 30% tumora u ljudi ima u pozadini mutaciju Ras gena iako još nije razvijena terapija koja bi uspješno i ciljano djelovala na Ras protein. Ras izaziva translokaciju Raf-1 na staničnu površinu. Raf se sastoji od regulatorne domene na N-terminalnom kraju i kinazne domene na C-terminalnom kraju. Nadalje, fosforilacije Raf aminokiselina S338, Y341, S471, T491 i S494 stimuliraju njegovu aktivnost. Kinaze MEK1 i MEK2 su supstrati Raf kinaze, a ERK1 i ERK2 su nizvodno od MEK1/2 kinaza. ERK dalje aktivira RSK fosforilacijom T573. RSK dalje odlazi u jezgru gdje aktivira c-Fos i SRF. Aktivirani ERK može samostalno ući u jezgru gdje stimulira stvaranje transkripcijskih faktora. Aktivacija ERK uzrokovana vežanjem EGF može inducirati izražaj FOXO1 transkripcijskog faktora koji ima ulogu u razvoju trostruko negativnog karcinoma dojke [13].

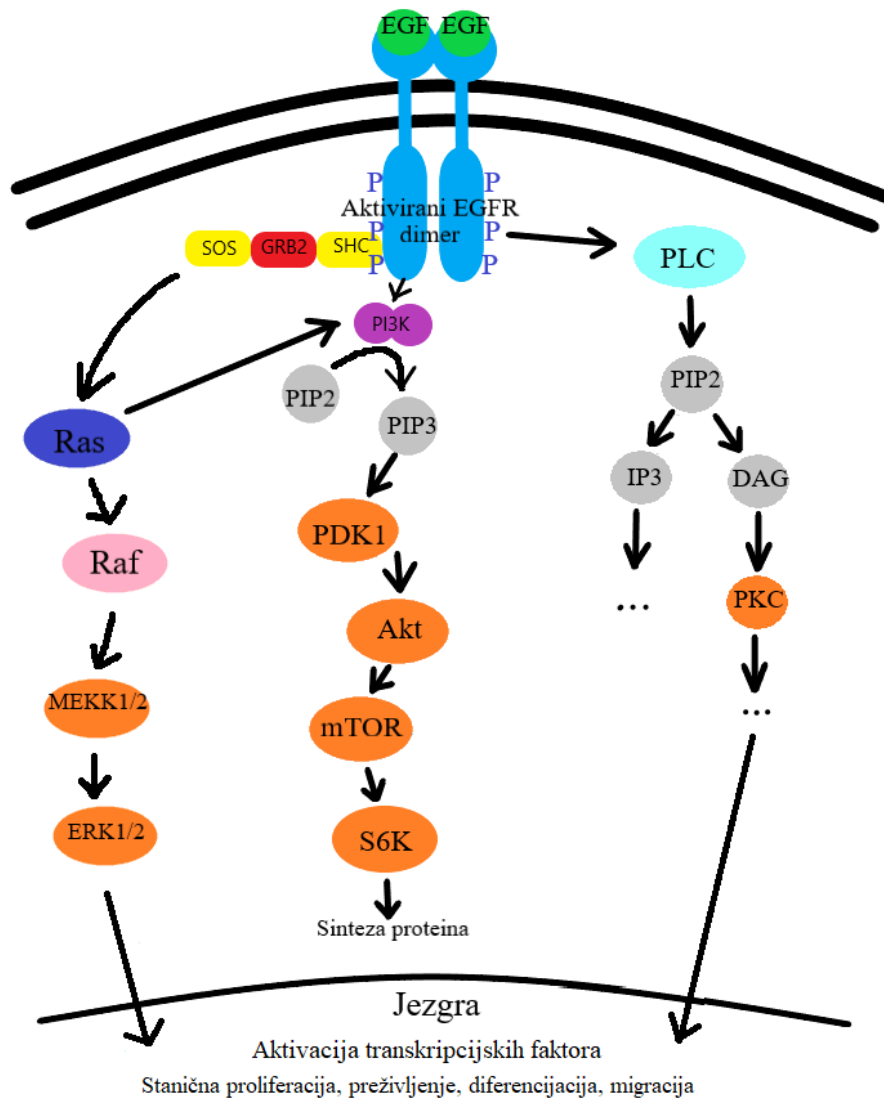
1.6.2. PI3K-Akt-mTOR

Signalna kaskada PI3K-Akt-mTOR kontrolira metabolizam, proliferaciju, veličinu stanica, mobilnost i preživljenje. Pretjerana aktivnost ovog puta je prisutna u tumorima, a poremećena je aktivnost ove kaskade u dijabetesu, autizmu i starenju. Kaskada započinje s PI3K, kinazom koja se sastoji od regulatorne p85 podjedinice koja posreduje vezanje za receptor i katalitičke p110 podjedinice koja fosforilira 3-OH grupu membranskog lipida PIP2 te time nastaje PIP3. PIP3 je poveznica između kinazne aktivnosti PI3K i cijele mreže nizvodnih signalnih puteva (npr. Akt/PKB). PI3K veže se direktno na aktivirani ErbB3 i ErbB4 zbog motiva kojeg prepoznaje p85 podjedinica, a indirektno veže EGFR i HER2 preko adaptor proteina Gab1 koji se prethodno fosforilira. Ras veže p110 podjedinicu PI3K, a Cbl protein veže p85 podjedinicu i regulira interakciju PI3K i EGFR. Aktivirani EGFR stimulira Akt translokaciju do plazmatske membrane i PH domenom ulazi u interakciju s PIP3. Fosforilacija Akt prethodi njegovoj aktivaciji, a maksimalna aktivacija postiže se fosforilacijom S473. Postoje 3 člana Akt porodice, Akt1, Akt2 i Akt3 od kojih su Akt1 i Akt2 bolje istraženi. Akt1/2 široko su rašireni dok je Akt3 eksprimiran u mozgu, srcu i bubrezima. Akt2 glavna je izoforma odgovorna za metabolizam glukoze. Pokazalo se da gubitak jedne od izoformi ne može biti nadoknađen s ostale dvije. Pretjerani izražaj izoforme 1 i 2 dovodi do nastanka različitih vrsta tumora. EGF stimulacija ne mijenja izražaj Akt. Akt posreduje stanično preživljenje fosforilirajući i inaktivirajući proapoptotski protein BAD te inhibirajući aktivnost kaspaza. mTOR prima signale od Ras proteina i PI3K. Nadalje, Akt signalizira mTOR koji se sastoji od dva kompleksa, mTORC1 i mTORC2. mTORC1 regulira stanični rast, autofagiju i sintezu proteina. Dva efektor mTORC1-a su 4E-BP i S6K čijom se fosforilacijom aktivira i održava translacija [13].

1.6.3. PLC- γ 1-PKC

PLC- γ 1 veže se direktno na PKC na fosforilirane Y992 i Y1173 preko SH2 domene. Fosfolipaza C aktivira se fosforilacijom Y472, Y771, Y778, Y783 i Y1254 aminokiselinskih ostataka.

U blizini plazmatske membrane aktivirana PLC- γ 1 hidrolizira PIP2 na slobodni IP3 i diacilglicerol (DAG). IP3 veže se za receptore na endoplazmatskom retikulumu i stimulira oslobađanje kalcija u citoplazmi, dok DAG aktivira protein kinazu C (PKC). PKC može aktivirati veliki broj proteina uključujući EGFR, H-Ras, Raf-1, BAD, fosfolipazu D (PLD). Osim toga, PKC fosforilira T654 aminokiselinu EGF receptora i time blokira aktivaciju receptora. [13].



Slika 14. Mreža nizvodnih signalnih puteva

1.7. Vrste terapije i mehanizmi djelovanja na stanice tumora

Prekomjerni izražaj EGF receptora izražen je u velikom broju tumora i utječe na rezistenciju tumora na kemoterapiju i radioterapiju. Mutacije EGFR najčešće su prisutne u vanstaničnoj i tirozin kinaznoj domeni i rezultiraju produženom ili pojačanom signalizacijom receptora. Prekomjerni izražaj receptora kao i mutacije povezani su s proliferacijom, rastom, inhibicijom apoptoze, diferencijacijom, angiogenezom, tumorskom invazijom i metastaziranjem [54].

1.7.1. Karcinom pluća ne-malih stanica (engl. *non-small cell lung cancer* - NSCLC)

Rak pluća jedan je od vodećih uzroka smrti povezanih s karcinomom u svijetu, a NSCLC dijagnosticira se u 85% slučajeva karcinoma pluća. EGFR gen lociran je na kromosomu 7p11.2 i sastoji se od 28 egzona. Regija egzona 18-24 kodira tirozin kinaznu domenu receptora [54]. Najčešće mutacije nađene u toj regiji su delecija egzona 19 i točkasta mutacija na egzonu 21 (L858R). L858R mutacija i male delecije na egzonu 19 (del19) dvije su glavne podvrste mutacija nađene kod velikog broja oboljelih od karcinoma ne-malih stanica (NSCLC). Mutacija del19 nađena je u 50% slučajeva dijagnosticiranog NSCLC [55]. Leu858 koji se nalazi u sklopu A-petlje tvori hidrofobne interakcije s N-režnjem kinazne domene u inaktivnoj konformaciji receptora. Supstitucijom Leu858Arg receptor prelazi u konstitutivno aktivnu konformaciju [56]. Aktivnost L858R mutanata ovisi o dimerizaciji receptora, dok del19, ex20ins i L858R/T790M EGFR mutantima nije potrebna dimerizacija za konstitutivnu aktivaciju receptora [57]. Del19 i L858R mutanti povećavaju aktivaciju Akt induciranu vezanjem EGF i na taj način preveniraju apoptozu mutiranih stanica. L858R mutacija pokazuje izraženiju Tyr1045 fosforilaciju od *wild-type* EGFR (wtEGFR). L858R i del19 mutanti pokazali su visoku osjetljivost na terapiju TKI, iako se pokazalo da ove mutacije imaju različite kliničke ishode. Što se tiče usporavanja progresije i ukupnog preživljenja pacijenata, pacijenti s del19 mutacijama općenito žive duže od pacijenata s L858R mutacijom koji uzimaju iste lijekove. Postoji pretpostavka da se rezistencija na TKI češće razvija kod pacijenata s L858R mutacijom [7, 55].

Inicijalno, kemoterapija je bila jedina linija liječenja kod NSCLC s L858R i del19 mutacijama. Uvođenjem anti-angiogenog monoklonskog protutijela, bevacizumaba, i cisplatin-paklitaksel režima liječenja postigao se bolji klinički odgovor i dulje preživljenje bez napredovanja (PFS). Kemoterapija trenutno predstavlja standardno liječenje za osobe s uznapredovalim NSCLC i za one koji ne odgovaraju na druge vrste liječenja. Razvojem tirozin kinaznih inhibitora postigao se značajan napredak u terapiji tumora [58]. U studijama je dokazano da tirozin kinazni inhibitori postižu bolje kliničke rezultate u odnosu na kemoterapiju i zato se danas primarno koriste u liječenju NSCLC s EGFR mutacijama [59].

TKI prve generacije (erlotinib, gefitinib, ikotinib) reverzibilno se vežu za vezno mjesto ATP molekule na receptoru. Na taj način inhibiraju fosforilaciju receptora [60, 61]. Usprkos tome, vrlo često rezistencija se razvije nakon 9 do 15 mjeseci terapije. Najzastupljeniji mehanizam razvoja rezistencije na TKI podrazumijeva nastanak sekundarnih mutacija. Nakon liječenja prvom generacijom lijekova u otprilike 60% oboljelih nastaje sekundarna mutacija T790M. Radi se o supstituciji aminokiseline treonin s metioninom na poziciji 790 u egzonu 20. Dakle, zamjenjuje se treonin u ATP vezujućem mjestu zbog čega se smanjuje afinitet prema TKI molekulama [56, 62].

TKI druge generacije (afatinib, dakomitinib) ireverzibilno vežu cistein koji je na poziciji 797 slijeda receptora. Radi se o molekulama koje izazivaju razne nuspojave zbog svoje neselektivnosti. Ne djeluju isključivo na EGFR već i na druge tirozin kinazne receptore zbog očuvanja sekvence ATP-vezujućeg mjesta na kinazama. [61, 63, 64]. Također, važan nedostatak je relativno brz razvoj rezistencije za koju je najčešće odgovorna već spomenuta mutacija T790M [61].

TKI treće generacije (osimertinib, rociletinib, lazertinib, abivertinib, nazartinib, olmutinib) ireverzibilno (kovalentno) vežu ATP-vezujuće mjesto. Osimertinib, predstavnik treće generacije TKI, selektivniji je i ciljano se veže za receptor s mutacijom T790M. U usporedbi s prethodnim generacijama TKI, osimertinib ima dokazano veću učinkovitost s duljim PFS i s manjom učestalošću teških nuspojava [61]. Također, osimertinib prolazi krvno-moždanu barijeru (*blood-brain barrier* – BBB) i zato se osim u ranijim stadijima bolesti može primijeniti i u uznapredovalom stadiju bolesti (npr. kod NSCLC s metastazama na mozgu) [59].

Iako djeluju kod pacijenata s razvijenom sekundarnom mutacijom T790M EGF receptora, rezistencija na ovu skupinu lijekova nastaje zbog tercijarne mutacije C797S. Radi se o mutaciji koja nastaje na mjestu vezanja lijekova gdje je cistein na poziciji 797 zamijenjen serinom. Na taj način se smanjuje potentnost treće generacije inhibitora [61].

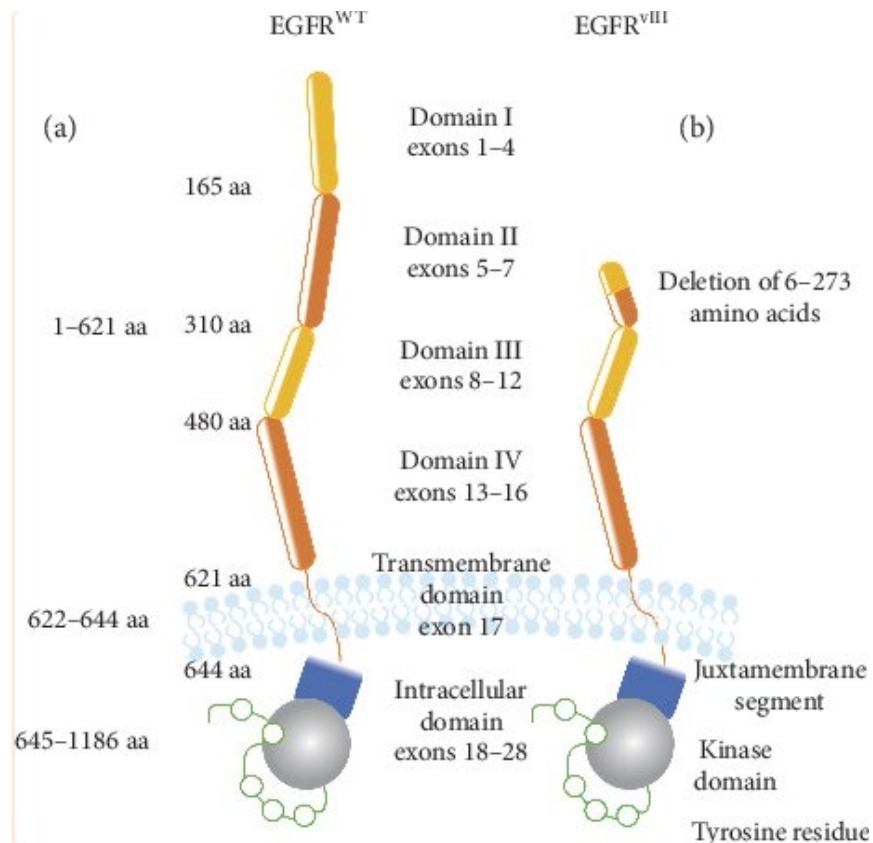
TKI četvrte generacije (EAI045, EAI001) primijenjuju se kod liječenja osoba s tercijarnom mutacijom C797S EGFR. Radi se o posljednjoj generaciji lijekova koji se nazivaju alosterički inhibitori. Ove visoko selektivne molekule, za razliku od prijašnjih TKI, ne vežu ATP-vezujuće mjesto već se vežu na kontaktnim mjestima kinaznih domena EGFR dimera. Alosterički inhibitor, EAI045, inhibira kinaznu domenu tako što stabilizira inaktivnu konformaciju α C-zavojnice. EAI045 nije učinkovit kod već aktiviranog receptora zbog nepovoljne pozicije α C-zavojnice koja zaklanja alosteričko mjesto. Kombinacije monoklonskog protutijela cetuksimaba i EAI045 proučavana je na mišjem modelu i pokazala se učinkovito. Cetuksimab blokira EGFR dimerizaciju i čini kinaznu domenu podložnom utjecaju alosteričkog inhibitora. Smatra se da je kombinacija učinkovita i kod pacijenata sa razvijenom sekundarnom L858R/T790M i tercijarnom C797S mutacijom NSCLC. JBJ-04-125-02 je još jedan primjer alosetričkog inhibitora koji je još uvijek u fazi ispitivanja. Potentniji je od EAI045 i jači u inhibiciji proliferacije mutiranih stanica. Tvori vodikovu vezi između Phe856 i Glu865 i stvara interakciju s Phe723 u kinaznoj domeni. Ima veći afinitet prema L858R/T790M i L858R/T790M/C797S mutacijama. Pokazuje pojačani učinak u kombinaciji s osimertinibom i može odgoditi razvoj sekundarne rezistencije. DDC4002 je novootkrivena molekula koja inhibira put kaspaze-7. Pokazala se djelotvornom kod mutacije L858R [65, 66].

Monoklonska protutijela koja se koriste u liječenju NSCLC su cetuksimab i bevacizumab. Cetuksimab ciljano veže vanstaničnu domenu receptora, sprječava vezanje liganda i dimerizaciju [67]. Ramucirumab (anti-VEGF receptor 2) u kombinaciji s erlotinibom je pokazao kliničke prednosti i dulji PFS u odnosu na erlotinib s placebom. Novija istraživanja su pokazala da njegova primjena s erlotinibom ima pozitivan učinak kod osoba s intrinzičkom (primarnom) rezistencijom na TKI [68].

Intrinzička (primarna) rezistencija odnosi se na *de novo* inaktivaciju TKI, a sekundarna (stečena) rezistencija definira se kao povrat bolesti nakon perioda kliničkog odgovora. Primjer primarne rezistencije je mutacija umetanja u egzon 20 (ex20in) koje su prisutne u 4-10% slučajeva dijagnosticiranog NSCLC. Ova mutacija se odnosi na umetanja ili duplikacije aminokiselina u regiji 762–774 aminokiselinske sekvence EGFR. Za razliku od već navedenih L858R i del19 mutacija, ex20in mutanti mogu aktivirati EGFR bez promjene afiniteta kinaze za ATP. Stoga, kinazna domena ex20in mutanta preferira ATP molekulu u odnosu na TKI inhibitore i time se smanjuje učinkovitost ovih lijekova. Mutanti imaju kruću konformaciju α C-zavojnice u odnosu na wtEGFR čime se dodatno ometa vezanje TKI na ciljano mjesto. Iznimka je jedna verzija ex20in mutacije (A763_Y764FQEA) koja dobro odgovara na prvu generaciju TKI. Trenutno liječenje NSCLC s ex20in mutacijom sastoji se od kemoterapije (kombinacija cisplatina ili karboplatina s taksanom ili permetreksedom) [69].

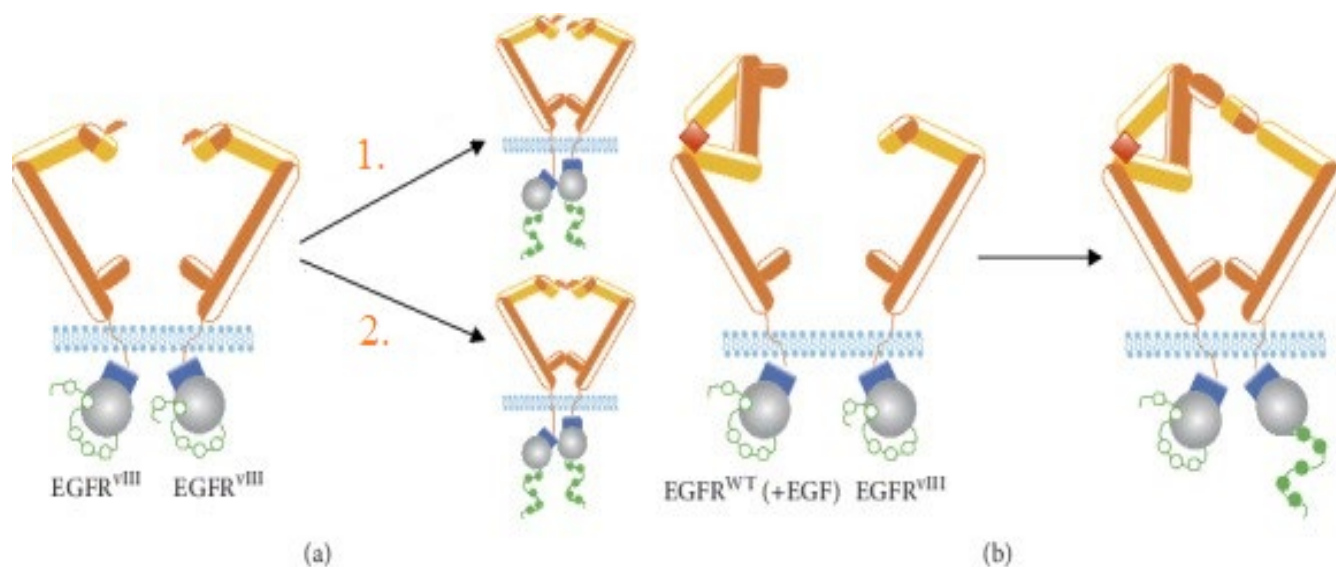
1.7.2. Glioblastom (GBM)

U glioblastomu je, uz EGFR amplifikaciju, najčešće prisutna varijanta III epidermalnog faktora rasta (EGFRvIII). Glioblastom je najčešći zloćudni tumor mozga koji zahvaća neuroepitelno tkivo. EGFRvIII podrazumijeva deleciju egzona 2-7 i prisutna je u oko 30% glioblastoma (Slika 15.). Mutacija je eksprimirana i u nekolicini drugih tumora poput karcinoma prostate, kolona, dojke, ali u manjem postotku. Delecijom regije na N-terminalnom kraju izgube se domene I i II (engl. Domain, slika 15.) čime se gubi sposobnost vezanja liganda. Delecijom velikog dijela vanstanične domene receptora raste njegova stabilnost čime se produljuje poluživot mutirane forme receptora na membrani [70].



Slika 15. Usporedba *wild-type* EGFR i EGFRvIII [70]

Istraživanja su pokazala da EGFRvIII receptor ne podliježe degradaciji nakon fosforilacije kinaznih domena. Nadalje, mutirana varijanta EGFRvIII može tvoriti hetero- i homodimere s ostalim ErbB receptorima (Slika 16.). Osim toga, EGFRvIII-pozitivne stanice luče citokine LIF i IL-6 čime se stimulira proliferacija i inhibira apoptoza stanica glioblastoma. Varijanta može biti prisutna na površini tumorskih stanica mozga nalik matičnim stanicama koje imaju ulogu u inicijaciji i progresiji tumora [70].



Slika 16. a) Kod nekovalentno (slučaj 1.) i kovalentno (slučaj 2.) vezanih EGFRvIII homodimera. Uočena je fosforilacija oba monomera. b) Heterodimerizacija EGFRvIII i *wild-type* EGFR koji je vezao EGF. Uočena je fosforilacija samo EGFRvIII monomera [70].

Danas se istražuje primjena monoklonskih protutijela panitumumaba (IgG2) i nimotuzumaba (IgG1) u liječenju GBM [71]. Razmatra se i pristup liječenja koji bi podrazumijevao istovremenu inhibiciju više ErbB receptora. Primjena dualnog TKI usmjerenog prema EGFR i HER2, lapatiniba, znatno je smanjila proliferaciju stanica GBM u usporedbi s cetuksimabom [71].

AZD3759 selektivni je EGFR inhibitor koji ima dobru permeabilnost BBB i studija u kojoj je primijenjen u skupinama ispitanika s moždanim metastazama pokazala je obećavajuće rezultate. NT113 je lijek za koji se ustanovilo da inhibira više ErbB receptora, ima visoku moždanu permeabilnost i pokazao je najznačajniji porast preživljenja miševa s intrakranijalnim GBM [72]. Terapija CAR-T stanicama daje obećavajuće rezultate iako je u ranim fazama ispitivanja. Radi se o T-limfocitima koji su modificirani *ex vivo* da lako prepoznaju tumorsku stanicu koja eksprimira ciljani antigen. Ponašaju se kao antitijela koja posjeduju citotoksična svojstva. Također se proučava primjena bispecifičnih protutijela koja pojačavaju citotoksičan odgovor T-limfocita na EGFRvIII-pozitivne stanice [70, 72].

1.7.3. Kolorektalni karcinom (CRC)

Amplifikacija gena *HER2* opisana je u 3-5% slučajeva metastatskog kolorektalnog karcinoma (mCRC). Amplifikacija *HER2* dovodi do abnormalne signalizacije koja rezultira nekontroliranom staničnom proliferacijom i tumorigenezom. Amplifikacija *HER2* prediktivni je biomarker za lošu prognozu CRC, zato što se amplifikacija *HER2* razvija kao sekundarna rezistencija na anti-EGFR protutijela cetuksimab i pantimumab koji se inače koriste u terapiji RAS *wild-type* mCRC.

Prekomjerni izražaj *HER2* kao mehanizam primarne rezistencije povezan je sa smanjenim odgovorom na terapiju anti-EGFR lijekovima, točnije cetuksimabom. Kombinacija trastuzumaba ili pertuzumaba (anti-*HER2* protutijelo) i lapatiniba pokazala je bolje rezultate što se tiče produljenja mPFS i bolji OSS u odnosu na anti-*HER2* i lapatinib monoterapiju [73]. Trastuzumab i tucatinib (TKI visoko selektivan za *HER2*) terapija ispitana je na manjoj skupini ispitanika s obećavajućim rezultatima (dulji PFS, OS, kao i bolji OSS). Trastuzumab i pirotinib (pan ErbB TKI) koji se koristi kod *HER2* pozitivnog metastatskog raka dojke, postigli su dobre kliničke rezultate kod RAS wt tumora [73, 74].

1.7.4. Terapija usmjerena na EGFR ligande

U uzorcima tkiva NSCLC detektiran je epiregulin u velikom broju tumora (oko 65%) i utvrđeno je da je njegov izražaj povezan s progresijom bolesti, kraćim preživljenjem, većom invazivnošću [75]. Izražaj EREG izrazito je nizak u zdravom tkivu odrasle osobe. Prekomjerni izražaj EREG, osim u NSCLC, nalazi se u velikom broju tumora, poput raka gušterače, kolona, dojke, prostate, timusa, glioblastoma. Mutacije *KRAS*, *BRAF* ili *EGFR* gena induciraju prekomjerni izražaj EREG i smatra se da to postižu aktivacijom MEK/ERK puta. Prekomjerni izražaj EREG dovodi do stimulacije EGFR i aktivacije više nizvodnih signalnih puteva koji rezultiraju tumorskom progresijom i metastaziranjem. Inhibicijom MEK ili ERK smanjuje se izražaj EREG u tumorskim stanicama. Terapija usmjerena na EREG predstavlja potencijalnu opciju za NSCLC EGFR mutante koji ne odgovaraju na TKI [76].

Povećani izražaj AREG u CRC povezan je s limfovaskularnom invazijom, perineuralnom invazijom, nastankom metastaza na jetri i smanjenim preživljenjem. Nađeno je da su serumske koncentracije AREG veće kod osoba s uznapredovalim CRC u odnosu na one u ranijim stadijima bolesti [77]. Kao odgovor na terapiju cetuksimabom rezistentne stanice kolorektalnog karcinoma razvijaju obrambeni mehanizam povećavajući sekreciju AREG i TGF- α . Dio rezistentnih stanica sadrži *KRAS* mutacije za koje se smatra da su povezane s povećanom proizvodnjom EGFR liganda. Nadalje, AREG i TGF- α mogu preusmjeriti EGFR u smjeru recikliranja i na taj način se smanjuje degradacija receptora. Ovo dodatno pojačava proliferacijski karakter tumorskog mikrookoliša CRC [78].

Smatra se da izražaj TGF- α pogoduje razvoju mCRC. TGF- α je prekomjerno eksprimiran u stanicama ciroze jetre. Tumori koji povećano eksprimiraju TGF- α lošije odgovaraju na terapiju cetuksimabom [79].

HB-EGF pretjerano je eksprimiran u karcinomima poput CRC, raka dojke, pankreasa, glioblastoma. Utišavanjem izražaja HB-EGF slabi EGFRvIII fosforilacija zbog čega se pretpostavlja da HB-EGF-EGFR/EGFRvIII interakcija regulira aktivaciju EGFRvIII u GBM [80]. CRM197 je HB-EGF inhibitor koji predstavlja mutirani oblik difteričnog toksina koji nije toksičan za živa bića i jednako jako veže HB-EGF i sprječava njegovo vezanje za receptor. Primjenom inhibitora CRM197 blokira se EGFR signal i dodatno se pojačava apoptoza tumorskih stanica [80].

Istražuje se i primjena RB200, kimerne molekule koja se sastoji od cjelovitih vanstaničnih domena EGFR i ErbB3 receptora vezanih na Fc domenu humanog imunoglobulina G1. RB200 veže faktore rasta poput EGF, TGF- α , HB-EGF, NRG1 te se pokazalo da inhibira ligandom induciranu fosforilaciju ErbB receptora. Pokazalo se da se uvođenjem mutacija u vanstanične domene ovakvog lijeka može postići bolja sposobnost vezanja liganda i jača inhibicija proliferacije stanica [81].

1.7.5. Tumorski mikrookoliš

Mikrookruženje ili mikrookoliš stanice medij je koji omogućuje komunikaciju između ne-tumorskih i tumorskih stanica te interakciju stanica s vanstaničnim matriksom. Radi se o vrlo složenom i jedinstvenom okruženju koje sadrži komponente vanstaničnog matriksa (npr. glikoproteini, kolagen, razni enzimi), okolne stanice koje na svojoj površini imaju različite signalne molekule, uključujući membranske receptore i polipeptidne faktora rasta. Stanice međusobno komuniciraju putem citokina, kemokina, već spomenutih faktora rasta, egzosoma itd. Stanice komuniciraju s vanstaničnim matriksom uglavnom putem integrinskih receptora koji su, osim za adheziju, bitni i zbog njihove uloge u razvoju, imunološkom odgovoru i homeostazi. Stanični mikrookoliš bogat je polipeptidnim faktorima rasta koji nakon vezanja za specifične stanične receptore, u ovom slučaju ErbB receptore, aktiviraju unutarstaničnu signalnu kaskadu i posljedično reguliraju genski izražaj ključan za odgovore u stanici. Za normalan rast i diferencijaciju stanica ključni su, između ostalog, očuvani integritet staničnih receptora i primjereni izražaj faktora rasta. Za razliku od normalnog okruženja, tumorski mikrookoliš čine tumorske stanice koje su okružene okolnim stanicama s kojima ulaze u interakciju, a koje mogu biti zdrave ili transformirane. U tumorskom mikrookolišu prevladavaju uvjeti hipoksije i acidoze koji pridonose njegovom preživljenju [82]. Tumorski mikrookoliš značajno utječe na razvoj tumora, njegovu neovaskularizaciju i metastaziranje. Danas se sve više stavlja naglasak na razvoj lijekova koji bi djelovali, osim na maligne stanice, i na sve ostale stanice koje su dio tumorskog mikrookoliša.

Ovisno o malignitetu i tipu tumora, jedan od vrlo čestih okidača za malignu transformaciju stanica je heterogeni izražaj faktora rasta. Primjerice, u ispitivanju u kojem su promatrani pacijenti s metastatskim rakom debelog crijeva, primijećena je koekspresija wtEGFR s 2, 3, 4 liganda u 43%, 35%, 23% [83].

Variables	No. of positive tumours (%)								
	% Positive tumour cells				Intensity			Location	
	> 5	> 10	> 20	> 50	1+	2+	3+	Mem	Cyto
wtEGFR	27 (44)	23 (38)	16 (26)	8 (13)	27 (44)	1 (2)	0	7 (12)	27 (44)
EGFRvIII	25 (41)	25 (41)	17 (28)	12 (20)	23 (38)	1 (2)	1 (2)	0	25 (41)
Amphiregulin	21 (34)	16 (27)	7 (12)	5 (8)	18 (30)	3 (5)	0	0	21 (34)
BTC	43 (72)	40 (67)	34 (57)	19 (32)	18 (30)	29 (48)	1 (2)	0	43 (72)
EGF	19 (31)	17 (28)	12 (20)	7 (12)	20 (33)	1 (2)	0	0	19 (31)
Epigen	41 (67)	33 (54)	25 (41)	17 (28)	33 (54)	9 (15)	1 (2)	0	40 (66)
TGFα	35 (58)	33 (55)	30 (50)	26 (43)	31 (52)	11 (18)	0	0	35 (58)
wtEGFR/Amph	13 (22)	11 (18)	3 (5)	2 (3)	10 (17)	0	0	-	-
wtEGFR/BTC	18 (30)	13 (22)	8 (13)	2 (3)	6 (10)	0	0	-	-
wtEGFR/EGF	6 (10)	4 (7)	3 (5)	0	8 (13)	0	0	-	-
wtEGFR/Epigen	17 (28)	11 (18)	6 (10)	1 (2)	12 (20)	0	0	-	-
wtEGFR/TGFα	16 (27)	12 (20)	8 (13)	3 (5)	13 (22)	1 (2)	0	-	-
wtEGFR/1 ligand	26 (43)	22 (37)	15 (25)	7 (12)	24 (40)	1(2)	0	-	-
wtEGFR/ 2 ligands	21 (35)	17 (28)	8 (13)	6 (10)	16 (27)	0	0	-	-
wtEGFR/ 3 ligands	14 (23)	10 (17)	4 (7)	0	8 (13)	0	0	-	-
wtEGFR/ 4 ligands	9 (15)	2 (3)	0	0	1 (2)	0	0	-	-

Slika 17. Imunohistokemijska ekspresija EGFR i EGFR liganada kao i njihova koekspresija u 60 pacijenata s mCRC [83]

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je modelirati biološki aktivne kimerne molekule faktora rasta, koje bi u interakciji s EGF receptorima, simulirale prisutnost različitih faktora rasta u tumorskom tkivu, odnosno mikrokruženju *in vivo*.

3. MATERIJALI I METODE

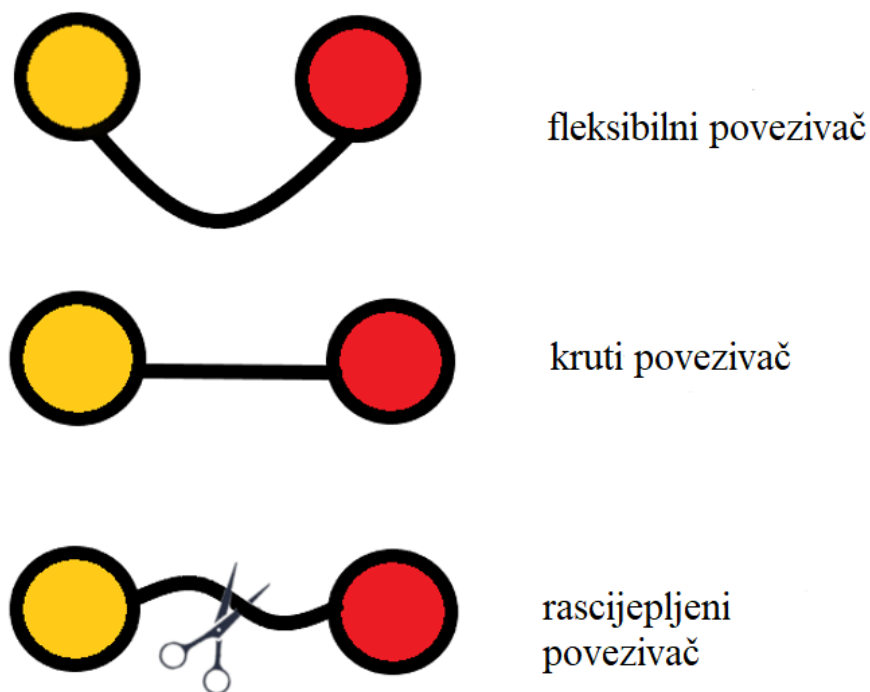
Kimerne molekule nastaju fuzioniranjem različitih ili istovrsnih proteina pomoću kraće ili duže aminokiselinske sekvence odnosno poveziavača. Pomnim odabirom poveziavača može se povećati izražaj, stabilnost, održati ili poboljšati konformacija i pojačati biološka aktivnost proteina [84]. Nadalje, kvalitetan odabir poveziavača dovodi do kreiranja fuzijskih proteina s multifunkcionalnim svojstvima koji se onda mogu primjeniti u području biotehnologije, biokemije, farmakologije, dijagnostike [85]. Duljina poveziavača odabire se ovisno o nužnoj udaljenosti između proteina koja je potrebna kako bi se osiguralo neometano slaganje strukture proteinskih podjedinica kimerne molekule [84]. Također, duljina poveziavača mora odgovarati udaljenosti između vezanih faktora rasta kako bi se osiguralo da će se kimerna molekula vezati za promatrani dimer. Svojstvo hidrofilnosti poveziavača vezuje se uz duljinu aminokiselinske sekvence (što je dulja sekvenca poveziavača to je poveziavač više izložen otapalu i time je hidrofilniji) [86]. Za formiranje strukture poveziavača najčešće se koriste poveziavači duljine 2-31 aa, pa sve do 76 aa [87]. Struktura poveziavača najčešće ovisi o mjestu djelovanja (npr. na površini stanice ili unutar stanice) i funkciji kimerne molekule.

Općenito, poveziavači se dijele na fleksibilne, krute i rascijepljene. Fleksibilni poveziavači služe kada je potrebno podjedinice povezati na pasivan način i osigurati im odgovarajuću pokretljivost. Fleksibilnost se postiže ugradnjom malih, nepolarnih aminokiselina (npr. G, A) ili polarnih (npr. S, T). Dodatkom malih aminokiselina postiže se bolja pokretljivost proteinskih domena, a dodatkom polarnih aminokiselina postiže se stabilnost kimere u vodenom mediju zbog nastanka vodikovih veza s molekulama vode. Najčešće korištena sekvenca fleksibilnog poveziavača je $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_n$ koja se ponavlja n puta, odnosno koliko je potrebno za optimalnu separaciju proteinskih domena [86].

Kruti poveziavači su uspješniji u održavanju prostorne udaljenosti kada je ona ključna za stabilnost fuzijskog proteina. Kruti poveziavači poprimaju sekundarnu strukturu tvoreći uglavnom α -zavojnice. Ponavljajući aminokiselinski slijedovi $(\text{EAAAK})_n$ osiguravaju krutu i stabilnu strukturu poveziavača. Poveziavač koji sadrže α -zavojnice uspješno odvajaju proteinske domene i istovremeno spriječavaju interakcije domena [86].

Krutost poveziavača može se povećati dodavanjem prolina u aminokiselinski slijed [88]. Aminokiselina prolin jedinstvena je zbog cikličkog elementa na kraju bočnog lanca. Nedostatak vodika u amidnoj skupini bočnog lanca prolina sprječava formiranje vodikovih veza čime se smanjuje vjerojatnost interakcija između proteinskih domena i poveziavača [86].

Fleksibilni i kruti poveziavači drže funkcionalne proteinske domene povezanima tijekom *in vivo* procesa i na taj način mogu produljiti poluživot molekule unutar plazme. Mane stabilnih poveziavača uključuju steričke smetnje, smanjenu biološku aktivnost, promijenjenu biodistribuciju i metabolizam proteina. Stoga se koriste rascijepljeni poveziavači koji *in vivo* otpuštaju funkcionalne domene pod utjecajem proteaze ili određenog reducensa. Najčešće se radi o disulfidnim poveziavačima koji sadrže cisteine te otpuštaju funkcionalne domene u krvi povodom redukcije disulfidnih veza. Ovakva vrsta poveziavača može poslužiti za dostavu prolijekova do ciljanih receptora odnosno mjesta djelovanja. Osim disulfidnih poveziavača postoje poveziavači koji su osjetljivi na utjecaj proteaza i u uglavnom su selektivniji. Proteaze mogu biti eksprimirane striktno u upali, u određenim tkivima i stanicama ili u određenim staničnim odjeljcima. Ovisno o tome koji je ciljani stanični odjeljak, stanica ili tkivo, slaže se sekvenca poveziavača koja će biti osjetljiva na prisutnu proteazu [86].



Slika 18. Prikaz različitih vrsta poveziavača [86]

Cilj ovog rada bio je modelirati kimerne molekule koje sadrže molekule faktora rasta, EGF, TGF- α , te kombinaciju EGF i TGF- α , povezane fleksibilnim i krutim proteinskim poveziivačem. Bilo je potrebno pronaći odgovarajuće sekvence poveziivača koje bi bile optimalne dužine, imale povoljan stupanj hidrofobnosti te biološki učinak aktivacije EGF receptora. Fleksibilni poveziivač modeliran je po uzoru na GSAT sekvencu koja je korištena u studiji u kojoj se nastojalo primjenom poveziivača povećati preciznost kimernih nukleaza u modificiranju genoma (Slika 19.) [89]. Za strukturu krutog poveziivača odabran je poveziivač koji sadrži elemente SAH domene mehanoenzima miozina-VI. Radi se o domenama koje tvore α -zavojniciu i stabilizirane su ponavljajućim slijedovima od aminokiselina negativnog naboja (Glu, E) te aminokiselina pozitivnog naboja (Arg, R i Lys, K). Ovakav poveziivač odlikuje izrazita krutost i stabilnost u širokom rasponu temperatura i pH vrijednosti (Slika 19.) [90]. Sekvence oba poveziivača modificirane su na način da su dodani glicini na N- i C-terminalnim krajevima poveziivača kako bi se poboljšala fleksibilnost kimerne molekule. Aminokiselinski slijed krutog poveziivača (6OBI) je skraćen na N- i C-terminalnom kraju kako bi se optimizirala duljina krutog poveziivača. Iz tog razloga, u tekstu se nadalje koriste nazivi GG-GSAT*-GG i GGG-MYO6*-GGG za odabrane poveziivače.

Kimera 1 (fleksibilni poveziavač) s EGF i GG-GSAT*-GG poveziavačem:

MNSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWE
LRGGGGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSGGGNSDSECPLSHDG
YCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWE LR

originalni GSAT:

GG SAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG

modificirani GSAT (GSAT*):

GGGG SAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSGGG

Kimera 2 (kruti poveziavač) s EGF i GGG-MYO6*-GGG poveziavačem:

MNSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWE
LRGGGQEEEEAERLRRIQEEMEKERKRREDEQRRRKEEEERRMKLEMEAKRK
QEEERKKREDGGGGNSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YI
GERCQYRDLKWWE LR

originalni 6OBI (MYO6):

KQQEEEEAERLRRIQEEMEKERKRREDEQRRRKEEEERRMKLEMEAKRKQEE
EERKKREDDEKRIQAE

modificirani 6OBI (MYO6*):

GGGQEEEEAERLRRIQEEMEKERKRREDEQRRRKEEEERRMKLEMEAKRKQE
EEERKKREDGGGG

Slika 19. Kompletne sekvence EGF i poveziavača

Kimera 3 (fleksibilni povezič) s TGF- α i GG-GSAT*-GG povezičem:

VVSHFNDCPDSHTQFCFHGTCRFLVQEDKPACVCHSGYVGARCEHADLLAGGGGSA
GGSGSGSSGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSGGGVVSHFNDCPDSHTQFCFHGTCRF
LVQEDKPACVCHSGYVGARCEHADLLA

Kimera 4 (kruti povezič) s TGF- α i GGG-MYO6*-GGG povezičem:

VVSHFNDCPDSHTQFCFHGTCRFLVQEDKPACVCHSGYVGARCEHADLLAGGGQEE
EAERLRRIQEEMEKERKRREDEQRRRKEEEERRMKLEMEAKRKQEEEEERKKRED
GGGGVVSHFNDCPDSHTQFCFHGTCRFLVQEDKPACVCHSGYVGARCEHADLLA

Slika 20. Kompletne sekvence TGF- α i poveziča

Kimera 5 (fleksibilni povezič) s TGF- α i GG-GSAT*-GG povezičem i EGF:

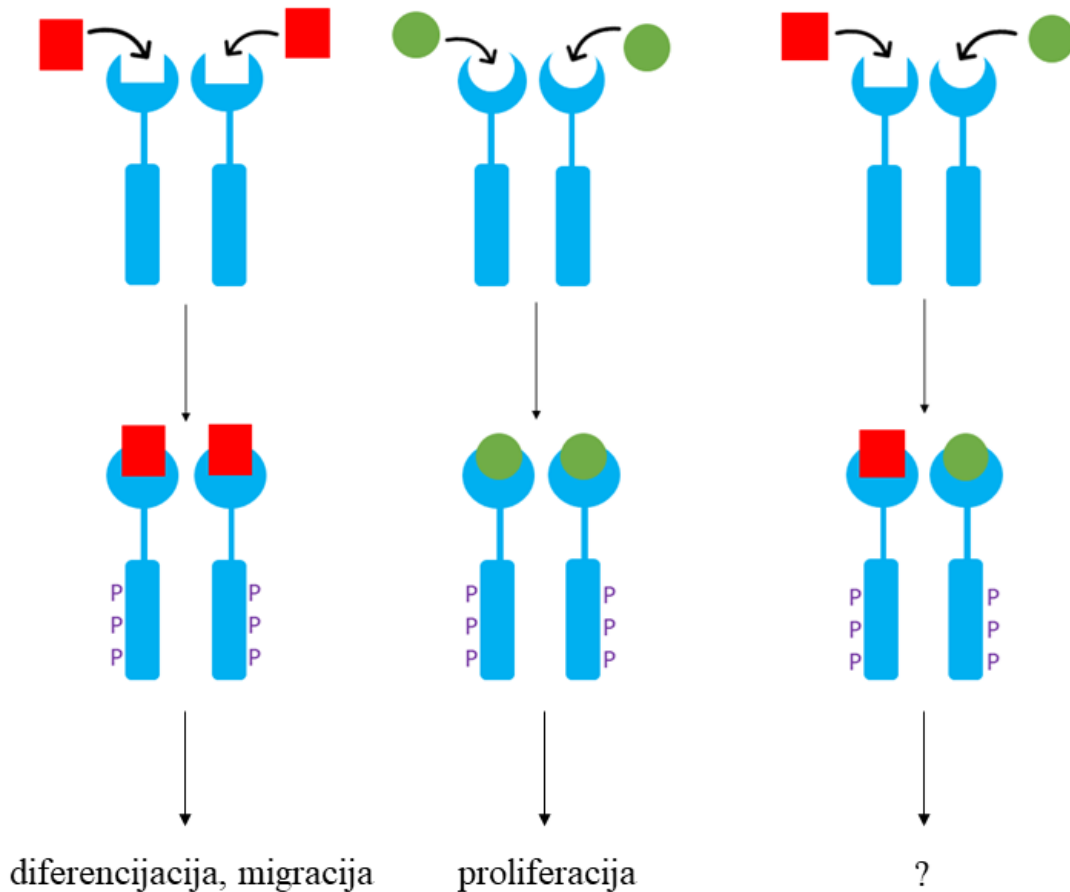
VVSHFNDCPDSHTQFCFHGTCRFLVQEDKPACVCHSGYVGARCEHADLLAGGGGSA
GGSGSGSSGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSGGGNSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYI
EALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR

Kimera 6 (kruti povezič) s TGF- α i GGG-MYO6*-GGG povezičem i EGF:

VVSHFNDCPDSHTQFCFHGTCRFLVQEDKPACVCHSGYVGARCEHADLLAGGGQEE
EAERLRRIQEEMEKERKRREDEQRRRKEEEERRMKLEMEAKRKQEEEEERKKRED
GGGGNSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR

Slika 21. Kompletne sekvence kimernih molekula TGF- α i poveziča i EGF

Sukladno s klasičnim modelom, vezanje dva istovrsna faktora rasta za receptor aktivira nizvodne signalne puteve i odgovarajuće stanične odgovore. Iz tog razloga, postavlja se pitanje hoće li vezanje dva različita faktora rasta aktivirati receptorski dimer i posljedično izazvati određeni stanični odgovor (Slika 22.). Kako bi se ispitala ta mogućnost, bilo je potrebno osmisliti način da se isključivo promatra utjecaj dva različita faktora rasta na tirozin kinazne receptore odnosno utjecaj faktora rasta na stanicu i stanične odgovore.



Slika 22. Posljedice vezanja istovrsnih i različitih faktora rasta za stanične receptore

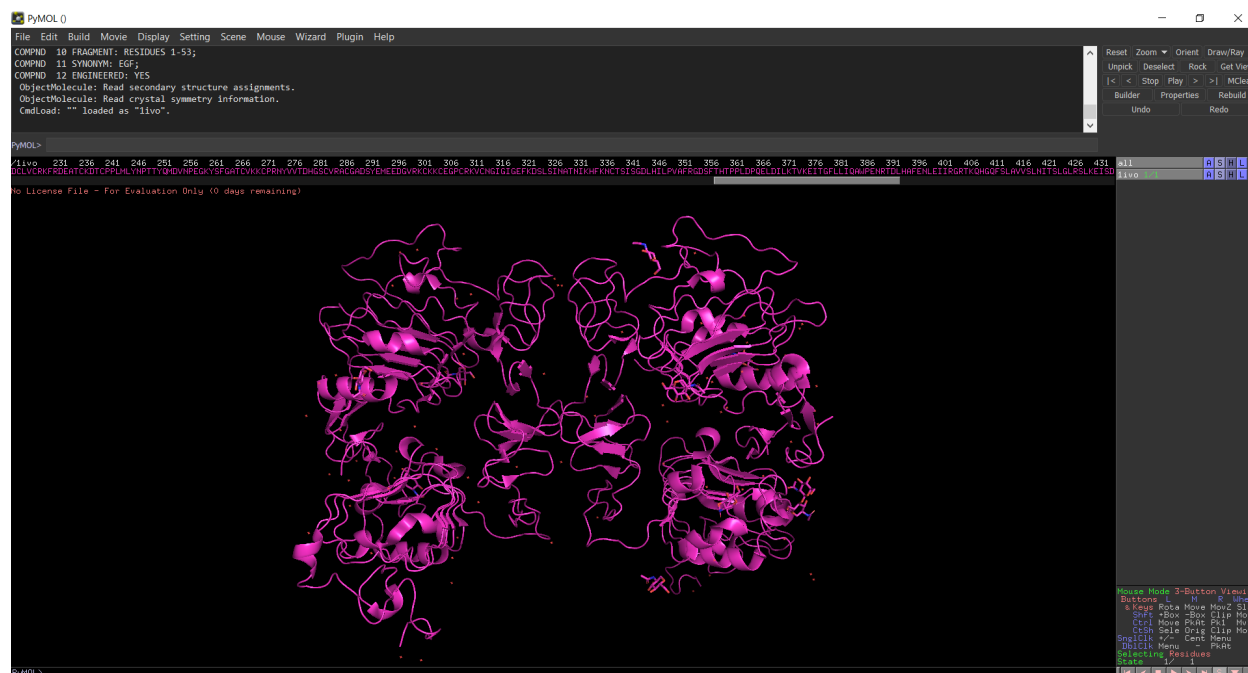
Korišten je PyMOL program za modeliranje proteinskih struktura u kombinaciji s nastavkom PyMod 3. PyMOL (Schrödinger, Inc.) je multiplatformski alat za molekularnu grafiku. Koristi se za trodimenzionalnu vizualizaciju proteina, nukleinskih kiselina, malih molekula, atoma, gustoće, površine i putanja elektrona. Također, služi za uređivanje, analizu molekula i snimanje filmova. Ovaj program temeljen na Pythonu, zajedno s mnogim Python alatima i dodacima, razvijen je kako bi se, između ostalog, olakšao računalni dizajn lijekova [91, 92].

PyMod je dodatak za PyMOL, osmišljen da djeluje kao intuitivno sučelje između PyMOL i nekoliko bioinformatičkih alata za analizu sekvence i strukture proteina, predviđanje strukture proteina i modeliranje. PyMod 3 sastoji se od osnovnog prozora za uređivanje sekvenci proteina i formiranje *cluster-a* te skupa alata i sučelja za web usluge koje proširuju PyMOL i omogućavaju analizu sekvenci i struktura: (PSI-) BLAST, MUSCLE, ClustalW, Clustal Omega, ESPript 3.0, CAMPO, SCR-FIND, PSIPRED, Ksdssp i MODELLER moduli za izradu 3D modela, usklađivanje sekvence i strukture (pomoću *CE-alignment*) i procjenu kvalitete [93, 94].

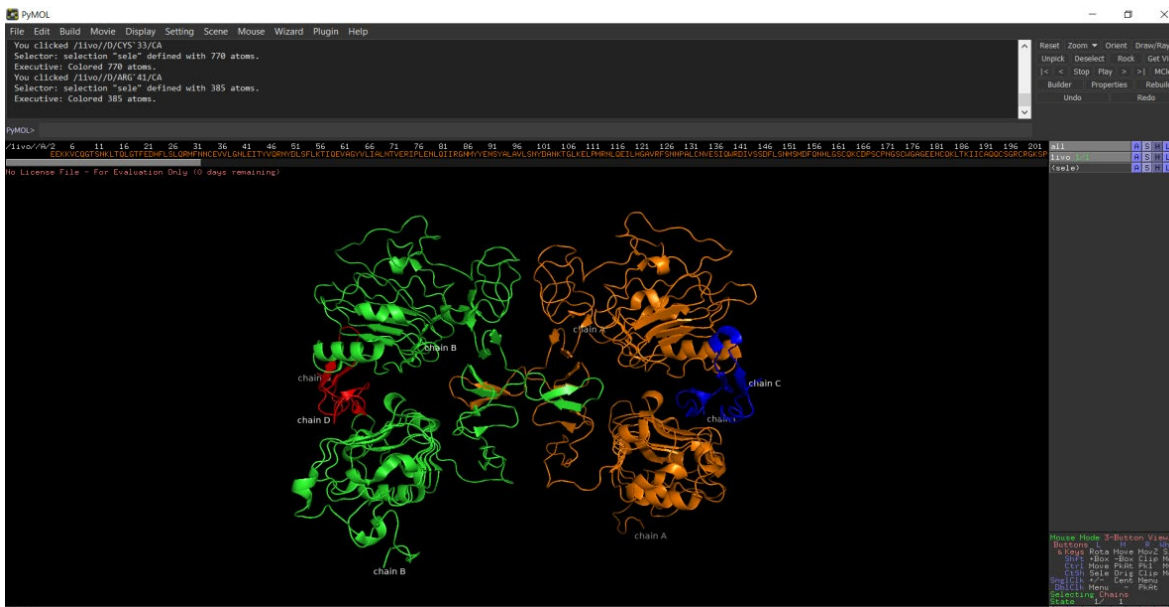
Izrađen je model s dva istovrsna faktora rasta vezana fleksibilnim (GG-GSAT*-GG) poveziivačem i krutim (GGG-MYO6*-GGG) poveziivačem. Izrađeni su, također, modeli kimernih molekula s različitim molekulama faktora rasta koji bi simulirali heterogeni izražaj faktora rasta u mikrookruženju tumora. Prilikom izrade kimernih molekula korištene su strukture faktora rasta, TGF- α i EGF, zbog njihove sličnosti u afinitetu vezanja za EGF receptor. Svi modeli koji su korišteni kao osnova za modeliranje dostupni su na stranici Protein Data Bank (PDB) [95]. Nakon modeliranja, kimerne molekule su analizirane pomoću PyMOL i ProtParam alata [96]. ProtParam (ExpASy) alat omogućuje analizu različitih fizikalnih i kemijskih parametara za dati protein pohranjen u Swiss-Prot ili TrEMBL, bazi proteinskih sekvenci, ili za sekvencu proteina koju unese korisnik. Dobiveni parametri uključuju vrijednosti molekularne težine, teoretski pI, indeks nestabilnosti, alifatski indeks te hidrofobnost proteina [96].

4. REZULTATI

PyMOL program može se koristiti za vizualizaciju, analizu i modificiranje kristalnih struktura proteina. Nastavak PyMod 3 olakšava usporedbu struktura i sekvenci različitih proteina i predstavlja posljednji korak koji je ključan za dobivanje gotovog modela kimerne molekule. Prvi korak u modeliranju kimerne molekule bio je odrediti udaljenost između dva istovrsna faktora rasta (u ovom slučaju između dva EGF) u sklopu proteinskog modela koji sadrži vanstanične domene EGFR s vezanim EGF molekulama (pdb:1IVO) [97]. Ukupna masa 1IVO iznosi 152.21 kDa, a ukupni broj atoma je 8892. Prvo je učinjeno par modifikacija kako bi se olakšala vizualizacija strukture: uklonjene su vezane molekule vode, vodikove veze i označeni su lanci različitim slovima i bojama (Slika 24.).

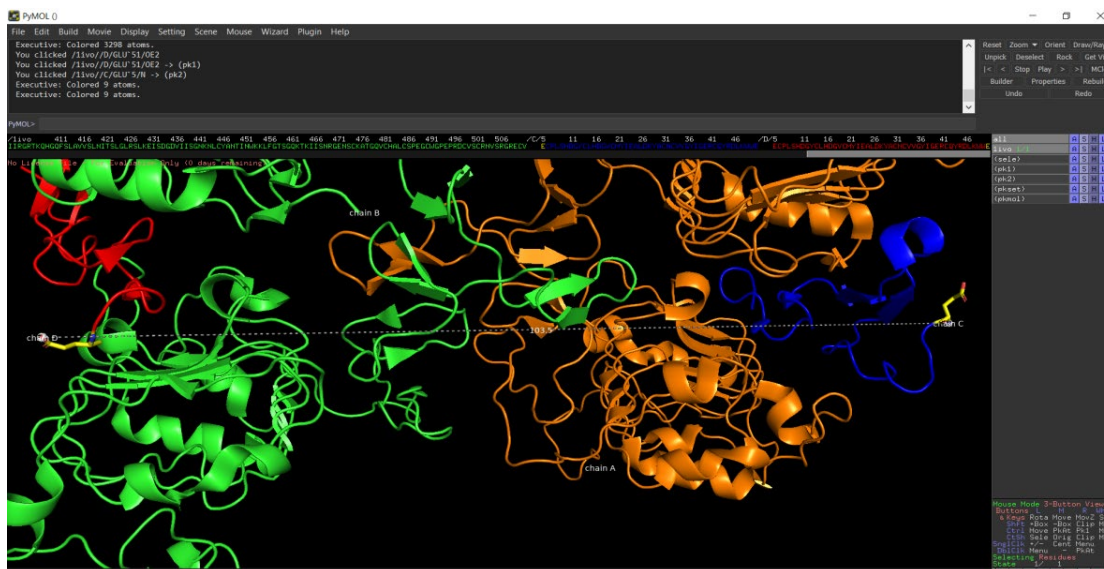


Slika 23. Struktura 1IVO



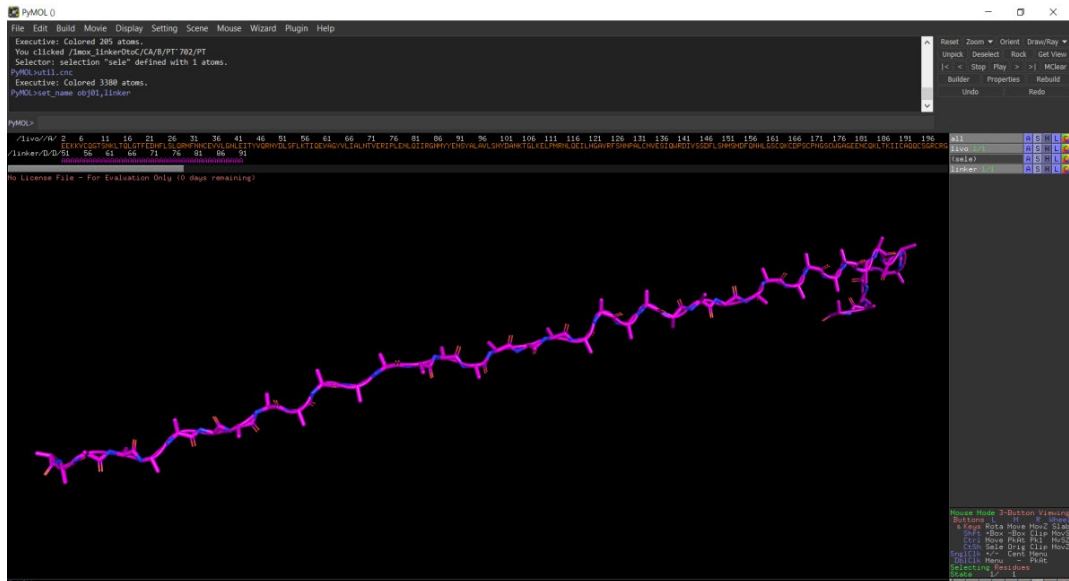
Slika 24. Modificirana IIVO struktura

S obzirom na to da bi povezač trebao vezati kraj jednog i početak drugog EGF lanca, udaljenost između dva EGF određuje se tako da se označi krajnji atom posljednje aminokiseline (C-terminalni kraj) jednog i krajnji atom prve aminokiseline (N-terminalni kraj) drugog EGF (Slika 25.). Udaljenost iznosi 103.5 Å, a ako je prosječna duljina jedne aminokiseline 3.5 Å tada se dijeljenjem ta dva broja dobiva broj 29.5 što znači da, kad zaokružimo broj, duljina povezača mora iznositi najmanje 30 aminokiselina.

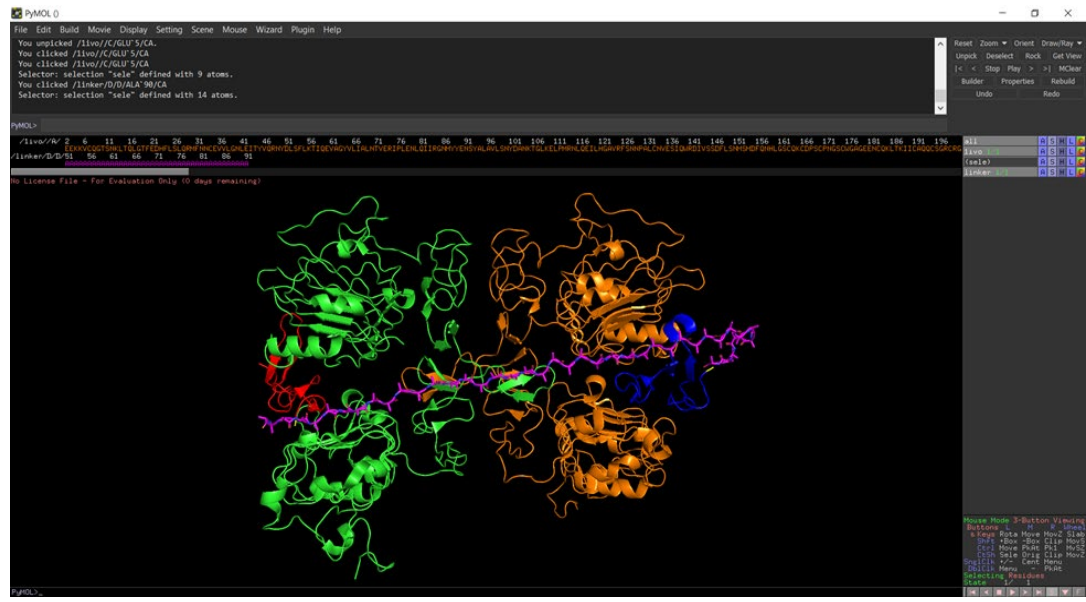


Slika 25. Izračun udaljenosti između dva EGF vezana za EGFR

Struktura fleksibilnog poveziavača GG-GSAT*-GG modelirana je po uzoru na fleksibilni poveziavač modela 1mox_linkerDtoC. Flexbilni poveziavač koji sadrži slijed od 41 alanina izdvojen je i pozicioniran u blizini modela 1IVO.



Slika 26. Fleksibilni poveziavač (41 ALA)



Slika 27. Struktura 1IVO i 41 ALA poveziavač

Idući korak bio je urediti redosljed aminokiselina u lancima C, D receptora i u lancu povezača kako ne bi došlo do preklapanja aminokiselina u sekvenci. To se čini primjenom funkcije `alter sele, resi=str(int(resi)+/-x)`. Oznaka `x` odnosi se na vrijednost za koju se pomiče redosljed aminokiselina u + (udesno) smjeru ili – (ulijevo) smjeru.

```

C/5 11 16 21 26 31 36 41 46 /D/5 11 16 21 26 31 36 41 46
ECPLSHDGYCLHDGVCHYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWE ECPLSHDGYCLHDGVCHYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWE
C/89 96 101 106 111 116 121 126 131 /D/1 6 11 16 21 26 31 36 41 46
ECPLSHDGYCLHDGVCHYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWE ECPLSHDGYCLHDGVCHYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWE
/linker/D/D/51 56 61 66 71 76 81 86 91
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
/linker/D/D/48 51 56 61 66 71 76 81 86
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Slika 28. Uređivanje sekvence povezača 41 ALA

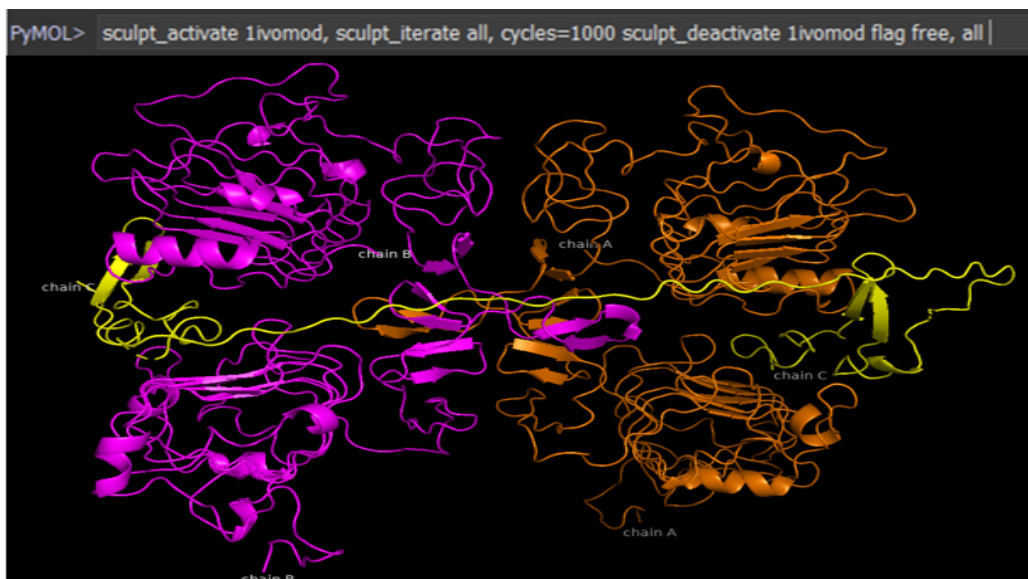
Označavanje lanaca i primjenom naredbe `alter (sele)`, segi `=C` ispravlja se oznaka segmenta. Dalje, primjenjuje se naredba `alter (sele)`, `chain=C` i iza toga naredba `sort` kako bi se povezali lanac C, D i povezač u jedan lanac. Potom se koristi funkcija `sculpting` kojom se dodatno uređuje struktura proteina, smanjuje vjerojatnost steričkih smetnji, a atomi i veze zauzimaju prirodni položaj.

```

C/C/1 6 11 16 21 26 31 36 41 46 51 56 61 66 71 76 81 86 91 96 101 106 111 116 121 126 131
ECPLSHDGYCLHDGVCHYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWEAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAECPLSHDGYCLHDGVCHYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWE

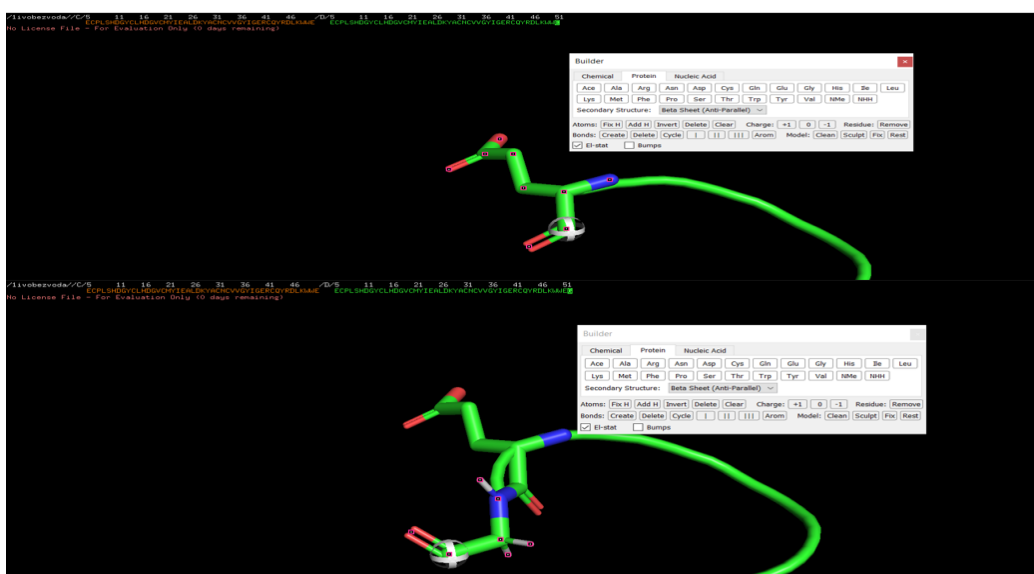
```

Slika 29. Uredeni lanac koji se sastoji od dva EGF povezana fleksibilnim povezačem 41 ALA

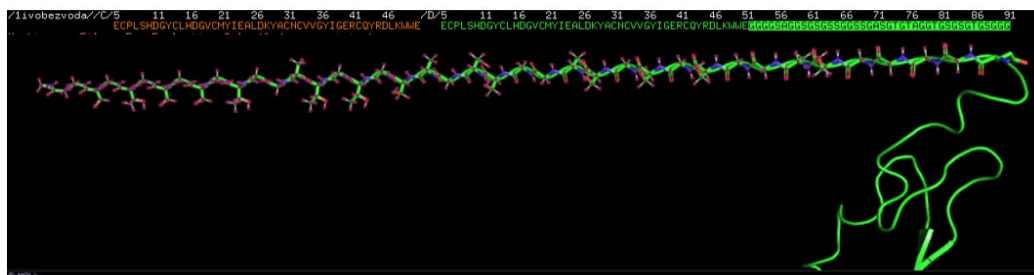


Slika 30. Model proteina nakon povezivanja lanaca i `sculpting-a`

Nakon ponovnog učitavanja IIVO modela i uklanjanja lanaca A i B, koristeći PyMOL alat *Builder*, izgrađen je povezičać na način da se peptidnim vezama spajaju aminokiseline povezičaća GG-GSAT*-GG počevši od prve aminokiseline (Gly, G) povezičaća koja gradi peptidnu vezu sa zadnjom aminokiselinom (Glu, E) lanca D i zadana je struktura antiparalelne β -ploče.

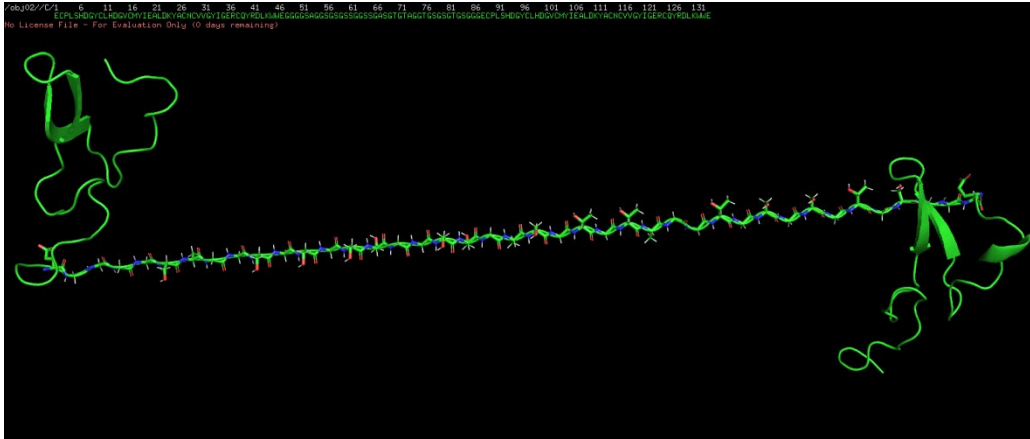


Slika 31. Modeliranje fleksibilnog GG-GSAT*-GG povezičaća pomoću *Builder-a*



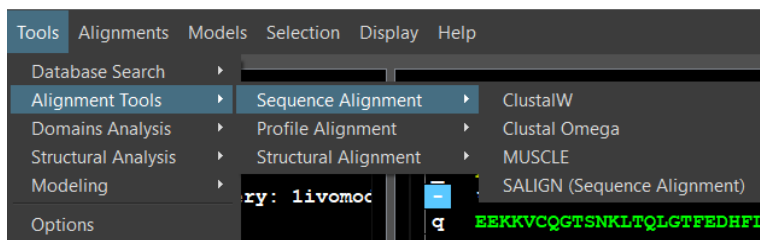
Slika 32. Struktura i aminokiselinski slijed GG-GSAT*-GG povezičaća

Primijenjen je isti princip kao kod prethodnog modela, *1mox_linkerDtoC*, što se tiče uređenja redoslijeda aminokiselina u lancu. Nakon označavanja C-atoma posljednje aminokiseline (Gly, G) povezičaća i N-atoma prve aminokiseline (Glu, E) lanca C, primijenjena je funkcija *fuse* kojom se postiglo spajanje lanca D i povezičaća s lancem C.

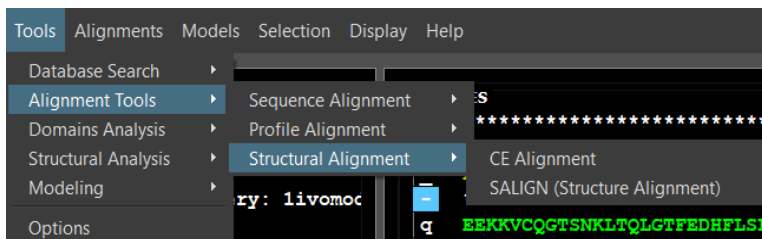


Slika 33. Struktura modela koji sadrži dva EGF spojena GG-GSAT*-GG povezičaćem

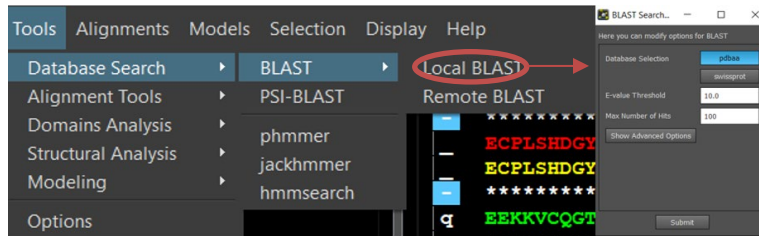
U sklopu PyMod 3 dostupan je alat MODELLER pomoću kojeg se modeliraju nove proteinske strukture (Slika 37.). Prije samog modeliranja, potrebno je napraviti *alignment* aminokiselinskog slijeda dvaju lanaca, s tim da jedan lanac služi kao predložak svojom aminokiselinskom sekvencom (Slika 34.) ili strukturom (Slika 35.). PyMod 3 također nudi opciju pronalaska srodne strukture pretraživanjem BLAST baza sekvenci proteina (točnije pdbaa) čime se lanac stavlja u *alignment* s već poznatom proteinskom sekvencom (Slika 36.).



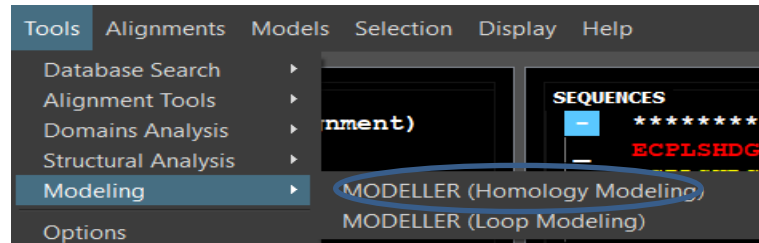
Slika 34. Alignment po sekvenci



Slika 35. Alignment po strukturi

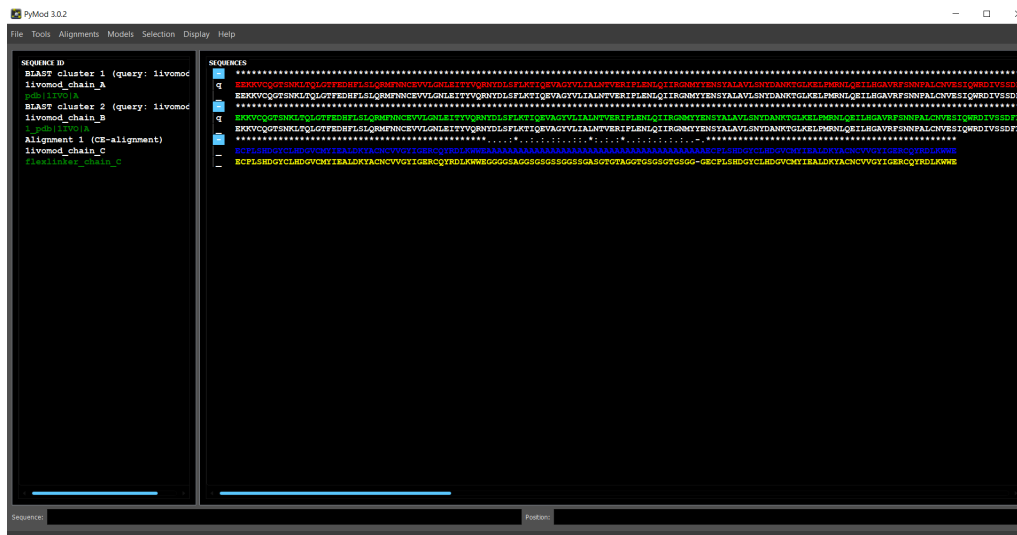


Slika 36. BLAST pretraživanje



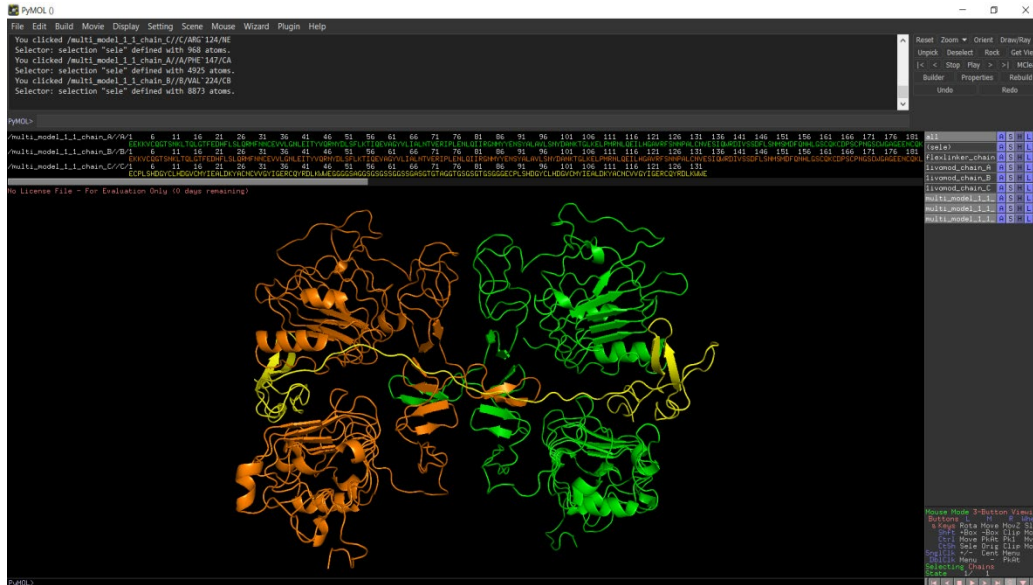
Slika 37. MODELLER alat

Učitani su modeli IIVO s 41 ALA povezičnikom i model s 2 EGF i GG-GSAT*-GG povezičnikom u PyMod 3. Sekvenca lanca A povezana je sa srodnom sekvencom odnosno strukturom i udružena u BLAST *cluster* (sekvenca iz BLAST baze odgovara lancu A IIVO modela). Isti je princip primijenjen kod lanca B. U PyMod 3 prozoru, struktura lanca C modela IIVO udružena je sa strukturom lanca C modela s GG-GSAT*-GG povezičnikom pomoću *CE-alignment* (program za *alignment* aminokiselinskog slijeda po njihovoj strukturi).

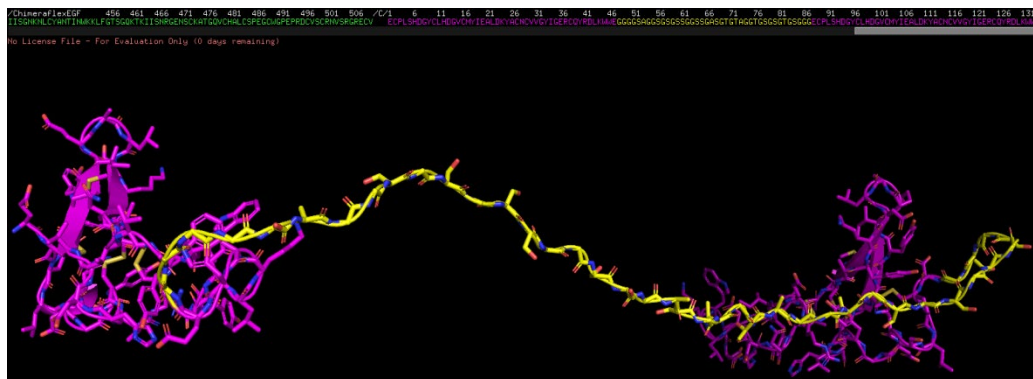


Slika 38. Prikaz pojedinačnih *alignment*-a u PyMod 3 prozoru

Na taj način je struktura IIVO s 41 ALA poveziivačem poslužila kao predložak i pomoću alata MODELLER dobivena je struktura prvog modela proteina s fleksibilnim poveziivačem koji je nazvan Kimera 1 (Slika 41.).

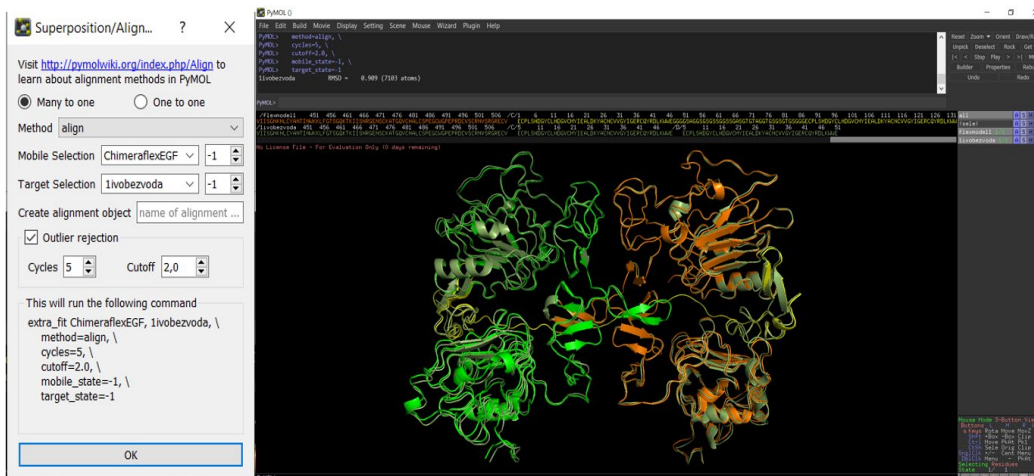


Slika 39. Struktura modela dimera EGFR u kojem su molekule EGF povezane GG-GSAT*-GG poveziivačem



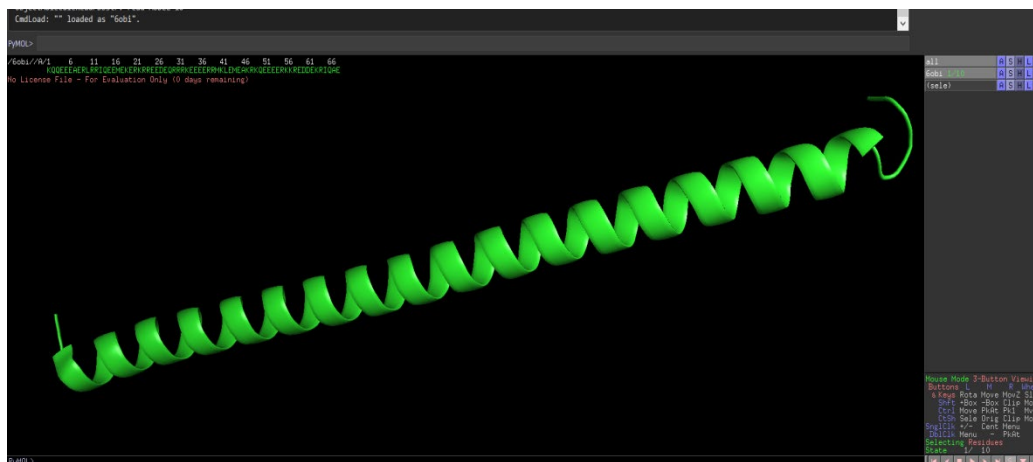
Slika 40. Struktura Kimere 1

Odabirom funkcije *align* koja je dostupna putem *Alignment* plugin-a može se ispitati kolika je kvaliteta modeliranog proteina s obzirom na RMSD vrijednost. Svrnjivanjem sekvence IIVO s dobivenim modelom dobivena je vrijednost RMSD= 0.960. Što je niža vrijednost RMSD, to se model smatra kvalitetnijim, odnosno dvije strukture proteina su strukturno sličnije što je niži RMSD.



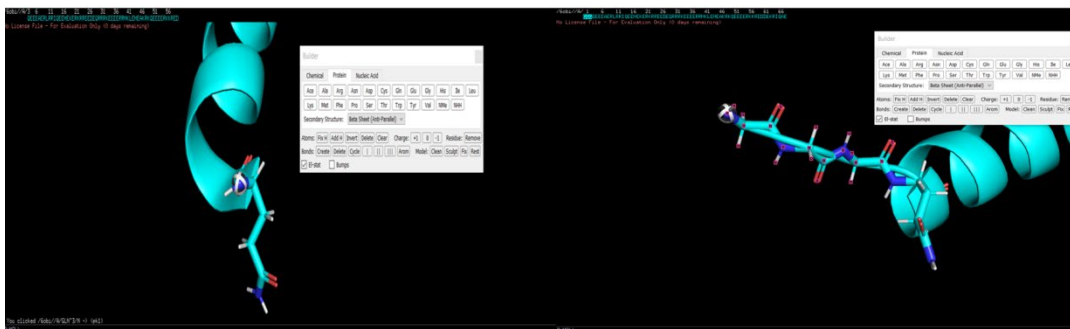
Slika 41. *Alignment* IIVO strukture i strukture Kimere 1

Drugi zadatak bio je izraditi model koji se sastoji od dva EGF liganda povezana krutim povezivačem. Kao predložak poslužio je model koji se odnosi na jednostruku α -zavojnica proteina miozina VI (pdb:6OBI). Sadrži 620 atoma i ukupna masa proteina iznosi 8.94 kDa. Osobita krutost 6OBI pripisuje se upravo njegovoj sekundarnoj strukturi α -zavojnice i zato je izabran kao osnova za kreiranje krutog povezivača kimerne molekule [98].

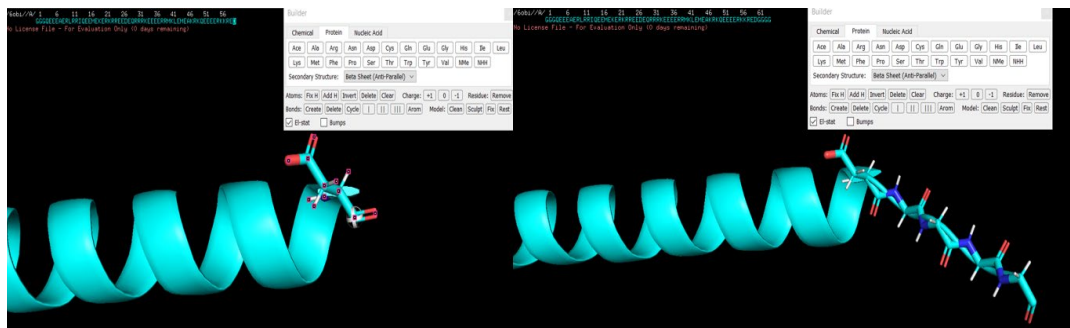


Slika 42. Struktura i aminokiselinski slijed 6OBI

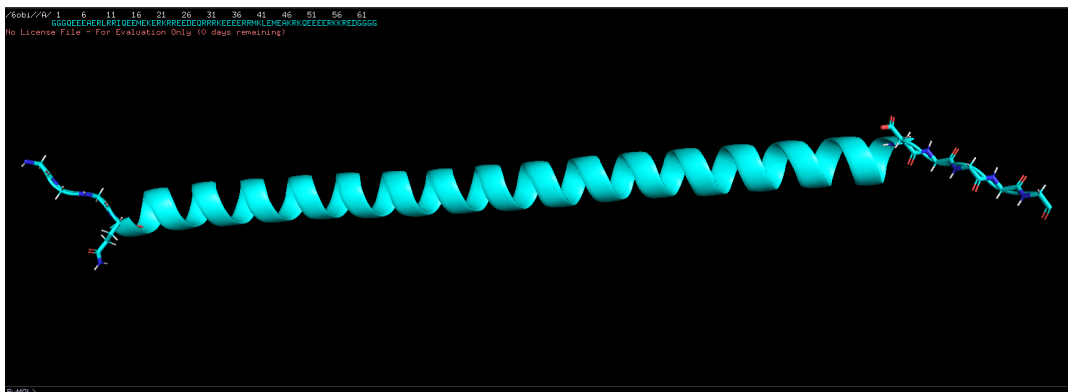
Nadalje, kruti povezič 6OBI spojen je s dva EGF (po modelu IIVO) pomoću uređivanja redoslijeda aminokiselina i preimenovanja lanaca. Što se tiče sekvence povezičaća, alat *Builder* korišten je za sastavljanje krutog GGG-MYO6*-GGG povezičaća (Slika 44., 45., 46.). Tri glicina su dodana na N-terminalni kraj 6OBI s tim da su prethodno uklonjenje prve dvije aminokiseline (lizin i glutamin). Na C-terminalni kraj 6OBI dodana su, također, 4 glicina s tim da je prethodno uklonjen slijed aminokiselina DEKRIQAE da bi se dobila optimalna udaljenost molekula faktora rasta. Također, glicini su dodani na N- i C- terminalnom kraju aminokiselinskog slijeda povezičaća kako bi se povećala fleksibilnost što je bitno za biološku aktivnost kimerne molekule.



Slika 43. Modeliranje N-kraja proteina



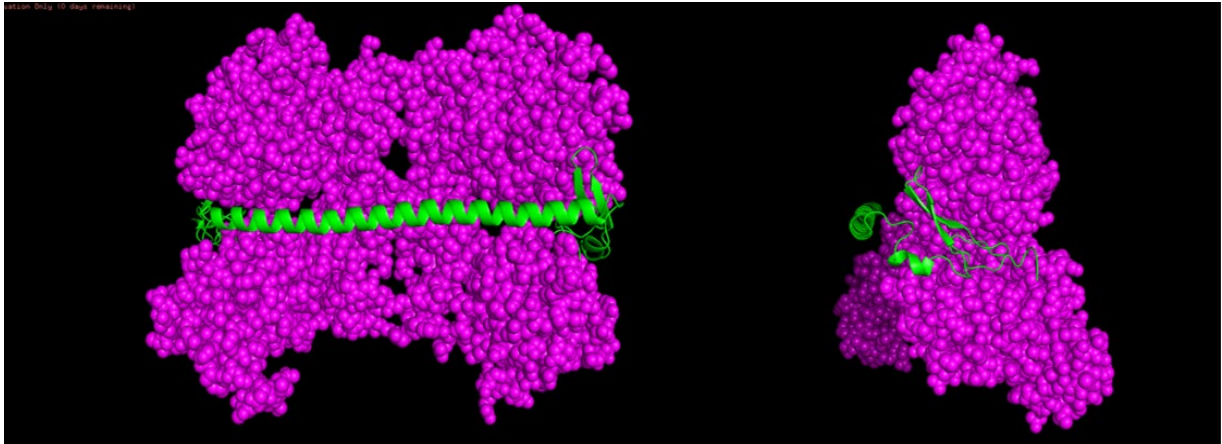
Slika 44. Modeliranje C-kraja proteina



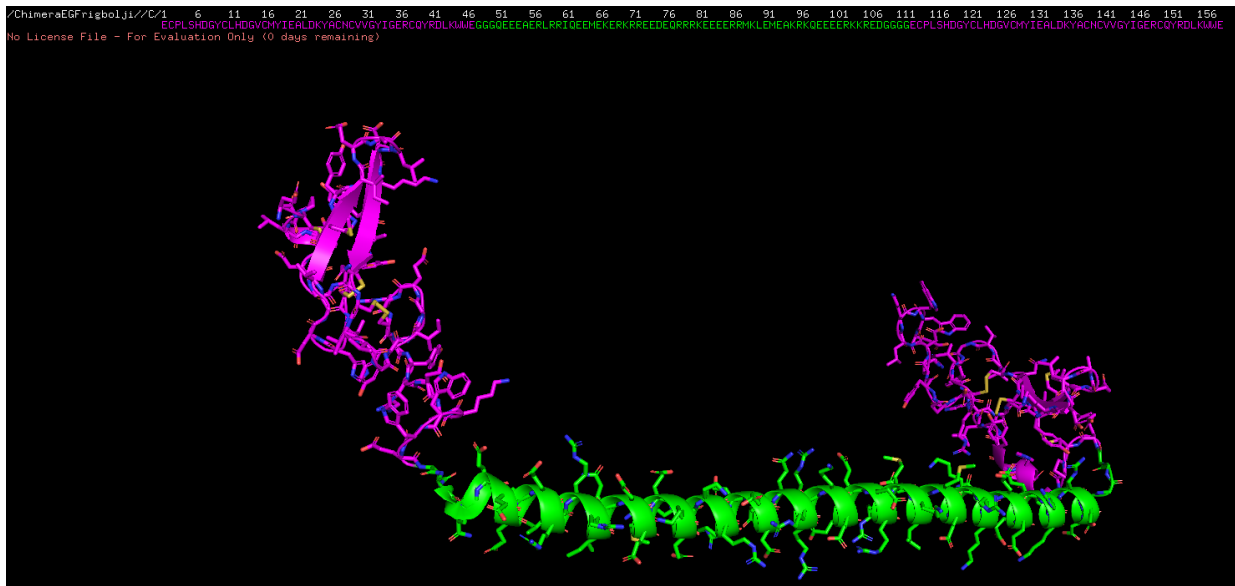
Slika 45. Struktura GGG-MYO6*-GGG poveziavača

Strukture i sekvence modela učitane su u PyMod 3 i združene u odgovarajući *cluster*. U konačnici, dobiven je model proteina s krutim poveziavačem (GGG-MYO6*-GGG) koji je nazvan Kimera 2 (Slika 50.).

Slika 46. PyMod 3 *align-i*

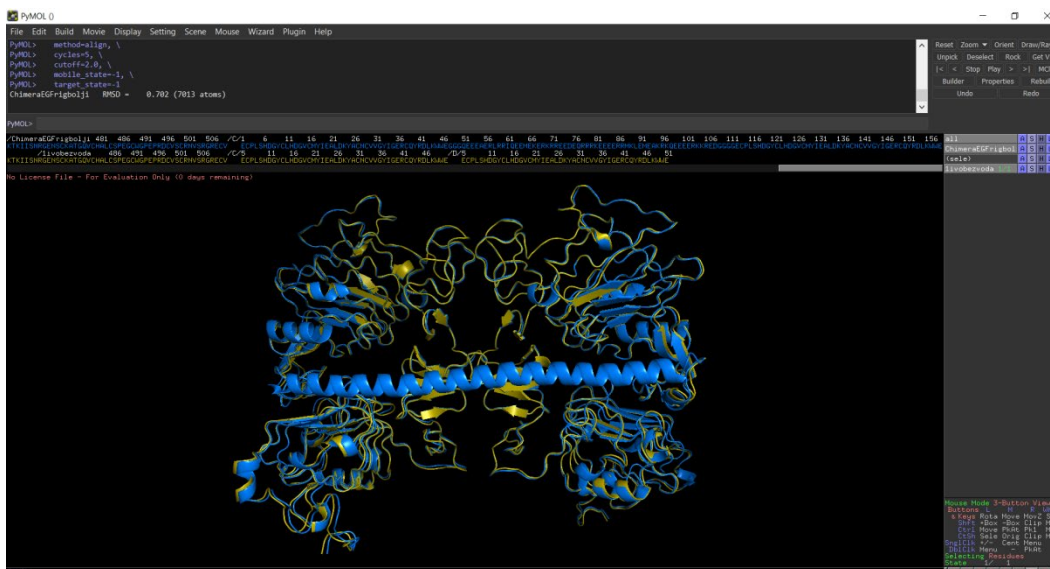


Slika 47. Struktura modela dimera EGFR u kojem su molekule EGF povezane GGG-MYO6*-GGG povezičaćem



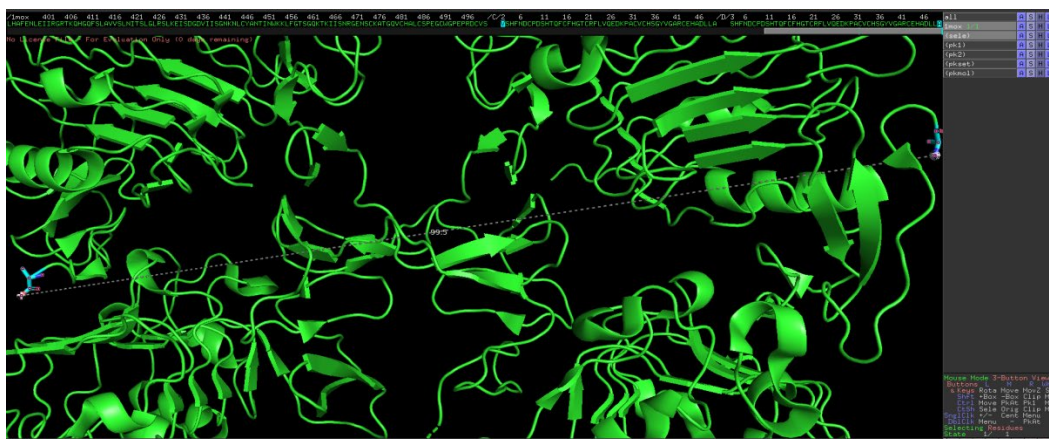
Slika 48. Struktura Kimere 2

Sravnjivanje sekvence IIVO s novim modelom dobivena je vrijednost RMSD= 0.702 (Slika 42.).

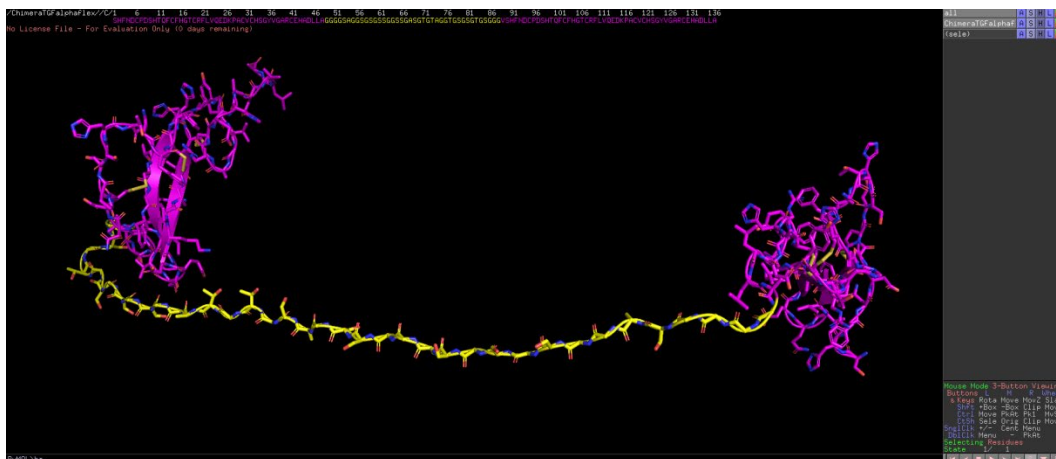


Slika 49. Alignment IIVO strukture i strukture Kimere 2

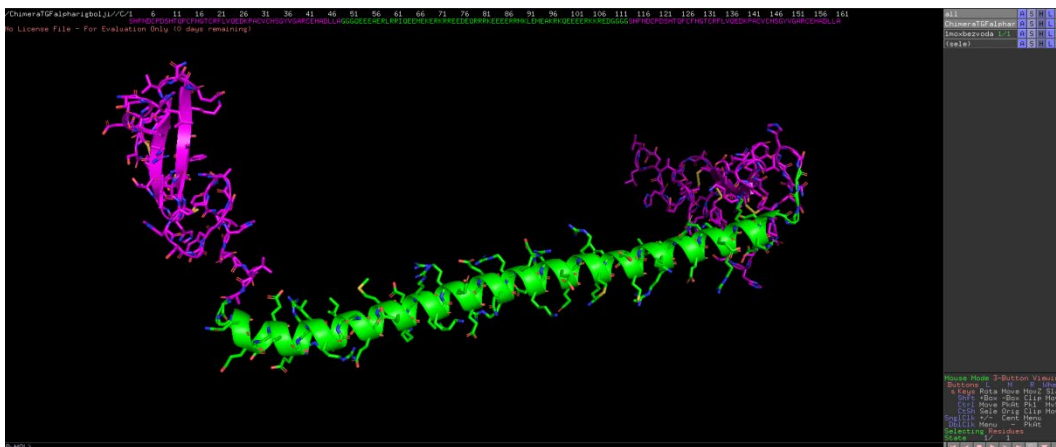
Nadalje, izrađeni su modeli koji sadrže dvije molekule TGF- α povezana fleksibilnim/krutim povezačom koji su nazvani Kimera 3 i Kimera 4 (Slika 53. i 54.). Kao predložak poslužio je model koji se sastoji od vanstaničnih domena EGFR koje su vezale TGF- α ligande (pdb:1MOX) [99]. Udaljenost između dva TGF- α iznosi 99.5 Å, što je manje u odnosu na udaljenost između dva EGF vezana za EGFR (Slika 52.).



Slika 50. Izračun udaljenosti između dva vezana TGF- α koja iznosi 99.5 Å

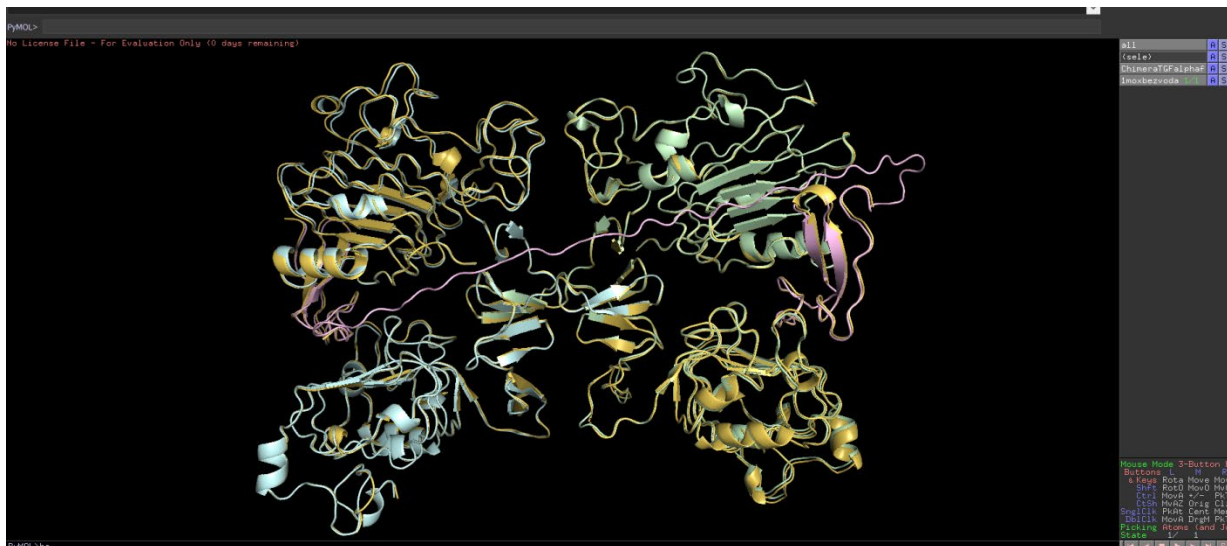


Slika 51. Struktura Kimere 3

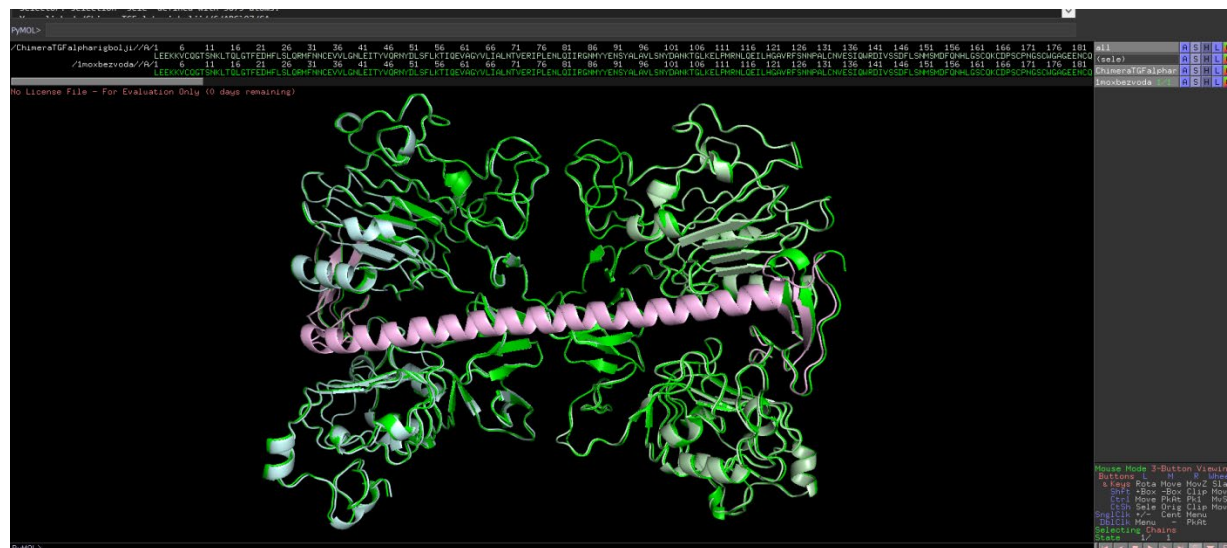


Slika 52. Struktura Kimere 4

Usporedbom 1MOX s novim modelima dobivena je vrijednost RMSD= 0.602 kod modela s fleksibilnim poveziivačem (Kimera 3) i RMSD= 0.504 kod modela s krutim poveziivačem (Kimera 4) (Slika 55. i 56.).



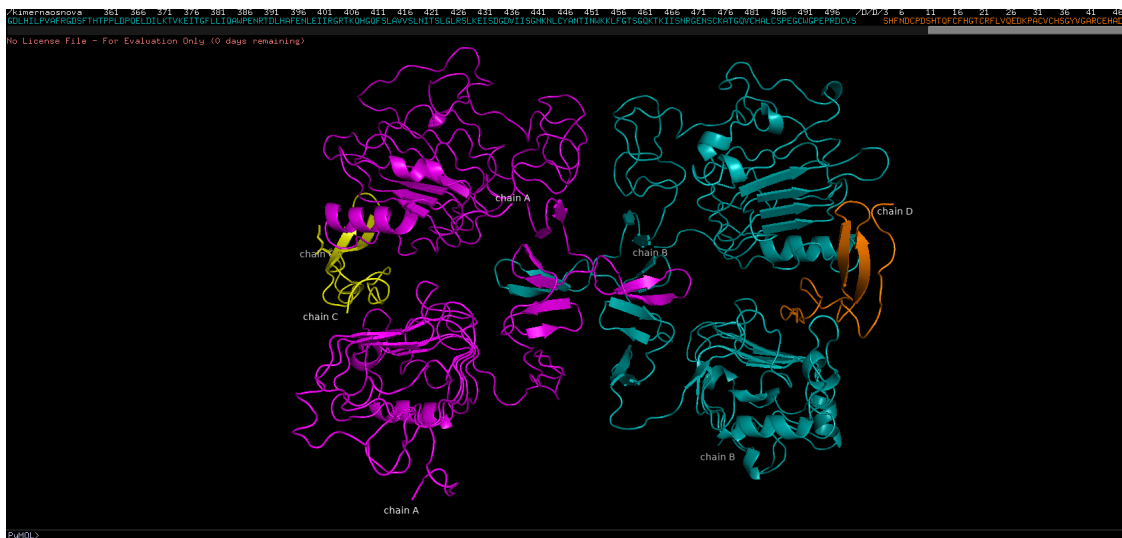
Slika 53. Alignment 1MOX i strukture Kimere 3



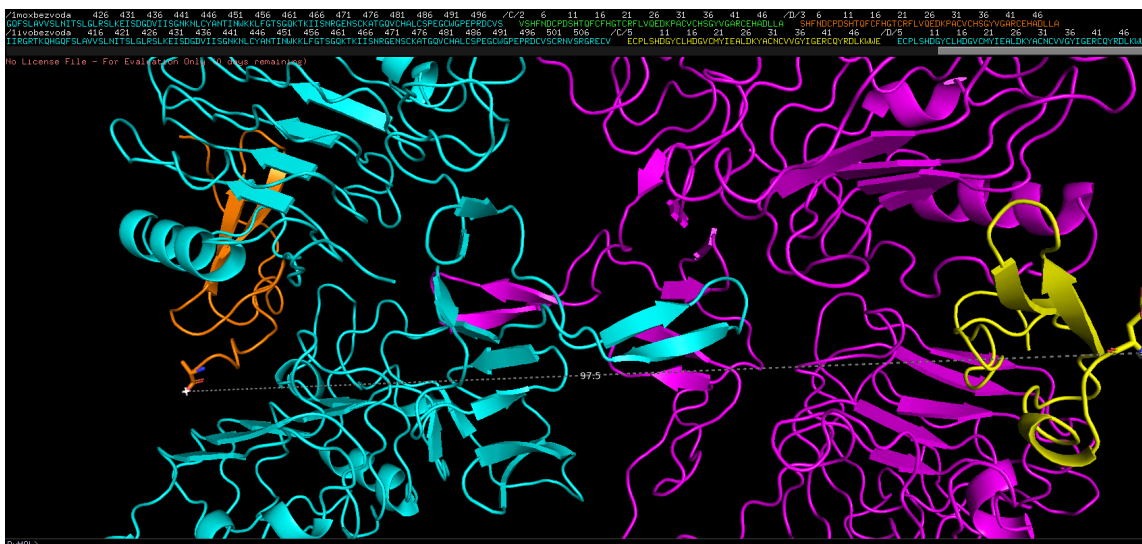
Slika 54. Alignment 1MOX i strukture Kimere 4

U konačnici, napravljena je predikcija modela kimerne molekule koja bi se sastojala od jednog TGF- α i jednog EGF liganda spojenih fleksibilnim GG-GSAT*-GG poveziivačem. Također je napravljena predikcija iste kimerne molekule u kojoj su ligandi povezani krutim GGG-MYO6*-GGG poveziivačem. Izdvojeni su lanci B i D 1MOX modela i lanci A i C 1IVO modela.

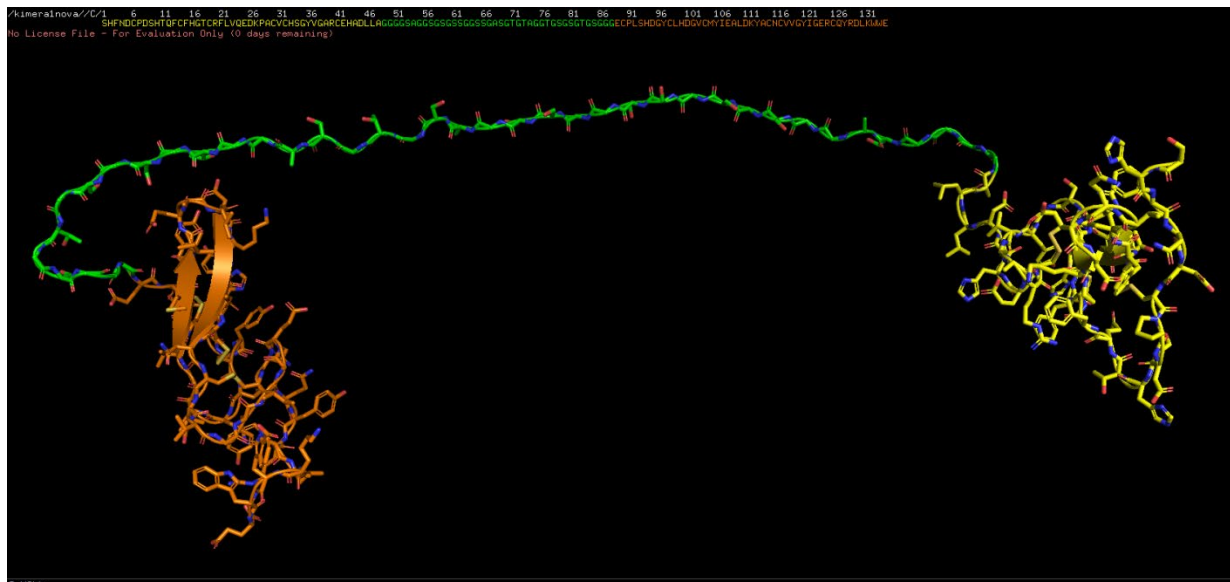
Pretpostavljen je položaj vanstaničnih domena (lanaca A i B) koji su vezali različite ligande (lanac C i D) (Slika 57.). Udaljenost između TGF- α i EGF iznosi 97.5 Å (Slika 58.). Pomoću MODELLER dobiveni su modeli Kimera 5 i Kimera 6 (Slika 62. i 66.).



Slika 55. Prikaz lanca A (vanstanična domena EGFR koja je vezala EGF), lanca B (vanstanična domena EGFR koja je vezala TGF- α), lanca C (molekula EGF), lanca D (molekula TGF- α)

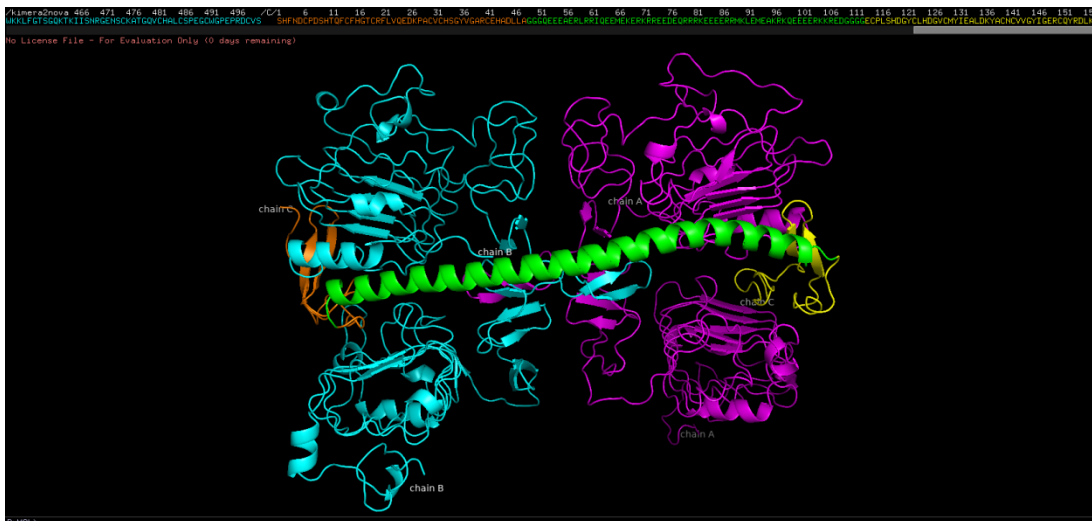


Slika 56. Izračun udaljenosti između TGF- α i EGF vezanih za receptor

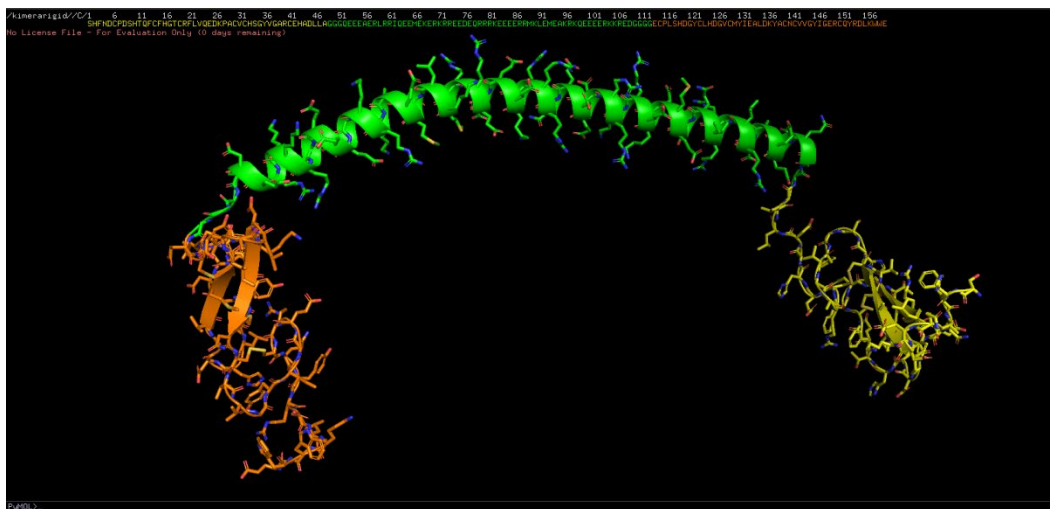


Slika 59. Struktura Kimere 5

Slika 60. Postavljanje aminokiselnog slijeda i strukture u alignment



Slika 61. Struktura modela kimerne molekule 6 i vanstanične domene EGFR



Slika 62. Struktura Kimere 6

Aminokiselinske sekvence svih modela kimernih molekula analizirane su pomoću alata ProtParam i rezultati analize prikazani su pomoću tablice (Tablica 1.). Također, neki su parametri provjereni pomoću PyMOL programa. Analizirani su: molekularna masa proteina, teorijski pI, hidrofobnost, indeks nestabilnosti i alifatski indeks kimernih molekula.

Molekularna masa proteina ovisi o sadržaju različitih aminokiselina koje se po veličini mogu svrstati u male, srednje i velike (Slika 58.) [100].

G	A	S	C	D	P	N	T	E	V	Q	H	M	I	L	K	R	F	Y	W
60.1	88.6	89.0	108.5	111.1	112.7	114.1	116.1	138.4	140.0	143.8	153.2	162.9	166.7	166.7	168.6	173.4	189.9	193.6	227.8
MALE								SREDNJE				VELIKE							

Slika 63. Aminokiseline poredane po veličini [100]

Zbroj pojedinačnih naboja aminokiselina jednak je ukupnom naboju proteina. Vrijednost pI (izoelektrična točka) proteina odgovara pH vrijednosti pri kojoj je ukupan naboj proteina jednak nuli. Vrijednost pI može poslužiti za određivanje metode izolacije, pročišćavanja i kristalizacije proteina. Citoplazmatski proteini imaju vrijednost pI između 5 i 6, dok proteini stanične membrane imaju vrijednost pI između 8.5 i 9 [101].

Grand average of hydropathicity index (GRAVY) služi za određivanje hidrofobnosti proteina. Radi se o zbroju hidrofobnih vrijednosti (po Kyte i Doolittle) aminokiselina koji se dijeli s duljinom aminokiselinskog slijeda proteina (Slika 59.) [102]. Pozitivne vrijednosti upućuju na više hidrofobnih/nepolarnih bočnih ogranaka, a negativne na više polarnih/ionskih bočnih ogranaka [103].

I	V	L	F	C	M	A	W	G	T	S	Y	P	H	N	D	Q	E	K	R
4.5	4.2	3.8	2.8	2.5	1.9	1.8	-0.9	-0.4	-0.7	-0.8	-1.3	-1.6	-3.2	-3.5	-3.5	-3.5	-3.5	-3.9	-4.5
HIDROFOBNE								NEUTRALNE						HIDROFILNE					

Slika 64. Aminokiseline poredane po hidrofobnim vrijednostima prema Kyte-Doolittle skali [100]

Triptofan (W) ima vrijednost -0.9, ali bez obzira na to svrstava se u hidrofobne aminokiseline zato što je najčešće sastavni dio hidrofobne jezgre proteina [100].

Alifatski indeks ukazuje na termostabilnost proteina. Računa se kao relativni volumen zaokupljen alifatskim bočnim lancima (A, V, I i L). Veći indeks ukazuje na bolju termostabilnost proteina [103].

Indeks nestabilnosti (II) proteina je procjena stabilnosti proteina u eksperimentalnim uvjetima. Pokazalo se da proteini koji imaju *in vivo* poluživot dulji od 16 sati imaju indeks nestabilnosti < 40 i takvi proteini smatraju se stabilnima. Za proteine koji imaju *in vivo* poluživot kraći od 5 sati pokazalo se da imaju indeks nestabilnosti > 40 i takvi proteini smatraju se nestabilnima [104, 105].

Prema podacima dobivenim pomoću PyMOL programa i ProtParam alata, može se zaključiti da model Kimera 1 ima najbolju termostabilnost, Kimera 3 ima najviši pI, a Kimera 2 se pokazao kao najhidrofilniji od svih modela. Također, rezultati ukazuju na to da modeli kimernih molekula s fleksibilnim poveziivačem imaju bolju termostabilnost (veći alifatski indeks), imaju veću predviđenu stabilnost (manji indeks nestabilnosti) i hidrofobniji su (niži GRAVY score) u odnosu na modele s krutim poveziivačem.

Tablica 1. Rezultati analize pomoću ProtParam alata (*) i PyMol programa ()**

	Broj aminokiselina	Molekularna masa (Da)	Električni naboj	Teorijski pI	Hidrofobnost	Indeks nestabilnosti	Alifatski indeks
Kimera 1	134	13911.28* 13890.0051**	Ukupni broj negativno nabijenih aminokiselina: 16* Ukupni broj pozitivno nabijenih aminokiselina: 8* Suma naboja: -9**	4.73*	GRAVY: -0.309*	38.10*	53.13*
Kimera 2	159	19150.46* 19127.1138**	Ukup. broj neg. nabijenih aa: 40* Ukup. broj poz. nabijenih aa: 30* Suma naboja: -9**	5.09*	GRAVY: -1.258*	87.31*	51.51*
Kimera 3	137	13619.70* 13600.4370**	Ukup. broj neg. nabijenih aa: 12* Ukup. broj poz. nabijenih aa: 6* Suma naboja: -7**	5.84*	GRAVY: -0.261*	22.05*	39.93*
Kimera 4	161	18759.74* 18738.4146**	Ukup. broj neg. nabijenih aa: 36* Ukup. broj poz. nabijenih aa: 28* Suma naboja: -9**	5.71*	GRAVY: -1.234*	73.21*	38.82*
Kimera 5	135	13715.92* 13695.6555**	Ukup. broj neg. nabijenih aa: 14* Ukup. broj poz. nabijenih aa: 7* Suma naboja: -8**	5.29*	GRAVY: -0.301*	29.78*	45.56*
Kimera 6	160	18955.10* 18932.7642**	Ukup. broj neg. nabijenih aa: 38* Ukup. broj poz. nabijenih aa: 29* Suma naboja: -10**	5.38*	GRAVY: -1.246*	79.98*	45.12*

5. RASPRAVA

Tumorske stanice imaju sposobnost heterogenog izražaja faktora rasta koja posljedično djeluje na stanice tumorskog mikrokruženja. Izražaj više različitih molekula faktora rasta potiče rast i razvoj tumora. Shodno tome, izrađeni su modeli kimernih molekula koje se sastoje od istovrsnih i/ili različitih faktora rasta povezani proteinskim povezičaćem. Radi se o računalnom modeliranju struktura kimernih molekula koje bi posjedovale biološku aktivnost u stanici. Sukladno tome, kimerne molekule bi u konačnici trebale aktivirati EGF receptore i signalne puteve u stanici.

Rezultati analize pomoću ProtParam alata kimernih molekula ukazuju na to da su kimerne molekule s fleksibilnim povezičaćem hidrofobnije u odnosu na kimerne molekule s krutim povezičaćem. Stoga je vjerojatnije da će modeli s fleksibilnim povezičaćem GG-GSAT*-GG lakše prolaziti staničnu membranu. Rezultati aktivacije receptora ovim kimernim molekulama dat će uvid u djelovanje heterogenog izražaja faktora rasta na razvoj tumora. Modeli s krutim povezičaćem hidrofilniji su i vjerojatnije je da će se vezani za vanstanične domene EGFR zadržati na staničnoj površini. Osim toga, moguće je da će krutost strukture povezičaća GGG-MYO6*-GGG negativno utjecati na aktivaciju receptora te bi takve kimerne molekule mogle djelovati inhibitorno na EGFR. ProtParam alat analizira samo aminokiselinski slijed, odnosno primarnu strukturu samih proteina, stoga je potrebno ispitati kemijsko-fizikalne parametre kimernih molekula *in vitro*.

Duljina povezičaća je također ključna za biološku aktivnost kimernih molekula; osigurava fizičku udaljenost faktora rasta vezanih za monomere u molekuli dimera EGFR.

Poznato je da vezanje faktora rasta izaziva konformacijsku promjenu receptora koja rezultira dimerizacijom. Dimerizacija se ostvaruje preko više kontakata na razini receptora; vanstaničnih domena (domena II), juktamembranskih domena i tirozin kinaznih domena [16]. Pretpostavka je da će kimerne molekule, u kojima su istovrsne molekule faktora rasta povezane povezičaćem, izazvati identičnu konformaciju dimera receptora kao i slobodne molekule faktora rasta.

Ako se uzme u obzir da TGF- α i EGF izazivaju različite konformacije receptora, može se pretpostaviti da će vezanje kimerne molekule TGF- α -povezivač-EGF imati za posljedicu nastanak jedinstvenih interakcija između domena receptora.

S obzirom na to da su rezultati računalnog modeliranja samo prediktivni, potrebno je ispitati djelovanje kimernih molekula na receptore te strukture kompleksa EGFR dimera i kimernih molekula primjenom tehnike Cryo-EM (*Cryogenic electron microscopy*).

Kako bi se izbjegla aktivacija monomera receptora od dva različita dimera, potrebno je uzeti stanice s niskim izražajem endogenog EGFR i stimulirati ih kimernim molekulama faktora rasta.

Rezultati ovog rada mogli bi potaknuti razvoj novih alosteričkih inhibitora i kimernih molekula faktora rasta s inhibicijskim djelovanjem na receptore.

6. ZAKLJUČAK

Rezistencija na tirozin kinazne inhibitore i druge antitumorske lijekove posljedica su razvoja intrinzične i/ili stečene, *de novo*, rezistencije. Heterogeni izražaj molekula faktora rasta u tumorskim tkivima jedan je od čestih uzroka *de novo* rezistencije. Liječenje tumora ovisnih o signalima EGF receptora primarno je usmjereno na inhibiciju aktivacije receptora vezanih za istovrsne molekule faktora rasta. Shodno tome, izostavljeno je u cijelosti djelovanje heterogenog izražaja molekula faktora rasta u tumorskom tkivu. U cilju istraživanja učinka djelovanja izražaja različitih faktora rasta na razvoj i rezistenciju tumora, izrađene su, uz pomoć računalnog modeliranja, proteinske strukture kimernih molekula faktora rasta EGF receptora. Iz rezultata analize sekvence kimernih molekula proizlazi da termostabilnost (alifatski indeks), indeks nestabilnosti i hidrofobnost ovise o vrsti povezača. Rezultati analiza i sekvence kimernih molekula u ovom radu koristit će se za sintezu proteina *in vitro* kako bi se utvrdio njihov biološki učinak na aktivaciju receptora te signalnih puteva za proliferaciju i preživljenje u tumorskim stanicama.

Ideja vodilja ovog istraživanja, koja je pokrenula modeliranje struktura kimernih molekula s fleksibilnim povezačem, mogla bi rezultirati boljim razumijevanjem djelovanja heterogenog izražaja molekula faktora rasta na rezistenciju tumora, te razvojem novih inhibitora EGF receptora, uključujući alosteričke inhibitore.

Iako se ne može s preciznošću predvidjeti kakva će biti učinkovitost na aktivaciju EGF receptora, kimerne molekule s krutim povezačem racionalno bi mogle spriječiti alosteričku rotaciju receptora, te samim time i njihovu aktivaciju. Shodno tome, predstavljale bi jedinstvenu strategiju inhibicijskog djelovanja na receptorske tirozin kinaze.

U konačnici, ovo bi bili ključni alati za istraživanja u kojima bi se utvrdio mehanizam djelovanja mikrookoliša na rast, razvoj i rezistenciju samoga tumora, te inhibirala tumorigeneza.

7. LITERATURA

- [1] D. S. Metibemu, O. A. Akinloye, A. J. Akamo, D. A. Ojo, O. T. Okeowo, and I. O. Omotuyi, ‘Exploring receptor tyrosine kinases-inhibitors in Cancer treatments’, *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, vol. 20, no. 1, p. 35, Dec. 2019, doi: 10.1186/s43042-019-0035-0.
- [2] T. Yamaoka, S. Kusumoto, K. Ando, M. Ohba, and T. Ohmori, ‘Receptor Tyrosine Kinase-Targeted Cancer Therapy’, *Int J Mol Sci*, vol. 19, no. 11, p. 3491, Nov. 2018, doi: 10.3390/ijms19113491.
- [3] Z. Du and C. M. Lovly, ‘Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer’, *Mol Cancer*, vol. 17, no. 1, p. 58, Dec. 2018, doi: 10.1186/s12943-018-0782-4.
- [4] D. M. Freed *et al.*, ‘EGFR Ligands Differentially Stabilize Receptor Dimers to Specify Signaling Kinetics’, *Cell*, vol. 171, no. 3, pp. 683-695.e18, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.09.017.
- [5] X. Zhang, J. Gureasko, K. Shen, P. A. Cole, and J. Kuriyan, ‘An Allosteric Mechanism for Activation of the Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor’, *Cell*, vol. 125, no. 6, pp. 1137–1149, Jun. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.05.013.
- [6] A. Rutkowska, E. Stoczyńska-Fidelus, K. Janik, A. Włodarczyk, and P. Rieske, ‘EGFR^{viii}: An Oncogene with Ambiguous Role’, *J Oncol*, vol. 2019, pp. 1–20, Dec. 2019, doi: 10.1155/2019/1092587.
- [7] D. M. Jackman *et al.*, ‘Exon 19 Deletion Mutations of Epidermal Growth Factor Receptor Are Associated with Prolonged Survival in Non–Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Gefitinib or Erlotinib’, *Clinical Cancer Research*, vol. 12, no. 13, pp. 3908–3914, Jul. 2006, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0462.
- [8] A. Appert-Collin, P. Hubert, G. Crémel, and A. Bennisroune, ‘Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion’, *Front Pharmacol*, vol. 6, Nov. 2015, doi: 10.3389/fphar.2015.00283.
- [9] A. Ooi *et al.*, ‘Protein overexpression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: an immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study’, *Modern Pathology*, vol. 17, no. 8, pp. 895–904, Aug. 2004, doi: 10.1038/modpathol.3800137.
- [10] M. H. Kraus, W. Issing, T. Miki, N. C. Popescu, and S. A. Aaronson, ‘Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor

- family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 86, no. 23, pp. 9193–9197, Dec. 1989, doi: 10.1073/pnas.86.23.9193.
- [11] Y. Feng *et al.*, ‘Association between ErbB4 single nucleotide polymorphisms and susceptibility to schizophrenia’, *Medicine*, vol. 96, no. 8, p. e5920, Feb. 2017, doi: 10.1097/MD.0000000000005920.
- [12] M. J. Wieduwilt and M. M. Moasser, ‘The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics’, *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 65, no. 10, pp. 1566–1584, May 2008, doi: 10.1007/s00018-008-7440-8.
- [13] P. Wee and Z. Wang, ‘Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways’, *Cancers (Basel)*, vol. 9, no. 5, p. 52, May 2017, doi: 10.3390/cancers9050052.
- [14] E. Purba, E. Saita, and I. Maruyama, ‘Activation of the EGF Receptor by Ligand Binding and Oncogenic Mutations: The “Rotation Model”’, *Cells*, vol. 6, no. 2, p. 13, Jun. 2017, doi: 10.3390/cells6020013.
- [15] M. A. Lemmon, ‘Ligand-induced ErbB receptor dimerization’, *Exp Cell Res*, vol. 315, no. 4, pp. 638–648, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.yexcr.2008.10.024.
- [16] M. D. Fulton *et al.*, ‘Conformationally constrained peptides target the allosteric kinase dimer interface and inhibit EGFR activation’, *Bioorg Med Chem*, vol. 26, no. 6, pp. 1167–1173, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.bmc.2017.08.051.
- [17] P. O. Byrne, K. Hristova, and D. J. Leahy, ‘EGFR forms ligand-independent oligomers that are distinct from the active state’, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 295, no. 38, pp. 13353–13362, Sep. 2020, doi: 10.1074/jbc.RA120.012852.
- [18] H. Ogiso *et al.*, ‘Crystal Structure of the Complex of Human Epidermal Growth Factor and Receptor Extracellular Domains’, *Cell*, vol. 110, no. 6, pp. 775–787, Sep. 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00963-7.
- [19] A. W. Burgess *et al.*, ‘An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors.’, *Mol Cell*, vol. 12, no. 3, pp. 541–52, Sep. 2003, doi: 10.1016/s1097-2765(03)00350-2.
- [20] J. D. Mohr, A. Wagenknecht-Wiesner, D. A. Holowka, and B. A. Baird, ‘Basic Amino Acids Within the Juxtamembrane Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Regulate Receptor Dimerization and Auto-phosphorylation’, *Protein J*, vol. 39, no. 5, pp. 476–486, Oct. 2020, doi: 10.1007/s10930-020-09943-8.

- [21] T. P. J. Garrett *et al.*, ‘Crystal Structure of a Truncated Epidermal Growth Factor Receptor Extracellular Domain Bound to Transforming Growth Factor α ’, *Cell*, vol. 110, no. 6, pp. 763–773, Sep. 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00940-6.
- [22] M. A. Lemmon, ‘Ligand-induced ErbB receptor dimerization’, *Exp Cell Res*, vol. 315, no. 4, pp. 638–648, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.yexcr.2008.10.024.
- [23] J. L. Macdonald-Obermann and L. J. Pike, ‘Different Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor Ligands Show Distinct Kinetics and Biased or Partial Agonism for Homodimer and Heterodimer Formation’, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 38, pp. 26178–26188, Sep. 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.586826.
- [24] S. L. Jeppe Knudsen, A. S. Wai Mac, L. Henriksen, B. van Deurs, and L. M. Grøvdal, ‘EGFR signaling patterns are regulated by its different ligands’, *Growth Factors*, vol. 32, no. 5, pp. 155–163, Oct. 2014, doi: 10.3109/08977194.2014.952410.
- [25] S. Higashiyama, H. Iwabuki, C. Morimoto, M. Hieda, H. Inoue, and N. Matsushita, ‘Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: Beyond receptor ligands’, *Cancer Sci*, vol. 99, no. 2, pp. 214–220, Feb. 2008, doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00676.x.
- [26] W.-L. Cheng *et al.*, ‘The Role of EREG/EGFR Pathway in Tumor Progression’, *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 23, p. 12828, Nov. 2021, doi: 10.3390/ijms222312828.
- [27] H.-S. Lu, J.-J. Chai, M. Li, B.-R. Huang, C.-H. He, and R.-C. Bi, ‘Crystal Structure of Human Epidermal Growth Factor and Its Dimerization’, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 37, pp. 34913–34917, Sep. 2001, doi: 10.1074/jbc.M102874200.
- [28] F. Zeng and R. C. Harris, ‘Epidermal growth factor, from gene organization to bedside’, *Semin Cell Dev Biol*, vol. 28, pp. 2–11, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.semcdb.2014.01.011.
- [29] ‘<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EGF>’.
- [30] ‘<https://www.omim.org/entry/190170>’.
- [31] R. J. Playford, C. E. Macdonald, and W. S. Johnson, ‘Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders’, *Am J Clin Nutr*, vol. 72, no. 1, pp. 5–14, Jul. 2000, doi: 10.1093/ajcn/72.1.5.
- [32] F. Vinante and A. Rigo, ‘Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor/Diphtheria Toxin Receptor in Normal and Neoplastic Hematopoiesis’, *Toxins (Basel)*, vol. 5, no. 6, pp. 1180–1201, Jun. 2013, doi: 10.3390/toxins5061180.
- [33] ‘<https://www.omim.org/entry/104640>’.

- [34] J.-F. Liu, Y.-T. Tsao, and C.-H. Hou, 'Amphiregulin enhances intercellular adhesion molecule-1 expression and promotes tumor metastasis in human osteosarcoma', *Oncotarget*, vol. 6, no. 38, pp. 40880–40895, Dec. 2015, doi: 10.18632/oncotarget.5679.
- [35] J. Zhao, C. Klausen, X. Qiu, J.-C. Cheng, H.-M. Chang, and P. C. K. Leung, 'Betacellulin induces Slug-mediated down-regulation of E-cadherin and cell migration in ovarian cancer cells', *Oncotarget*, vol. 7, no. 20, pp. 28881–28890, May 2016, doi: 10.18632/oncotarget.7591.
- [36] '<https://www.omim.org/entry/602061?search=epiregulin&highlight=epiregulin>'.
- [37] D. J. Riese and R. L. Cullum, 'Epiregulin: Roles in normal physiology and cancer', *Semin Cell Dev Biol*, vol. 28, pp. 49–56, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.semcdb.2014.03.005.
- [38] 'https://www.rndsystems.com/products/recombinant-human-epigen-protein_6629-ep'.
- [39] U. Sahin and C. P. Blobel, 'Ectodomain shedding of the EGF-receptor ligand epigen is mediated by ADAM17', *FEBS Lett*, vol. 581, no. 1, pp. 41–44, Jan. 2007, doi: 10.1016/j.febslet.2006.11.074.
- [40] '<https://www.omim.org/entry/618717>'.
- [41] '<https://www.omim.org/entry/603818#description>'.
- [42] '<https://www.omim.org/entry/142445#editHistory>'.
- [43] W.-T. Kao *et al.*, 'Common genetic variation in Neuregulin 3 (*NRG3*) influences risk for schizophrenia and impacts *NRG3* expression in human brain', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 35, pp. 15619–15624, Aug. 2010, doi: 10.1073/pnas.1005410107.
- [44] '<https://www.omim.org/entry/610894>'.
- [45] Y. Huang *et al.*, 'A molecular mechanism for the generation of ligand-dependent differential outputs by the epidermal growth factor receptor', *Elife*, vol. 10, Nov. 2021, doi: 10.7554/eLife.73218.
- [46] D. M. Freed *et al.*, 'EGFR Ligands Differentially Stabilize Receptor Dimers to Specify Signaling Kinetics', *Cell*, vol. 171, no. 3, pp. 683-695.e18, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.09.017.
- [47] A. Doerner, R. Scheck, and A. Schepartz, 'Growth Factor Identity Is Encoded by Discrete Coiled-Coil Rotamers in the EGFR Juxtamembrane Region', *Chem Biol*, vol. 22, no. 6, pp. 776–784, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.chembiol.2015.05.008.

- [48] J. K. L. Sinclair, A. S. Walker, A. E. Doerner, and A. Schepartz, 'Mechanism of Allosteric Coupling into and through the Plasma Membrane by EGFR', *Cell Chem Biol*, vol. 25, no. 7, pp. 857-870.e7, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.chembiol.2018.04.005.
- [49] A. Sorkin and L. K. Goh, 'Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs', *Exp Cell Res*, vol. 315, no. 4, pp. 683-696, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.yexcr.2008.07.029.
- [50] M. Mettlen, P.-H. Chen, S. Srinivasan, G. Danuser, and S. L. Schmid, 'Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis', *Annu Rev Biochem*, vol. 87, no. 1, pp. 871-896, Jun. 2018, doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-012644.
- [51] L. K. Goh and A. Sorkin, 'Endocytosis of Receptor Tyrosine Kinases', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 5, no. 5, pp. a017459-a017459, May 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a017459.
- [52] K. Roepstorff *et al.*, 'Differential Effects of EGFR Ligands on Endocytic Sorting of the Receptor', *Traffic*, vol. 10, no. 8, pp. 1115-1127, Aug. 2009, doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00943.x.
- [53] K. Gill, J. L. Macdonald-Obermann, and L. J. Pike, 'Epidermal growth factor receptors containing a single tyrosine in their C-terminal tail bind different effector molecules and are signaling-competent', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 292, no. 50, pp. 20744-20755, Dec. 2017, doi: 10.1074/jbc.M117.802553.
- [54] Y. Tian *et al.*, 'Different subtypes of EGFR exon19 mutation can affect prognosis of patients with nonsmall cell lung adenocarcinoma', *PLoS One*, vol. 13, no. 11, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0201682.
- [55] Y.-R. Chen *et al.*, 'Distinctive activation patterns in constitutively active and gefitinib-sensitive EGFR mutants', *Oncogene*, vol. 25, no. 8, pp. 1205-1215, Feb. 2006, doi: 10.1038/sj.onc.1209159.
- [56] P. T. Harrison, S. Vyse, and P. H. Huang, 'Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer', *Semin Cancer Biol*, vol. 61, pp. 167-179, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.09.015.
- [57] J. Cho, 'Mechanistic insights into differential requirement of receptor dimerization for oncogenic activation of mutant EGFR and its clinical perspective', *BMB Rep*, vol. 53, no. 3, pp. 133-141, Mar. 2020, doi: 10.5483/BMBRep.2020.53.3.025.
- [58] P. Baxevanos and G. Mountzios, 'Novel chemotherapy regimens for advanced lung cancer: have we reached a plateau?', *Ann Transl Med*, vol. 6, no. 8, pp. 139-139, Apr. 2018, doi: 10.21037/atm.2018.04.04.

- [59] H. Hayashi *et al.*, ‘Overall Treatment Strategy for Patients With Metastatic NSCLC With Activating EGFR Mutations’, *Clin Lung Cancer*, vol. 23, no. 1, pp. e69–e82, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.clcc.2021.10.009.
- [60] K. Shi *et al.*, ‘Emerging strategies to overcome resistance to third-generation EGFR inhibitors’, *J Hematol Oncol*, vol. 15, no. 1, p. 94, Dec. 2022, doi: 10.1186/s13045-022-01311-6.
- [61] J. He, Z. Huang, L. Han, Y. Gong, and C. Xie, ‘Mechanisms and management of 3rd-generation EGFR-TKI resistance in advanced non-small cell lung cancer (Review)’, *Int J Oncol*, vol. 59, no. 5, p. 90, Sep. 2021, doi: 10.3892/ijo.2021.5270.
- [62] D. Westover, J. Zugazagoitia, B. C. Cho, C. M. Lovly, and L. Paz-Ares, ‘Mechanisms of acquired resistance to first- and second-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors’, *Annals of Oncology*, vol. 29, pp. i10–i19, Jan. 2018, doi: 10.1093/annonc/mdx703.
- [63] A. P. S. Silva, P. v. Coelho, M. Anazetti, and P. U. Simioni, ‘Targeted therapies for the treatment of non-small-cell lung cancer: Monoclonal antibodies and biological inhibitors’, *Hum Vaccin Immunother*, vol. 13, no. 4, pp. 843–853, Apr. 2017, doi: 10.1080/21645515.2016.1249551.
- [64] F. Tavakoli and M. R. Ganjalikhany, ‘Structure-based inhibitory peptide design targeting peptide-substrate binding site in EGFR tyrosine kinase’, *PLoS One*, vol. 14, no. 5, p. e0217031, May 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0217031.
- [65] T. S. Beyett *et al.*, ‘Molecular basis for cooperative binding and synergy of ATP-site and allosteric EGFR inhibitors’, *Nat Commun*, vol. 13, no. 1, p. 2530, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-30258-y.
- [66] S. Maity, K. S. R. Pai, and Y. Nayak, ‘Advances in targeting EGFR allosteric site as anti-NSCLC therapy to overcome the drug resistance’, *Pharmacological Reports*, vol. 72, no. 4, pp. 799–813, Aug. 2020, doi: 10.1007/s43440-020-00131-0.
- [67] Y. Jia *et al.*, ‘Overcoming EGFR(T790M) and EGFR(C797S) resistance with mutant-selective allosteric inhibitors’, *Nature*, vol. 534, no. 7605, pp. 129–132, Jun. 2016, doi: 10.1038/nature17960.
- [68] J. Li and H. Kwok, ‘Current Strategies for Treating NSCLC: From Biological Mechanisms to Clinical Treatment’, *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 6, p. 1587, Jun. 2020, doi: 10.3390/cancers12061587.
- [69] L. Pacini, A. D. Jenks, S. Vyse, C. P. Wilding, A. Arthur, and P. H. Huang, ‘Tackling Drug Resistance in EGFR Exon 20 Insertion Mutant Lung Cancer’, *Pharmgenomics Pers Med*, vol. Volume 14, pp. 301–317, Mar. 2021, doi: 10.2147/PGPM.S242045.

- [70] A. Rutkowska, E. Stoczyńska-Fidelus, K. Janik, A. Włodarczyk, and P. Rieske, ‘EGFR^{viii}: An Oncogene with Ambiguous Role’, *J Oncol*, vol. 2019, pp. 1–20, Dec. 2019, doi: 10.1155/2019/1092587.
- [71] C. von Achenbach, M. Weller, and E. Szabo, ‘Epidermal growth factor receptor and ligand family expression and activity in glioblastoma’, *J Neurochem*, vol. 147, no. 1, pp. 99–109, Oct. 2018, doi: 10.1111/jnc.14538.
- [72] H. Liu *et al.*, ‘Therapeutic strategies of glioblastoma (GBM): The current advances in the molecular targets and bioactive small molecule compounds’, *Acta Pharm Sin B*, vol. 12, no. 4, pp. 1781–1804, Apr. 2022, doi: 10.1016/j.apsb.2021.12.019.
- [73] S. Ahcene Djaballah, F. Daniel, A. Milani, G. Ricagno, and S. Lonardi, ‘HER2 in Colorectal Cancer: The Long and Winding Road From Negative Predictive Factor to Positive Actionable Target’, *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, no. 42, pp. 219–232, Jul. 2022, doi: 10.1200/EDBK_351354.
- [74] J. Dai *et al.*, ‘Pyrotinib in the treatment of human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer’, *Medicine*, vol. 99, no. 25, p. e20809, Jun. 2020, doi: 10.1097/MD.0000000000020809.
- [75] J. Zhang *et al.*, ‘Intratumoral Epiregulin Is a Marker of Advanced Disease in Non-Small Cell Lung Cancer Patients and Confers Invasive Properties on EGFR -Mutant Cells’, *Cancer Prevention Research*, vol. 1, no. 3, pp. 201–207, Aug. 2008, doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-08-0014.
- [76] N. Sunaga and K. Kaira, ‘Epiregulin as a therapeutic target in non-small-cell lung cancer’, *Lung Cancer: Targets and Therapy*, p. 91, Oct. 2015, doi: 10.2147/LCTT.S60427.
- [77] C. Chayangsu, S. Khunsri, V. Sriuranpong, and S. Tanasanvimon, ‘The correlations between serum amphiregulin and other clinicopathological factors in colorectal cancer’, *J Gastrointest Oncol*, vol. 8, no. 6, pp. 980–984, Dec. 2017, doi: 10.21037/jgo.2017.08.15.
- [78] S. Hobor, B. O. van Emburgh, E. Crowley, S. Misale, F. di Nicolantonio, and A. Bardelli, ‘TGF α and Amphiregulin Paracrine Network Promotes Resistance to EGFR Blockade in Colorectal Cancer Cells’, *Clinical Cancer Research*, vol. 20, no. 24, pp. 6429–6438, Dec. 2014, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0774.
- [79] C. Li, M. Iida, E. F. Dunn, A. J. Ghia, and D. L. Wheeler, ‘Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab’, *Oncogene*, vol. 28, no. 43, pp. 3801–3813, Oct. 2009, doi: 10.1038/onc.2009.234.
- [80] T. F. H. Y. M. K. and F. Y. SHINGO MIYAMOTO, ‘Potential for Molecularly Targeted Therapy against Epidermal Growth Factor Receptor Ligands’.

- [81] F. Yotsumoto *et al.*, ‘Efficacy of ligand-based targeting for the EGF system in cancer.’, *Anticancer Res*, vol. 29, no. 11, pp. 4879–85, Nov. 2009.
- [82] X. Zhang, ‘Growth factors in tumor microenvironment’, *Frontiers in Bioscience*, vol. 15, no. 1, p. 151, 2010, doi: 10.2741/3612.
- [83] S. Khelwatty, S. Essapen, I. Bagwan, M. Green, A. Seddon, and H. Modjtahedi, ‘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*, vol. 8, no. 5, pp. 7666–7677, Jan. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.13835.
- [84] J. Guo *et al.*, ‘Effect and mechanism analysis of different linkers on efficient catalysis of subunit-fused nitrile hydratase’, *Int J Biol Macromol*, vol. 181, pp. 444–451, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.103.
- [85] D. K. Patel, D. v Menon, D. H. Patel, and G. Dave, ‘Linkers: A synergistic way for the synthesis of chimeric proteins.’, *Protein Expr Purif*, vol. 191, p. 106012, 2022, doi: 10.1016/j.pep.2021.106012.
- [86] X. Chen, J. L. Zaro, and W.-C. Shen, ‘Fusion protein linkers: Property, design and functionality’, *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 65, no. 10, pp. 1357–1369, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.addr.2012.09.039.
- [87] H. Choi, H. Park, K. Son, H. M. Kim, and Y. Jung, ‘Fabrication of rigidity and space variable protein oligomers with two peptide linkers’, *Chem Sci*, vol. 10, no. 44, pp. 10428–10435, 2019, doi: 10.1039/C9SC04158C.
- [88] ‘https://dash.harvard.edu/bitstream/handle/1/37370045/biotech.Fc-fusionLinker.research_Thesis.pdf?sequence=1’.
- [89] S. Havlicek *et al.*, ‘Re-engineered RNA-Guided FokI-Nucleases for Improved Genome Editing in Human Cells.’, *Mol Ther*, vol. 25, no. 2, pp. 342–355, 2017, doi: 10.1016/j.ymthe.2016.11.007.
- [90] C. A. Barnes *et al.*, ‘Remarkable Rigidity of the Single α -Helical Domain of Myosin-VI As Revealed by NMR Spectroscopy’, *J Am Chem Soc*, vol. 141, no. 22, pp. 9004–9017, Jun. 2019, doi: 10.1021/jacs.9b03116.
- [91] ‘<https://pymol.org/2/>’.
- [92] ‘<https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wcms.1298>’.
- [93] ‘<http://schubert.bio.uniroma1.it/pymod/index.html>’.

- [94] G. Janson and A. Paiardini, 'PyMod 3: a complete suite for structural bioinformatics in PyMOL', *Bioinformatics*, vol. 37, no. 10, pp. 1471–1472, Jun. 2021, doi: 10.1093/bioinformatics/btaa849.
- [95] '<https://www.rcsb.org/>'.
- [96] '<https://web.expasy.org/protparam/>'.
- [97] '<https://www.rcsb.org/structure/1IVO>'.
- [98] '<https://www.rcsb.org/structure/6OBI>'.
- [99] '<https://www.rcsb.org/structure/1mox>'.
- [100] 'https://www.imgt.org/IMGTeducation/Aide-memoire/_UK/aminoacids/IMGTclasses.html'.
- [101] B. D. Halligan, 'ProMoST: A Tool for Calculating the pI and Molecular Mass of Phosphorylated and Modified Proteins on Two-Dimensional Gels', 2009, pp. 283–298. doi: 10.1007/978-1-60327-834-8_21.
- [102] K. Y. Chang and J.-R. Yang, 'Analysis and Prediction of Highly Effective Antiviral Peptides Based on Random Forests', *PLoS One*, vol. 8, no. 8, p. e70166, Aug. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0070166.
- [103] V. Amblee and C. J. Jeffery, 'Physical Features of Intracellular Proteins that Moonlight on the Cell Surface', *PLoS One*, vol. 10, no. 6, p. e0130575, Jun. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0130575.
- [104] S. Enany, 'Structural and functional analysis of hypothetical and conserved proteins of *Clostridium tetani*', *J Infect Public Health*, vol. 7, no. 4, pp. 296–307, Jul. 2014, doi: 10.1016/j.jiph.2014.02.002.
- [105] S. Idicula-Thomas and P. v. Balaji, 'Understanding the relationship between the primary structure of proteins and its propensity to be soluble on overexpression in *Escherichia coli*', *Protein Science*, vol. 14, no. 3, pp. 582–592, Mar. 2005, doi: 10.1110/ps.041009005.

8. SAŽETAK

Heterogeni izražaj molekula faktora rasta u tumorskim tkivima jedan je od čestih uzroka *de novo* rezistencije. Liječenje tumora ovisnih o signalima EGF receptora primarno je usmjereno na inhibiciju aktivacije receptora vezanih za istovrsne molekule faktora rasta. Shodno tome, izostavljeno je u cijelosti djelovanje heterogenog izražaja molekula faktora rasta u tumorskom tkivu. U cilju istraživanja djelovanja izražaja različitih faktora rasta na razvoj i rezistenciju tumora, izrađene su uz pomoć računalnih programa i alata, PyMOL i PyMod 3, strukture proteinskih kimernih molekula građene od dvije molekule faktora rasta EGF receptora, međusobno povezane fleksibilnim ili krutim povezičaćem. Aminokiselinski slijed oba povezičaća (fleksibilni ili GG-GSAT*-GG i kruti ili GGG-MYO6*-GGG) modificiran je kako bi se omogućila bolja fleksibilnost kimerne molekule te je dodatno slijed aminokiselina krutog povezičaća skraćen kako bi se optimizirala udaljenost između dvije molekule faktora rasta. Sekvence kimernih molekula analizirane su koristeći PyMOL i ProtParam; analizirana je molekularna masa, teorijski pI, hidrofobnost, indeks nestabilnosti i alifatski indeks kimernih molekula. Prema dobivenim podacima može se zaključiti da model Kimera 1 ima najbolju termostabilnost, Kimera 3 ima najviši pI, a Kimera 2 se pokazao kao najhidrofilniji od svih modela. Predviđena stabilnost kimernih modela koji sadrže fleksibilni povezičać bila je veća u odnosu na modele s krutim povezičaćem. Modeliranje struktura kimernih molekula s fleksibilnim povezičaćem moglo bi rezultirati boljim razumijevanjem utjecaja heterogenog izražaja molekula faktora rasta, dok bi kimerne molekule s krutim povezičaćem mogle spriječiti aktivaciju receptora. U konačnici, ovo bi bili ključni alati za istraživanja rasta, razvoja i rezistencije samoga tumora, te inhibicije tumorigeneze.

9. SUMMARY

Heterogeneous expression of growth factor molecules in tumor tissues is one of the most frequent causes of *de novo* resistance. Treatment of EGFR signal-dependent tumors primarily targets the inhibition of receptor activation induced by two growth factor molecules. Thus, the heterogeneous expression of growth factor molecules in tumor tissue was ignored. In order to investigate the effect of the expression of different growth factors on tumor growth and resistance, with the help of computer programs and tools, PyMOL and PyMod 3, we modelled chimeric protein structures harbouring two molecules of growth factors of EGF receptor, interconnected with a flexible or rigid linker. The protein sequences of both linkers (flexible or GG-GSAT*-GG and rigid or GGG-MYO6*-GGG) were modified to improve the mobility of the chimeric molecule and the rigid linker was further shortened to optimize the distance between the two growth factor molecules. The protein sequences of chimeric molecules were analyzed using PyMOL and ProtParam, and the protein molecular mass, theoretical pI, hydrophobicity, instability index, and aliphatic index of chimeric molecules were determined. According to the obtained data, the model Chimera 1 has the best thermostability, Chimera 3 has the highest pI value, and Chimera 2 proved to be the most hydrophilic of all models. The predicted stability of the chimeric models containing a flexible linker was higher than that of models with a rigid linker. Modelling the structures of chimeric molecules with a flexible linker could result in a better understanding of the impact of heterogeneous expression of growth factor molecules, whereas chimeric molecules with a rigid linker could prevent receptor activation. In conclusion, these would be the key research tools by which we could define the mechanisms of microenvironment impact on tumor growth, progression, and resistance, as well as tumor inhibition.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Sara Žuljević Escobar

Datum i mjesto rođenja: 27.07.1995., Split

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa: Ulica Miroslava Krleže 20

E-mail: sara.zuljevic.escobar@gmail.com

OBRAZOVANJE:

- 2002. – 2010. Osnovna škola Sućidar, Split

- 2010. – 2014. Srednja škola, 2. gimnazija, Split

- 2014. – 2017. Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, Preddiplomski studij Fizioterapije, Split

- 2017. – 2022. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Integrirani sveučilišni studij, Farmacija

RADNO ISKUSTVO:

- Veljača, 2022. – Kolovoz, 2022. – Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Sućidar

AKTIVNOSTI:

2016. – 2021. - Volontiranje “72 sata bez kompromisa”

STRANI JEZICI:

Engleski jezik, talijanski jezik

DRUGE VJEŠTINE:

Rad na računalu (Eskulap 2000, PyMOL, PyMod 3, Microsoft Office)