

# Ispitivanje mehanizma djelovanja kimernih molekula faktora rasta EGF receptora na signalizaciju u stanici

---

**Nejašmić, Barbara**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*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:171:276124>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-04**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Barbara Nejašmić**

**ISPITIVANJE MEHANIZMA DJELOVANJA KIMERNIH MOLEKULA FAKTORA  
RASTA EGF RECEPTORA NA SIGNALIZACIJU U STANICI**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2023./2024.**

**Mentor:**

**doc. dr. sc. Jasminka Omerović**

**Split, rujan 2024.**

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. ErbB/HER obitelj protein kinaznih receptora .....	2
1.1.1. Struktura EGF receptora.....	2
1.1.2. Ligandi .....	4
1.1.1.1. <i>Epidermalni faktor rasta</i> .....	5
1.1.1.2. <i>Transformirajući faktor rasta <math>\alpha</math></i> .....	5
1.1.1.3. <i>Betacelulin</i> .....	5
1.1.1.4. <i>Heparin vezujući-EGF</i> .....	5
1.1.1.5. <i>Amfiregulin</i> .....	6
1.1.1.6. <i>Epiregulin</i> .....	6
1.1.1.7. <i>Epigen</i> .....	6
1.1.3. Aktivacija .....	7
1.1.4. Signalni putevi.....	11
1.1.4.1. <i>RAS-RAF-MEK-ERK MAPK signalni put</i> .....	11
1.1.4.2. <i>PI3K-AKT-mTOR signalni put</i> .....	12
1.1.4.3. <i>PLC-<math>\gamma</math>1-PKC signalni put</i> .....	12
1.1.5. Endocitoza .....	14
1.2. ErbB obitelj i tumori.....	15
1.2.1. Tumorski mikrokoliš .....	15
1.2.2. Mehanizmi aktivacije EGF receptora u tumorima .....	16
1.3. ErbB obitelj i terapija .....	19
1.3.1. Tirozin kinazni inhibitori.....	20
1.3.2. Monoklonska protutijela.....	21
1.3.3. Terapija usmjerena na ligande EGF receptora .....	22
1.3.4. Rezistencija na terapiju.....	23

2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	25
2.1. Cilj istraživanja.....	26
2.2. Hipoteze.....	26
3. MATERIJALI I METODE .....	27
3.1. Materijali .....	28
3.1.1. Stanična linija .....	28
3.1.2. Bakterijski soj.....	28
3.1.3. Kimerne molekule .....	28
3.2. Metode.....	30
3.2.1. Transformacija kompetentnih bakterija metodom toplinskog šoka .....	30
3.2.2. Izolacija plazmidne DNA .....	30
3.2.3. Ekstrakcija proteina iz bakterija .....	30
3.2.4. Transfekcija CHO-K1 stanica .....	31
3.2.5. Stimulacija CHO-K1 stanica kimernim molekulama.....	31
3.2.6. Imunoprecipitacija.....	32
3.2.7. Western blot.....	32
3.2.8. Kvantifikacija podataka i statističke metode .....	33
4. REZULTATI.....	34
5. RASPRAVA.....	41
6. ZAKLJUČCI.....	45
7. LITERATURA.....	47
8. SAŽETAK.....	53
9. SUMMARY .....	55
10. ŽIVOTOPIS .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

*Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Jasminki Omerović na prijateljskom pristupu, strpljenju, uloženom trudu i vremenu, na svemu što me naučila prilikom izrade diplomskog rada.*

*Zahvaljujem i Sandri Vujević, bacc. med. lab. diag., na savjetima i pomoći pri snalaženju u laboratorijskom okruženju.*

*Također zahvaljujem svima s Katedre za imunologiju i medicinsku genetiku, koji su mi omogućili provedbu ovog rada u Laboratoriju za istraživanje raka.*

*Posebnu zahvalu upućujem mojoj obitelji i prijateljima,*

*sretna sam što vas imam u životu!*

## **Kratice**

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

AREG – amfiregulin (engl. *amphiregulin*)

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

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

BTC – betacelulin (engl. *betacellulin*)

BRAF – B-Raf protoonkogen (engl. *B-Raf Proto-Oncogene*)

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

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

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

EPGN – epigen (engl. *epigen*)

EREG – epiregulin (engl. *epiregulin*)

ERK – (engl. *extracellular signal regulated kinase*)

FBS – fetalni goveđi serum (engl. *Fetal Bovine Serum*)

Grb2 – (engl. *Growth factor receptor binding protein 2*)

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

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

HER – ljudski EGF receptor (engl. *human EGFR receptor*)

IB – imunoblot (engl. *immunoblotting*)

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

LB – Luria-Bertani hranjivi medij (engl. *lysogeny broth*)

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

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

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

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

PAE – stanice endotela svinjske aorte (engl. *Porcine Aorta Endothelial cells*)

PI3K – fosfoinozimid 3-kinaza (engl. *phosphoinositide 3-kinase*)

PIP2 – fosfatidilinozitol-4,5-difosfat (engl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*)

PIP3 – fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (engl. *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*)

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

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

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

PTEN – homolog fosfataze i tenzina (engl. *phosphatase and tensin homologue protein*)

RalGDS – Ral stimulator disocijacije gvanin nukleotida (engl. *Ral guanine nucleotide dissociation stimulator*)

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

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

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

SDS-PAGE – natrij dodecil sulfat-poliakrilamid gel elektroforeza (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

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

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

SOS – citoplazmatski protein koji je dobio ime prema produktu gena sevenless vinske mušice (engl. *son of sevenless*)

TBST-BSA – Tris-puferirana fiziološka otopina s Tweenom i goveđi serumski albumin (engl. *Tris-buffered saline with Tween and Bovine Serum Albumin*)

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

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

## **1. UVOD**



## **1.1. ErbB/HER obitelj protein kinaznih receptora**

Receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR/ErbB-1) prvi je otkriveni receptor tirozin kinaze (RTK) te se često smatra “prototipom” tirozin kinaznih receptora i intenzivno je proučavan (1). Štoviše, većina principa i paradigmi na kojima se temelji djelovanje receptorskih tirozin kinaza prvo je uspostavljena za EGFR (2). Obitelj receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR) sastoji se od četiri različita receptora: EGFR/ErbB-1, HER2/ErbB-2, HER3/ErbB-3 i HER4/ErbB-4 (3). Oznaka gena ErbB izvedena je iz virusnog onkogeno eritroblastične leukemije, kojemu su ti receptori homologni (4). Ovi transmembranski proteini služe kao receptori na površini stanice za peptidne ligande obitelji epidermalnog faktora rasta (EGF) i igraju ključnu ulogu u regulaciji stanične proliferacije, migracije i diferencijacije; njihova abnormalna aktivnost povezana je s različitim vrstama tumora (5).

Međutim, daleko od toga da je prototip, sada je jasno da je regulacija članova obitelji ErbB jedinstvena među RTK. Članovi obitelji ErbB jedini su RTK s tirozin kinaznom domenom (TKD) regulirani bez potrebe za fosforilacijom aktivacijske petlje - umjesto toga koriste jedinstveni način alosteričke regulacije asimetričnom dimerizacijom. Također, jedina su poznata RTK obitelj u kojoj je mehanizam dimerizacije “receptorski posredovan”, odnosno svi međumolekularni kontakti izvanstaničnih domena posredovani su receptorom na način da vezani ligand nema izravan doprinos povezivanju dimera. Obitelj ErbB ima više sličnosti s inzulinskim receptorom nego s većinom drugih RTK-ova, uključujući negativnu kooperativnost vezivanjem liganda. Nadalje, postoje i određene funkcionalne te strukturne razlike (1).

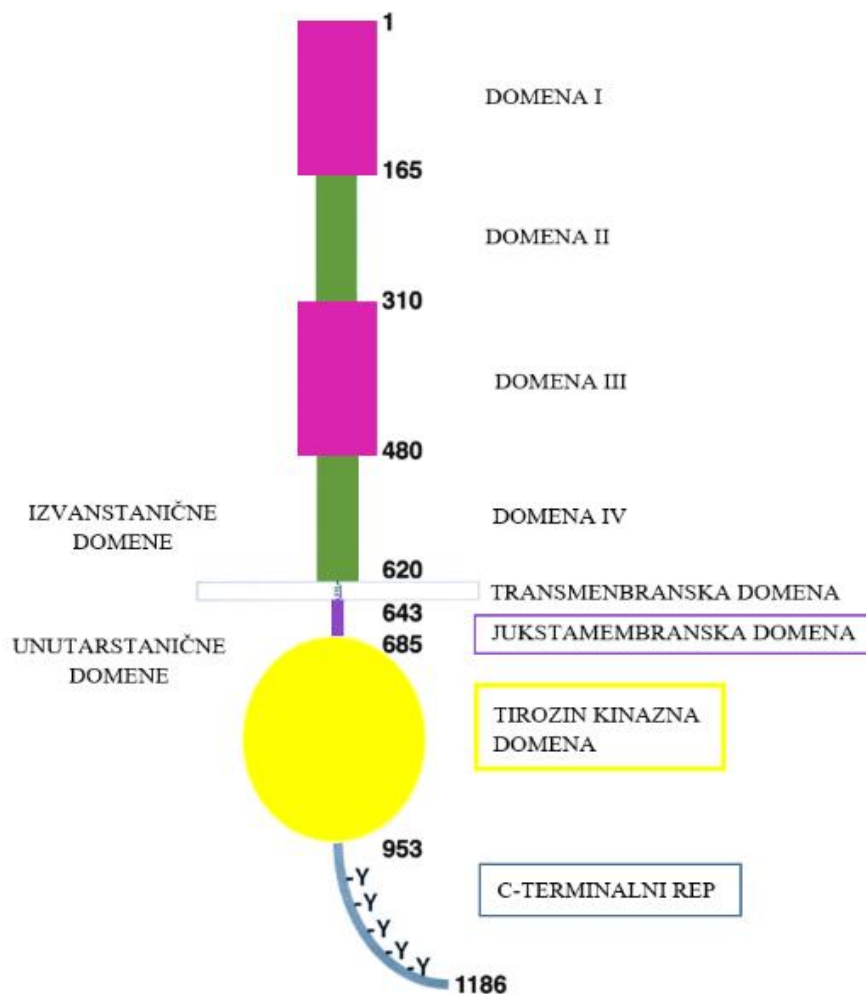
### **1.1.1. Struktura EGF receptora**

Sve RTK imaju sličnu molekularnu arhitekturu (Slika 1), s ligand vezujućom regijom u izvanstaničnoj domeni, jednom transmembranskom spiralom te citoplazmatskom regijom koja sadrži domenu protein tirozin kinaze (TK) uz karboksi (C-) terminalne i jukstamembranske regulatorne regije (6).

Izvanstanična domena ErbB receptora sastoji se od 621 aminokiseline i podijeljena je u četiri subdomene: domene I i III, segmente bogate leucinom koji sudjeluju u vezanju liganda, te domene II i IV, koje sadrže brojne cisteinske ostatke koji sudjeluju u stvaranju disulfidnih veza važnih za stabilizaciju strukture. Domena II sudjeluje u formiranju homo i heterodimera s članovima obitelji ErbB (7, 8). U odsutnosti bilo kakvog liganda, cjelokupna struktura izvanstanične domene zaključana je u autoinhibitornoj konfiguraciji. Svrha takve konformacije jest spriječiti otkrivanje motiva dimerizacije (9).

Transmembranska (TM) domena sastoji se od ~22 aminokiseline koje povezuju izvanstaničnu i unutarstaničnu domenu ErbB receptora. Prethodne studije otkrile su ključnu ulogu TM domene u alosteričkoj modulaciji receptora putem dvaju načina aktivacije koji uključuju okretno i rotacijsko gibanje TM spirala (10).

Unutarstanična domena sastoji se od 542 aminokiseline i uključuje fleksibilni jukstamembranski segment, domenu tirozin kinaze i C-terminalni rep (10). Jukstamembranski segment (JMD) je fleksibilna regija koja povezuje C-kraj TM domene s kinaznom domenom EGFR-a i igra važnu ulogu u njegovoj dimerizaciji i aktivaciji (11). Domena tirozin kinaze (TKD) sastoji se od NH<sub>2</sub>-terminalnog reznja (N-režanj) i većeg COOH-terminalnog reznja (C-režanj), između kojih je vezno mjesto ATP-a, takozvani ATP “džep”. Unutar TKD nalazi se visoko konzervirana aktivacijska petlja koja sadrži tirozin, treonin ili serin koji se fosforiliraju i reguliraju aktivnost kinaze. C-terminalni rep bogat je prolinskim ostacima, sadrži mjesta fosforilacije i igra važnu ulogu u regulaciji aktivacije receptora potiskivanjem aktivnosti kinaze u odsutnosti autofosforilacije (10).

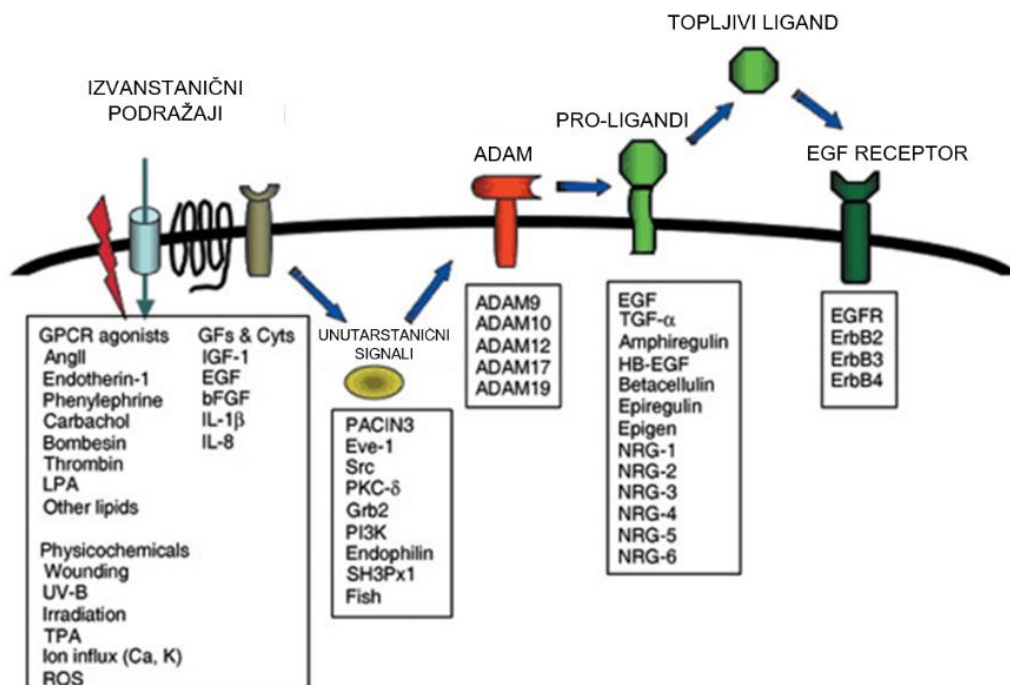


**Slika 1.** Struktura EGF receptora. Preuzeto i prilagođeno prema Burgess i sur. (36).

### 1.1.2. Ligandi

ErbB obitelj receptora kod ljudi je regulirana s najmanje sedam različitih aktivirajućih liganada: samim EGF-om, transformirajućim faktorom rasta  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), betacelulinom (BTC), heparin vezujućim EGF-u sličnim faktorom rasta (HB-EGF), amfiregulinom (ARG), epiregulinom (EPR) i epigenom (EPGN). Svaki ligand sadrži domenu sličnu EGF-u koja je odgovorna za vezanje i aktivaciju receptora, s karakterističnim uzorkom od šest prostorno očuvanih cisteina koji tvore tri intramolekularna disulfida (1). CCN2 je također nedavno identificiran kao ligand ErbB receptora (12).

Članovi obitelji EGF-a sintetizirani su kao transmembranski proteini. Kao odgovor na različite fiziološke i farmakološke agoniste, dolazi do odvajanja izvanstanične domene pomoću proteinaza, uglavnom metaloproteaza obitelji ADAM, kako bi se formirali topljivi ligandi (Slika 2). Ovisno o staničnom okruženju, ligandi obitelji EGF mogu inducirati jukstakrinu, autokrinu, parakrinu ili endokrinu signalizaciju. Jukstakrina signalizacija odnosi se na indukciju funkcionalnih promjena u ciljnoj stanici molekulom koja ostaje povezana s plazma membranom signalne stanice. Stanica može proizvoditi ligande koji potom autokrinim putem aktiviraju receptore te iste stanice, a može ih otpustiti lokalno, da stimuliraju susjedne stanice (parakrinu), ili sistemski, kako bi djelovali na udaljene stanice (endokrino) (13).



**Slika 2.** Cijepanje prekursora EGF obitelji liganada metaloproteazama ADAM. Preuzeto i prilagođeno s Higashiyama S, Iwabuki H, Morimoto C, Hieda M, Inoue H, Matsushita N. Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: Beyond receptor ligands. Cancer Science. 2008;99:214-20.

#### *1.1.1.1. Epidermalni faktor rasta*

Epidermalni faktor rasta (EGF) je protein od 6 kDa sastavljen od 53 aminokiseline. Prvi put je izoliran iz submaksilarnih žlijezda odraslog mužjaka miša, a stimulira proliferaciju niza epitelnih tkiva *in vivo* i *in vitro* (7, 14). Fiziološki, EGF nalazimo u tjelesnim tekućinama, a uključen je i u morfogenezu zubiju, mozga, reproduktivnog sustava, kože, gastrointestinalnog trakta, diferencijaciju i funkciju kardiovaskularnog sustava, regeneraciju epitela i rožnice. Nisu zabilježeni nikakvi poremećaji koji proizlaze iz nedostatka EGF-a, vjerojatno zbog prisutnosti drugih EGFR liganada (7).

#### *1.1.2.2. Transformirajući faktor rasta $\alpha$*

Otkriće transformirajućih faktora rasta (TGF) dovelo je do koncepta autokrine signalizacije. TGF- $\alpha$  eksprimiraju stanice epitelnog porijekla; poznato je da poremećaj regulacije ovog polipeptida igra važnu ulogu u raznim epitelnim tumorima. Također, otkriveno je da TGF- $\alpha$  nije samo autokrini mitogen specifičan za epitel, već djeluje i parakrino modulirajući mikrookruženje tumora te omogućujući komunikaciju između tumora, okolne strome i imunološkog sustava (15).

#### *1.1.2.3. Betacelulin*

Betacelulin prvotno je otkriven kao čimbenik poticanja rasta prilikom istraživanja  $\beta$ -staničnog tumora gušterače u miševima. BTC može vezati i aktivirati sve moguće heterodimerne kombinacije članova obitelji ErbB, uključujući visoko onkogeni ErbB-2/-3 dimer, kao i homodimere ErbB-4. Velik broj studija potvrdio je ulogu betacelulina u diferencijaciji  $\beta$ -stanica gušterače, a povezuje se i s nizom bioloških procesa, u rasponu od reprodukcije do kontrole neuralnih matičnih stanica (16).

#### *1.1.2.4. Heparin vezujući-EGF*

HB-EGF je molekularna komponenta značajna za niz normalnih fizioloških procesa, uključujući zacjeljivanje rana, reprodukciju, angiogenezu i adipogenezu. Pogrešna ekspresija HB-EGF povezana je sa stvaranjem raznih tumora: hepatocelularnog, želučanog, tumora dojke, gušterače, debelog crijeva, melanoma, glioma i glioblastoma. HB-EGF je obećavajuće sredstvo za poboljšanje liječenja ozljeda, prevenciju nekoliko vrsta tumora i pretilosti (17).

#### *1.1.2.5. Amfiregulin*

Fiziološki gledano, amfiregulin ima važnu ulogu u razvoju i sazrijevanju mliječnih žlijezda, koštanog tkiva i jajnih stanica. Sve je više dokaza da se AREG, osim u epitelnim stanicama i fibroblastima, proizvodi i u brojnim drugim stanicama. Signalizacija putem AREG-a ovisi o obradi i prometu proteina, a može se vršiti na različite načine: jukstakrino, autokrino, parakrino, unutarstaničnom nuklearnom translokacijom i uključivanjem u egzosome. Yardenova skupina pokazala je pretkliničku učinkovitost AREG neutralizirajućeg protutijela kod tumora jajnika (18).

#### *1.1.2.6. Epiregulin*

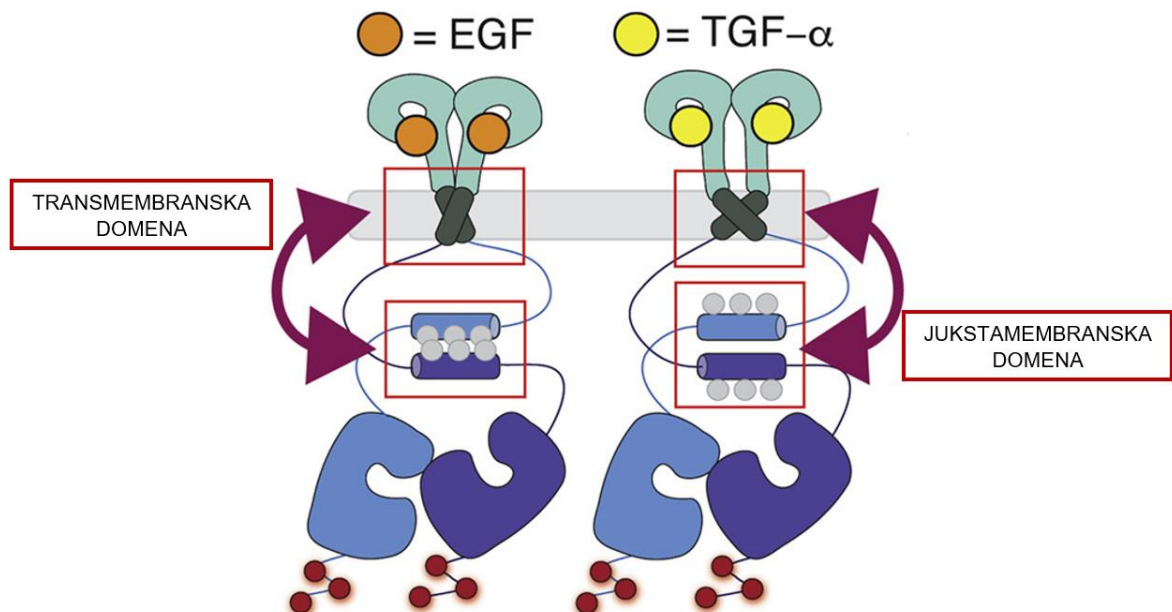
Epiregulin je mitogen za nekoliko tipova tkiva. Slabo je izražen u zdravim tkivima odraslih ljudi, ali u malignim bolestima dolazi do njegovog prekomjernog izražaja. Reguliranjem angiogeneze, vaskularnog preoblikovanja te stimulacijom stanične proliferacije, epiregulin potiče upalu, ali doprinosi i zacjeljivanju rana, obnavljanju tkiva i sazrijevanju oocita. Poremećaj regulacije epiregulina pridonosi napredovanju niza različitih zloćudnih bolesti, uključujući tumor mokraćnog mjehura, želuca, debelog crijeva, dojke, pluća, glave i vrata te jetre (19).

#### *1.1.2.7. Epigen*

Epigen je ime dobio zbog svojstva da djeluje kao epitelni mitogen. Slično drugim ligandima ErbB receptora, na povećanje ekspresije epigena djeluju hormoni te je izraženija u tumorima. Dok biološke funkcije epigena tek treba otkriti, čini se da igra ulogu u epidermalnim strukturama, kao što su mliječna žlijezda i žlijezda lojnica (20).

Navedeni ligandi mogu se podijeliti u dvije skupine na temelju afiniteta za vezanje receptora pa su tako EGF, TGF- $\alpha$ , BTC i HB-EGF visokog afiniteta, dok su AREG, EREG i EPGN niskog afiniteta. Ovisno o tome koji je ligand vezan na receptor, dolazi do različitih staničnih odgovora, u smislu stanične proliferacije, diferencijacije i/ili pokretljivosti (21). Uzrok tome bi mogle biti razlike u mjestima fosforilacije tirozina, ovisno o tome koji je ligand vezan. Različiti ligandi stabiliziraju izvanstaničnu domenu ErbB receptora u suptilno različitim konformacijama što je dokazano usporedbom izvanstaničnih domena EGFR-a vezanih za EGF ili TGF- $\alpha$ . Utvrđene razlike u konformaciji subdomene II u kompleksima EGFR-EGF i EGFR-TGF- $\alpha$  mogle bi utjecati na daljnje interakcije između unutarstaničnih domena u promatranom asimetričnom dimeru te rezultirati fosforilacijom različitih citoplazmatskih tirozinskih ostataka

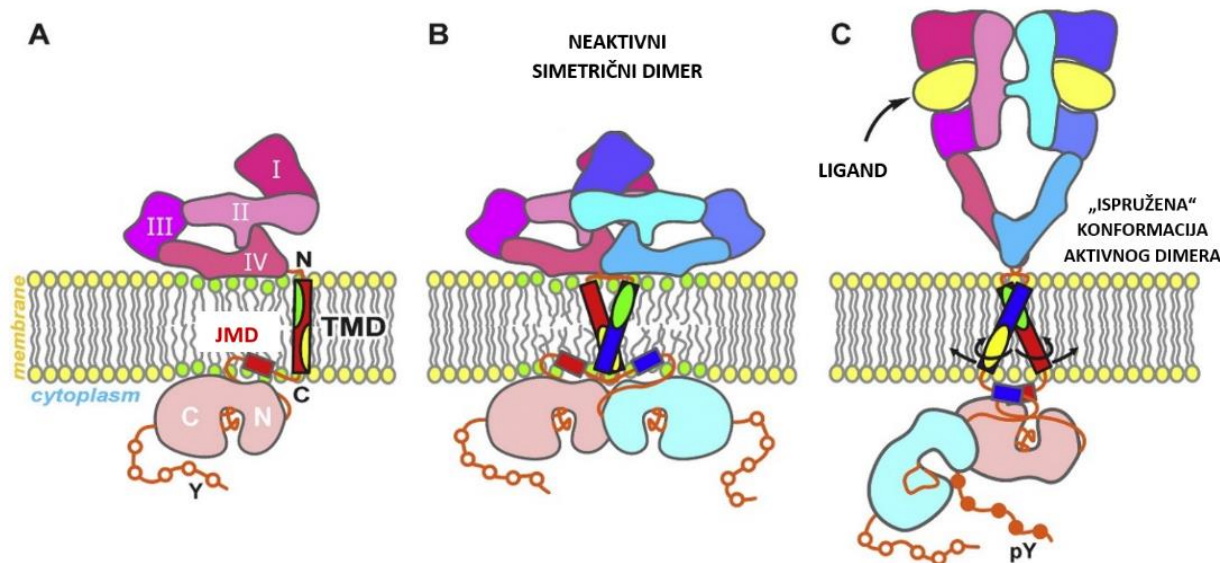
svakog receptorskog monomera od strane njihovog dimerizacijskog partnera (Slika 3). Na primjer, za razliku od AREG-a, EGF stimulira obilnu fosforilaciju EGFR na Tyr1045 (22). Pojedinačni ligandi ErbB receptora induciraju kvalitativno i kvantitativno različite nizvodne signale putem istog tirozin kinaznog receptora (21).



**Slika 3.** Prikaz različite konformacije EGF receptora ovisno o vezanim ligandima. Preuzeto sa Sinclair JKL, Walker AS, Doerner AE, Schepartz A. Mechanism of allosteric coupling into and through the plasma membrane by EGFR. *Cell Chemical Biology*. 2018;25:857-70.

### 1.1.3. Aktivacija

Receptor epidermalnog faktora rasta bio je među prvim receptorskim tirozin kinazama za koje je proučavano vezanje liganda i za koje je utvrđena važnost dimerizacije inducirane ligandom (1). EGFR također mogu postojati kao prethodno oblikovani dimeri (oligomeri) u odsutnosti liganada (5). Bilo da je “neaktivno” stanje monomerno ili oligomerno, aktivacija receptora još uvijek zahtijeva vezanje liganda za stabilizaciju specifičnog odnosa između pojedinačnih molekula receptora u “aktivnom” dimeru ili oligomeru (6). U dimerima bez liganda, izvanstanične domene poprimaju konformacije koje pogoduju dimerizaciji transmembranskih spirala blizu njihovih C-terminalnih krajeva, disocijaciju jukstamembranskog segmenta i stvaranje simetričnih (neaktivnih) dimera kinaze (Slika 4B). Vezanjem liganda, konformacije izvanstaničnih domena dovode do dimerizacije transmembranskih spirala blizu njihovih N krajeva, dimerizacije jukstamembranskih segmenata i formiranja asimetričnih (aktivnih) dimera kinaze (Slika 4C) (5).



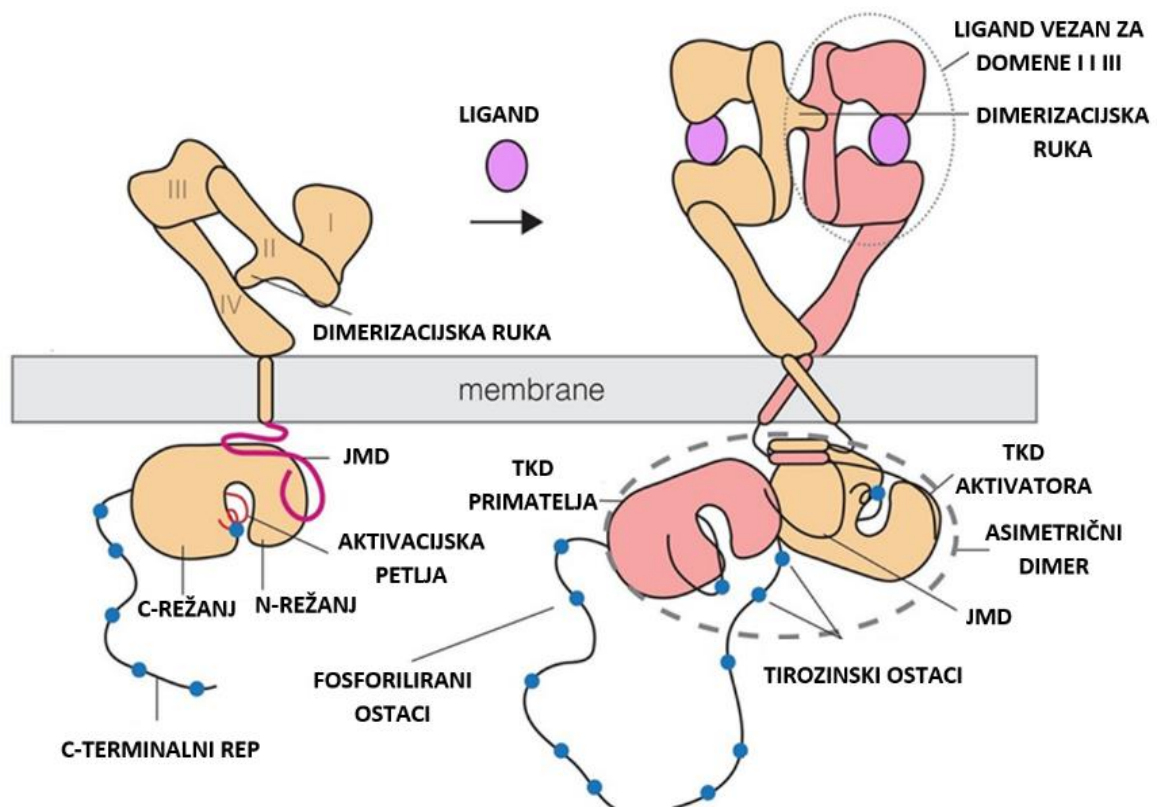
**Slika 4.** Mehanizam aktivacije EGF receptora. Slika A prikazuje inaktivni monomer receptora. Slika B prikazuje simetrični (neaktivni) dimer. Slika C prikazuje aktivnu konformaciju dimera EGF receptora vezanih za ligand i posljedičnu fosforilaciju tirozinskih ostataka C-terminalnog repa. Preuzeto s Bocharov EV, Lesovoy DM, Pavlov KV, Pustovalova YE, Bocharova OV, Arseniev AS. Alternative packing of EGFR transmembrane domain suggests that protein-lipid interactions underlie signal conduction across membrane. *Biochim Biophys Acta-Biomembranes*. 2016;1858:1254-61.

Proučavanjem strukture izvanstanične domene EGF receptora otkriveno je da je dimerizacija u potpunosti posredovana receptorima (Slika 5). Ligand dolazi u kontakt s dva različita mjesta unutar jedne molekule receptora (na domenama I i III). Domena II presavijena je u domenu IV preko disulfidnih veza, u “vezanoj” konformaciji koja autoinhibira dimerizaciju. Vežanje liganda potiče značajne konformacijske promjene u izvanstaničnoj domeni, koje razotkrivaju “dimerizacijsku ruku” domene II, dopuštajući interakciju s drugom molekulom EGF receptora vezanom za ligand (6, 8). ErbB receptor vezan ligandom može homodimerizirati s identičnim članom ErbB obitelji ili heterodimerizirati s različitim članom ErbB obitelji (19).

Dimerizacija domene II praćena je preraspodjelom u transmembranskoj domeni koja dovodi do preustroja u jukstamembranskom segmentu. Unutarstanični jukstamembranski segment tada stvara interakcije s domenom tirozin kinaze važne za stabilnost dimera EGF receptora. Navedene promjene dovode do nastanka asimetričnog dimera, to jest, dolazi do interakcije C-režnja kinazne domene jednog receptora (aktivator) s N-režnjem kinazne domene drugog receptora (primatelj) (8). Pri tom dolazi do aktivacije kinazne domene primatelja i



posljedične transautofosforilacije tirozinskih ostataka na unutarstaničnom C-terminalnom repu. Uz ova autofosforilirana mjesta, postoje i ostaci koji su fosforilirani drugim kinazama nizvodno u aktivacijskoj kaskadi. Na primjer, Y845 fosforilira c-SRC, a T654 fosforilira PKC. Novofosforilirani ostaci tirozina služe kao vezna mjesta za efektorske proteine s motivima vezanja fosfotirozina (SH2 ili PTB), pri čemu dolazi do aktivacije nizvodnih signalnih puteva. Druge važne domene u prijenosu signala EGFR-a uključuju SH3 (veže prolin), 14-3-3 (veže fosfoferin), bromo (veže acetilirani lizin) i PH domene (veže fosforilirane inozitide) (7).

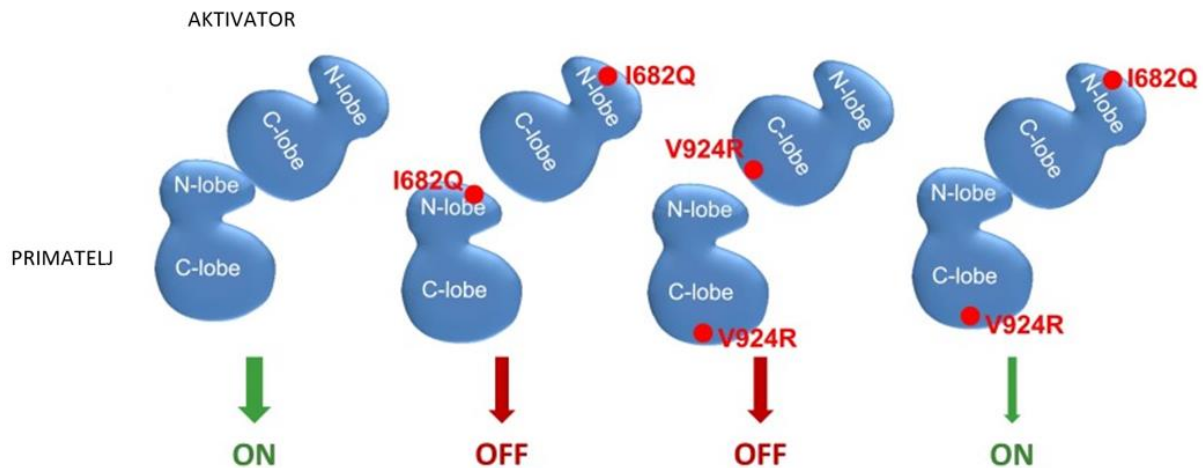


**Slika 5.** Mehanizam aktivacije EGF receptora. Preuzeto i prilagođeno s Huang Y, Bharill S, Karandur D, Peterson SM, Marita M, Shi X i sur. Molecular basis for multimerization in the activation of the epidermal growth factor receptor. *Elife*. 2016;5:e14107.

Alosterički mehanizam aktivacije EGFR-a dokazan je i ispitivanjem aktivacije mutiranih varijanti receptora, odnosno njegove kinazne domene. Interakcija C-reznja aktivatorske TKD s N-režnjem TKD-e primatelja potiče prijelaz potonje iz neaktivne u aktivnu konformaciju pri čemu nije potrebna fosforilacija aktivacijske petlje. Prema tome, EGFR s



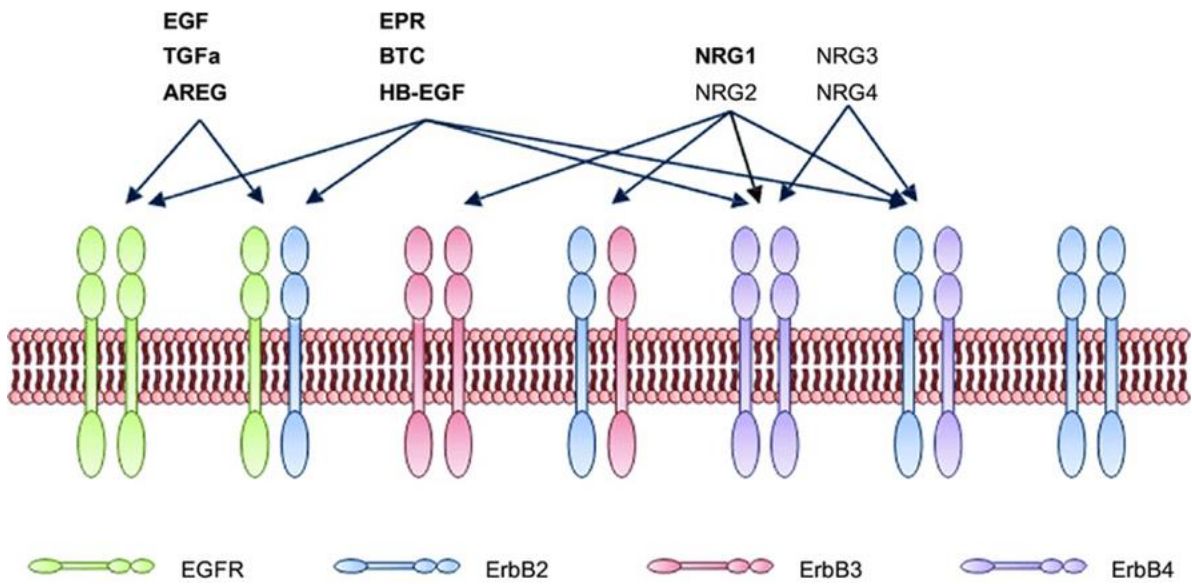
mutacijom I682Q u N-režnju mogu biti samo aktivatori, dok EGFR s mutacijom V924R u C-režnju mogu biti samo primatelji (Slika 6). U suprotnom, nije moguća formacija aktivnog dimera (24).



**Slika 6.** Ispitivanje mehanizma aktivacije kinaza. Preuzeto i prilagođeno iz Red Brewer M, Yun CH, Lai D, Lemmon MA, Eck MJ, Pao W. Mechanism for activation of mutated epidermal growth factor receptors in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110:E3595-604.

Dva od četiri ErbB receptora, ErbB-1 i ErbB-4, su autonomni, vezanjem liganda podvrgavaju se dimerizaciji i stvaraju unutarstanične signale koji dovode do stanične proliferacije, migracije ili diferencijacije. Druga dva receptora su neautonomna: ErbB-2 ne veže topljivi ligand, ali češće stvara heterodimerne komplekse s drugim ErbB vezanima za ligand, dok je kinazna aktivnost ErbB-3 smanjena, u tolikoj mjeri da se smatra oštećenom (25). Prema tome, homodimeri ErbB-2/ErbB-2 i ErbB-3/ErbB-3 su nefunkcionalni (Slika 7). Međutim, nefiziološka prekomjerna ekspresija ErbB-2 dovodi do stvaranja funkcionalnih homodimera. Unatoč nedostatku autonomije, i ErbB-2 i ErbB-3 tvore heterodimerne komplekse s drugim ERBB receptorima (8).

Od liganada koji se vežu na EGF receptore, poznato je da tri (EREG, HBEGF i BTC) vežu i aktiviraju ErbB-4. Obitelj liganada povezanih s EGF-om, nazvanih neuregulini, veže se za ErbB-3 i ErbB-4. Ne postoji poznati ligand za ErbB-2 (26).



**Slika 7.** Različiti dimeri EGF receptora i njihovi ligandi. Preuzeto s Cook N, Frese K, Moore M. Assessing the role of the EGF receptor in the development and progression of pancreatic cancer. *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy*. 2014;4:23-37

#### 1.1.4. Signalni putevi

Specifičnost i jačina unutarstaničnih signala određena je pozitivnim i negativnim efektorima ErbB proteina, identitetom liganda, sastavom oligomera te specifičnim strukturnim značajkama receptora. Međutim, glavna odrednica jest širok niz fosfotirozin vezujućih proteina koji se povezuju s repom svake ErbB molekule nakon stvaranja dimernih kompleksa. Koji su mjesta autofosforilirana, a samim time i koji signalni proteini sudjeluju, određeno je identitetom liganda i članovima unutar dimera (27).

Od četiri člana obitelji, EGFR dovodi do aktivacije najvećeg broja signalnih puteva, uključujući ERK MAPK, PI3K-AKT, PLC- $\gamma$ 1-PKC i JAK-STAT signalne puteve (Slika 8). Budući da su ti putevi međusobno povezani, aktivacija EGFR-a zapravo stimulira čitavu signalnu mrežu povezanu sa širokim brojem ishoda, kao što su proliferacija stanica, rast, diferencijacija, migracija i inhibicija apoptoze (7).

##### 1.1.4.1. RAS-RAF-MEK-ERK MAPK signalni put

RAS-ERK MAPK put smatra se najvažnijim signalnim putem u posredovanju biološkog odgovora EGF receptora. Do aktivacije signala dolazi vezanjem Grb2 proteina na fosfolirilane ostatke aktiviranog receptora, nakon čega navedeni protein stupa u interakciju sa SOS-om; čimbenikom izmjene gvanin nukleotida (GEF). SOS potom aktivira RAS protein (K-RAS, N-

RAS and H-RAS) stimulirajući izmjenu GDP-a GTP-om. RAS ulazi u interakciju s RAF (ARAF, BRAF ili CRAF) serin/treonin kinazom, točnije njenom Ras-GTP-vezujućom domenom (RBD), te dovodi do translokacije RAF-1 (CRAF) na staničnu površinu gdje nastupa njegova aktivacija u složenom procesu koji uključuje fosforilaciju, defosforilaciju i dimerizaciju. RAS također može aktivirati Ral stimulator disocijacije gvanin nukleotida (RalGDS) i fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K). Svojstvo RAS-a da aktivira ove glavne puteve ukazuje zašto su mutacije koje aktiviraju RAS, ili mutacije unutar RAS puteva, među najčešćim uzročnim genetskim promjenama u tumorima. RAF proteini izravno aktiviraju MEK1 i MEK2, tirozin i treonin/serin kinaze, koje u posljednjem koraku signalnog puta aktiviraju ERK. ERK stupa u interakciju s raznim citoplazmatskim i nuklearnim supstratima kako bi pokrenuo široku lepezu fizioloških i patoloških odgovora (28).

#### *1.1.4.2. PI3K-AKT-mTOR signalni put*

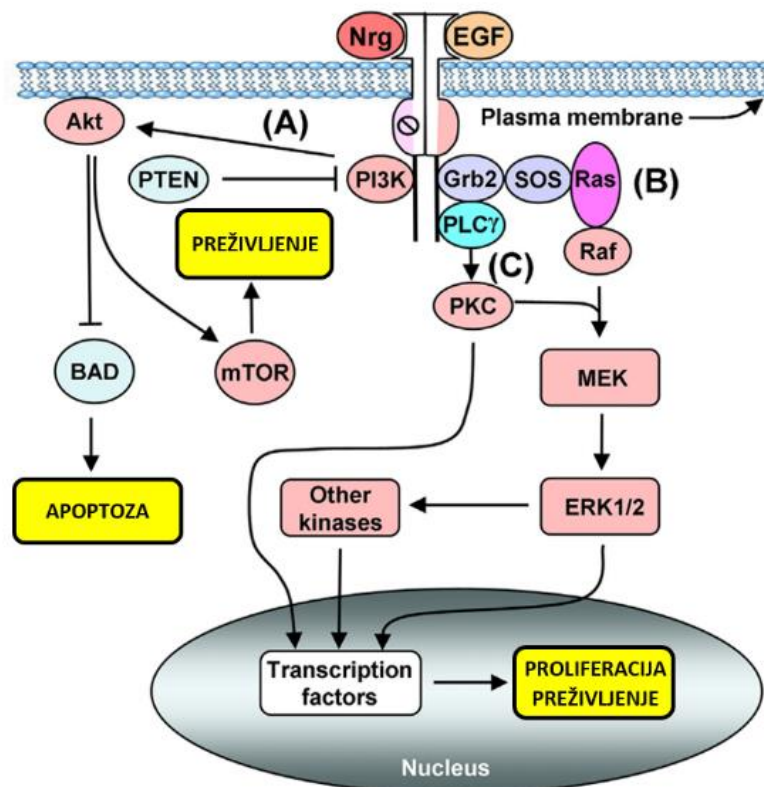
PI3K-AKT-mTOR signalni put kontrolira metabolizam, proliferaciju, veličinu stanica, preživljavanje i pokretljivost. U tumorima je često pojačano aktivan kao posljedica mutacija članova obitelji ErbB, PI3K, AKT i potiskivanja aktivnosti tumorskog supresora PTEN, koji antagonizira aktivnost PI3K. Put PI3K-AKT-mTOR također je nereguliran kod dijabetesa, autizma i starenja (29). PI3K svojom regulatornom domenom veže se za aktivirani EGF receptor, dok katalitičkom domenom dovodi do fosforilacije 3-OH skupine membranskog lipida PIP<sub>2</sub>, čime nastaje PIP<sub>3</sub>. AKT se veže na PIP<sub>3</sub> preko svoje PH domene pri čemu dolazi do njegove translokacije na plazma membranu. AKT se potom fosforilira na T308, što je neophodno i dovoljno za aktivaciju AKT. Međutim, maksimalna aktivacija postiže se fosforilacijom na S473. Jedan od najvažnijih AKT puteva je signaliziranje mTOR-u (7). mTOR je atipična serin/treonin protein kinaza, a sastoji se od mTOR kompleks 1 (mTORC1) i 2 (mTORC2). mTORC1 pokreće napredovanje staničnog ciklusa te potiče rast stanica. mTORC2 regulira preživljavanje stanica, metabolizam i citoskelet. Budući da se poremećaj regulacije mTOR-a javlja u raznim ljudskim bolestima, uključujući tumore, pretilost, dijabetes tipa 2 i neurodegeneraciju, meta je mnogih farmakoloških istraživanja (30). AKT također katalizira fosforilaciju i inhibiciju Bcl2 vezanog promotora smrti (BAD); nefosforilirani BAD djeluje proapoptotski (31).

#### *1.1.4.3. PLC- $\gamma$ 1-PKC signalni put*

Do sada je opisano trinaest izoenzima PLC-a, a grupirani su u šest klasa na temelju njihove funkcije i mehanizama regulatorne aktivacije. Fosfolipaza C gama 1 (PLC $\gamma$ 1) hidrolizira membranski fosfolipid fosfatidilinozitol 4,5-bifosfata (PIP<sub>2</sub>) u dva sekundarna

glasnika, diacilglicerol (DAG) i inozitol 1,4,5-trifosfat (IP3). DAG se zadržava u membrani i aktivira mnoge proteine, dok IP3 regulira mobilizaciju iona kalcija iz endoplazmatskog retikuluma (32). Oslobođeni kalcij i DAG aktiviraju protein kinazu C (PKC). PKC ima dosta unutarstaničnih supstrata uključujući EGFR, H-RAS, RAF-1, BAD, te fosfolipazu D (PLD) (7). Ovaj signalni put modulira nekoliko staničnih i fizioloških funkcija povezanih s tumorigenezom, kao što su stanična proliferacija, preživljavanje, angiogeneza i autofagija (32).

Ligandi EGF receptora imaju različite potencije aktivacije što u stanicama HeLa rezultira i različitom nizvodnom signalizacijom. Budući da zahtijeva niske razine aktivnih EGF receptora, glavni signalni put ERK/MAPK lako se aktivira te se očekuje da će biti induciran bez obzira na to koji je ligand prisutan. Nasuprot tome, aktivacija signalnih puteva AKT, PLC $\gamma$  i STAT3 zahtijeva više razine aktivnih EGF receptora i vjerojatnije je da će biti inducirani u prisutnosti potentnijeg aktivatora HB-EGF, dok su potrebne više razine BTC, EGF ili TGF- $\alpha$ . Također je istražena aktivacija EGFR-a u PAE stanicama, bez prisutnosti ostalih ErbB receptora. Pritom su pronađene razlike u aktivaciji EGFR-a, ali to se nije odrazilo na nizvodnu signalizaciju (33).

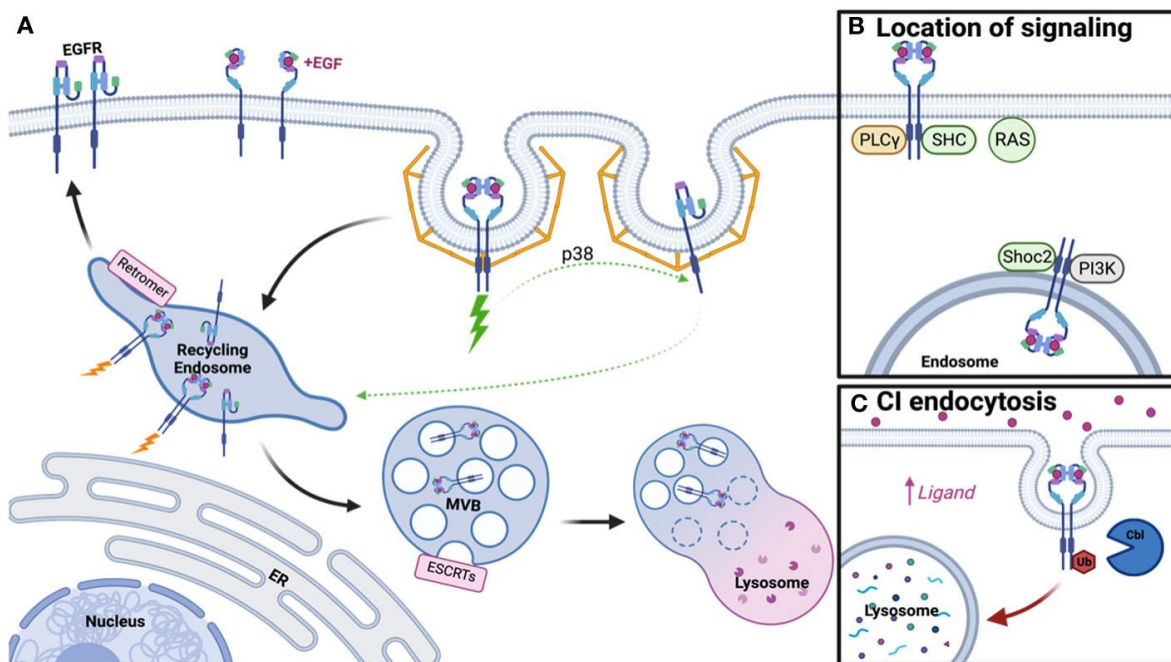


**Slika 8.** Mreža nizvodnih signalnih puteva. Preuzeto i pilagođeno iz Roskoski R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacological Research*. 2014;79:34-74.

### 1.1.5. Endocitoza

Down-regulacija endocitozom ključni je mehanizam koji dovodi do prestanka signalizacije EGF receptora. Nakon vezanja liganda, ErbB-1 receptori grupiraju se u klatrinom obloženim regijama plazma membrane, koje invaginiraju i tvore endocitne vezikule (Slika 9). One sazrijevaju do ranih i kasnih endosoma, postupno smanjujući unutarnji pH i nakupljajući hidrolitičke enzime koji dovode do degradacije receptora. Preostala tri ErbB proteina češće recirkuliraju natrag na površinu stanice. Preduvjet za razgradnju receptora je ubikvitinacija vezanjem c-Cbl ubikvitin ligaze za aktivni receptor preko fosforiliranog Y1045. Hoće li doći do razgradnje ili recirkulacije određeno je sastavom dimera, ali i vezanim ligandom, s obzirom da o tome ovisi stabilnost kompleksa ligand-receptor. Iz toga proizlazi da su kompleksi ligand-receptor koji podliježu razgradnji stabilniji. ErbB-1 homodimeri primarno su usmjereni na lizosom, ErbB-3 se konstitutivno recikliraju, a heterodimerizacija s ErbB-2 smanjuje brzinu endocitoze i povećava vjerojatnost recikliranja svojih partnera. Također, postoji oblik endocitoze neovisan o klatrinu koji se aktivira u slučajevima povećane ekspresije liganada (27).

Utvrđeno je da, dok vezanje EGF-a, BTC-a i HB-EGF-a dovodi do lizosomske degradacije EGF receptora, vezanje TGF- $\alpha$ , AREG i EREG uzrokuje recikliranje receptora i posljedičnu kontinuiranu signalizaciju. EGF dovodi do lizosomske razgradnje većine, ali ne svih ErbB receptora. Nakon degradacije, signal će biti smanjen dok se broj EGF receptora na plazma membrani ponovno ne uspostavi sintezom proteina. Nasuprot tome, nakon recikliranja receptora, stanica može odmah odgovoriti na aktivaciju receptora. U skladu s tim, TGF- $\alpha$  je snažniji mitogen od EGF-a (34). Nekoliko studija pokazuje da se signalizacija, pokrenuta na plazma membrani, nastavlja u unutarstaničnim odjeljcima nakon endocitoze. Međutim, nije razjašnjeno koji se signalni putevi u potpunosti aktiviraju na plazma membrani, a koji su regulirani endocitozom (33).



**Slika 9.** Prikaz endocitoze. Slika A prikazuje mehanizam endocitoze. Slika B prikazuje razliku signalizacije ovisno o lokalizaciji EGF receptora. Slika C prikazuje endocitozu neovisnu o klatrinu. Preuzeto sa Schultz DF, Billadeau DD, Jois SD. EGFR trafficking: effect of dimerization, dynamics, and mutation. *Frontiers in Oncology*. 2023;13:1258371.

## 1.2. ErbB obitelj i tumori

Neregulirani RTK mijenjaju normalnu staničnu biologiju što pogoduje procesu tumorigeneze. Do poremećaja regulacije može doći različitim mehanizmima, među koje spadaju nastanak mutacija, primjer je točkasta mutacija L858R u EGFR-u, i prekomjerna ekspresija ili genomska amplifikacija, primjerice receptora ErbB-2/HER2 kod tumora pluća, zatim autokrini aktivacija sinergističkim vezanjem liganda TGF $\alpha$  za EGFR, također kod tumora pluća, te udvostručenje domene kinaze, što je opaženo u obitelji ErbB i drugim obiteljima kinaza u raznim vrstama tumora (35).

EGFR je prvi receptor na površini stanice koji je bio izravno povezan s tumorima kada su Stanley Cohen i sur. opisali down-regulaciju EGFR-a u fibroblastima zaraženim onkogenim virusima. U novije vrijeme, poznato je da nastanak mnogih tumora potiče aktivacija EGFR-a, kao posljedica mutacije receptora, njegove prekomjerne ekspresije ili stimulacije putem autokrine petlje (36).

### 1.2.1. Tumorski mikrookoliš

Iako je već poznato da ne-tumorske stanice, kao što su stanice strome i imunološkog sustava, imaju ključne uloge u progresiji tumora i terapijskim odgovorima, pozornost je



uglavnom usmjerena na maligne stanice. Samo 5-10% slučajeva tumora može se pripisati genetskim poremećajima, a 90-95% svih slučajeva ima korijene u okolini i načinu života. U novije vrijeme, nastanak tumora je prepoznat kao evolucijski i ekološki proces koji uključuje stalne dinamične i uzajamne interakcije između malignih stanica i tumorskog mikrookoliša (TME). TME osigurava hranjive tvari, kisik, enzime i čimbenike rasta što olakšava neoangiogenezu, invaziju, nastanak metastaza te progresiju i proliferaciju tumora. Oslanjanje na TME nudi priliku za terapijsku intervenciju ciljanjem pojedinih elemenata mikrookoliša ili njegovih signalnih puteva (37).

Mnoge studije analizirale su izražaj EGF obitelji liganada u uzorcima tkiva ljudskih tumora koristeći imunološko bojanje, Northern blot ili lančanu reakciju reverzne transkriptaze-polimeraze (RT-PCR). Povećan izražaj liganada, kao što su TGF- $\alpha$ , HB-EGF i AREG, zabilježen je kod tumora jajnika, endometrija, mjehura, dojke, želuca, debelog crijeva, gušterače i prostate, kao i kod tumora bubrega, glioblastoma i melanoma. Nedavne studije pokazale su da razine ekspresije pojedinačnih liganada EGF receptora variraju među različitim vrstama tumora. HB-EGF je specifično izražen u visokim razinama kod tumora dojke, jajnika i mokraćnog mjehura. Kod raka debelog crijeva i gušterače, AREG je prepoznat kao ligand s najvećom ekspresijom (38). Imunohistokemijskom analizom uzoraka biopsije NSCLC-a utvrđeno je da je 64,7% tumora pozitivno na EREG, a prema podacima ti su bolesnici imali agresivnije tipove tumora i gore kliničke ishode. Povišene razine EREG-a pronađene su kod NSCLC s mutacijama KRAS, BRAF i EGFR gena (39). Od svih ErbB liganada, najbolje je opisana važnost TGF- $\alpha$  u nastanku tumora. TGF- $\alpha$  i ErbB1 su koeksprimirani u raznim tumorima, međutim poglavito u tumorima pluća, jajnika i debelog crijeva ta je kombinacija povezana s lošom prognozom (27).

Heterogeni izražaj liganada EGF receptora u TME povezan je s agresivnijim tipovima tumora što bi moglo biti novi prediktivni čimbenik tijeka bolesti i odgovora na terapiju (40).

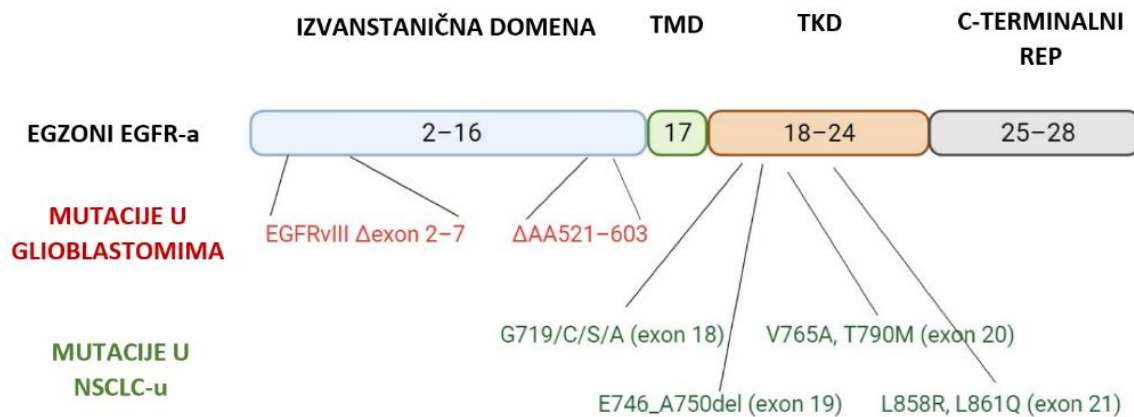
### **1.2.2. Mehanizmi aktivacije EGF receptora u tumorima**

EGFR gen lociran je na kratkom kraku q22 kromosoma 7, a sastoji se od 28 egzona. Mutacije EGFR-a javljaju se na mutacijskim “vrućim točkama” (engl. *hot spots*) u izvanstaničnoj regiji, domeni kinaze i C-terminalnom repu. Na primjer, kako je prikazano na slici 10, u većini glioblastoma nalazimo ih u izvanstaničnoj domeni, dok tumori pluća nemalih stanica (NSCLC) gotovo isključivo sadrže mutacije domene tirozin kinaze. Kod kolorektalnih karcinoma rjeđe nalazimo mutacije gena EGFR. Većina EGFR mutacija za posljedicu ima konstitutivnu aktivnost receptora stabiliziranjem dimera, neovisno o vezanju liganda. Nadalje,

neke mutacije omogućuju receptoru da izbjegne down-regulaciju endocitozom. Mutacije u transmembranskoj regiji EGFR-a su rijetke (7).

Najčešća mutacija EGFR-a u glioblastomu je varijanta III (vIII), odnosno delecija egzona 2-7 koji kodiraju ostatke 6-273 izvanstanične domene divljeg tipa receptora (engl. *wild type*), do čega obično dolazi nakon amplifikacije EGFRwt. Budući da delecija obuhvaća cijelu domenu I i većinu domene II, uključujući ključni krak dimerizacije, onemogućen je normalan mehanizam aktivacije receptora (6). Spontana oligomerizacija popraćena fosforilacijom tirozina zabilježena je kod onkogenih mutanata kojima nedostaje dio ili većina izvanstanične regije (41). EGFRvIII ima nižu razinu konstitutivne aktivnosti kinaze, dostatnu za poticanje rasta i preživljavanje tumora (42).

Kod tumora pluća nemalih stanica najčešći je nalaz delecije pet ostataka egzona 19 (Ex19del) i točkasta mutacija na egzonu 21, odnosno zamjena arginina za leucin (L858R). Ove dvije mutacije čine više od 90% aktivirajućih EGFR mutacija u NSCLC-u (8). Treća najčešća klasa EGFR mutacija, koja se javlja u 4-10% svih EGFR mutacija u NSCLC, su insercije egzona 20 (Ex20ins). Osim u NSCLC-a, EGFR Ex20ins opisane su u 68% tumora pločastih stanica nosa i paranazalnih sinusa, dok su EGFR Ex20ins, i HER2 Ex20ins, pronađene u 18%, odnosno 3,6%, urotelnih karcinoma (43).



**Slika 10.** Prikaz lokalizacije mutacija EGFR-a u glioblastomima i NSCLC-u. Preuzeto s Li F, Wu H, Du X, Sun Y, Nassif Rausseo B, Talukder AH i sur. Epidermal growth factor receptor-targeted neoantigen peptide vaccination for the treatment of non-small cell lung cancer and glioblastoma. *Vaccines (Basel)*. 2023;11:1460.



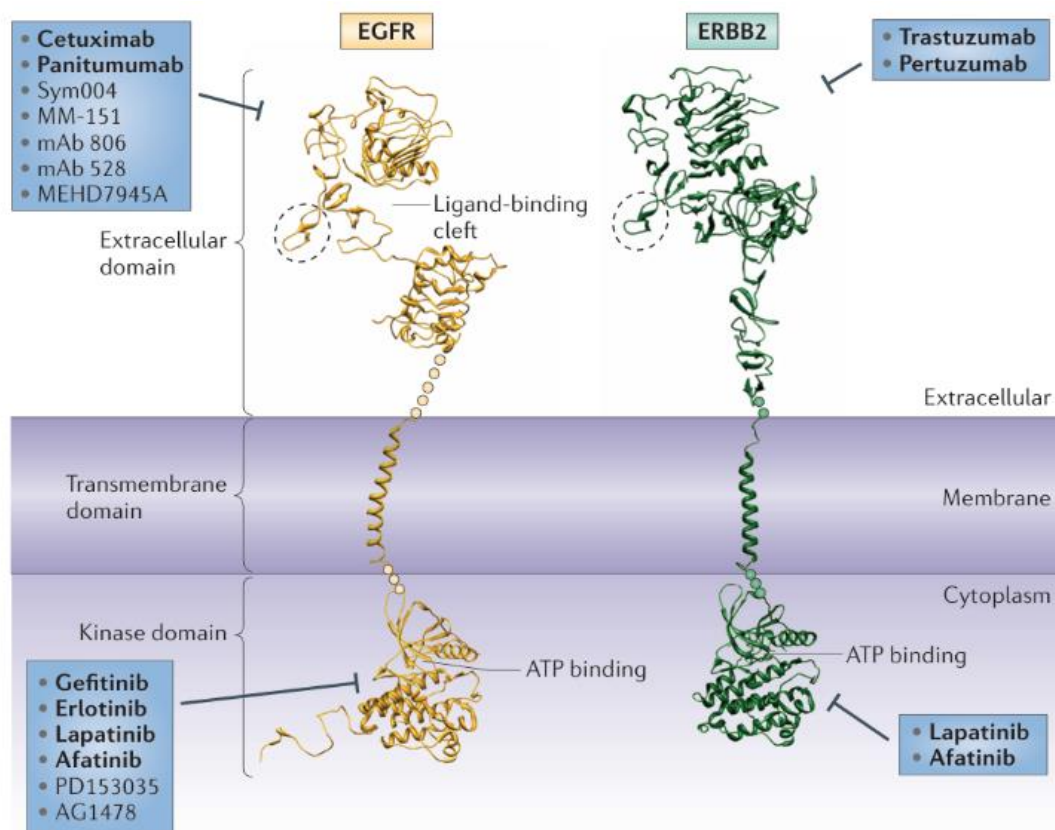
Amplifikacija gena EGFR pronađena je u 50% kolorektalnih karcinoma, s trostrukim do peterostrukim povećanjem broja kopija. Kod svih kolorektalnih karcinoma zabilježena je amplifikacija ErbB2, dok je njegova prekomjerna ekspresija nađena u 3% slučajeva (44). EGFR je također prekomjerno izražen u 40-80% NSCLC-a. ErbB-2 izrazito je prekomjerno izražen kao rezultat amplifikacije gena u 30% pacijenata s tumorom dojke. Prekomjerna ekspresija ErbB-2 povezana je s lošom prognozom bolesti (45). Nažalost, trostruko negativni tumor dojke (TNBC), koji se javlja u 20% slučajeva, ima još goru prognozu od ErbB-2 pozitivnih tumora s obzirom da trenutno ne postoji učinkovita terapija. U čak 70% slučajeva TNBC-a pronađen je prekomjerni izražaj EGFR-a kao posljedica mutacija ili amplifikacije (46).

Konstitutivna aktivnost EGFR-a česta je kod tumora zbog prekomjerne ekspresije EGFR divljeg tipa ili prisutnosti njegove mutirane varijante. Signalizacija konstitutivno aktivnih NSCLC EGFR mutanata ili EGFRvIII u glioblastomu je intenzivno proučavana i poznati su nizvodni signali. U fiziološkim uvjetima, EGFRwt se aktivira kada je vezan za ligand, međutim, u slučaju prekomjerne ekspresije, EGFRwt također je fosforiliran i ima konstitutivnu aktivnost bez vezanja liganda, no nizvodni signalni putevi nisu razjašnjeni. Nedavna istraživanja otkrila su oblik nizvodne signalizacije EGFRwt isključivo u odsutnosti liganda, koji rezultira aktivacijom transkripcijskog faktora IRF3. Dodavanje liganada isključuje transkripciju ovisnu o IRF3 te aktivira ERK i AKT. Stoga je iznesen zaključak da EGFR pokreće različite i međusobno isključive signalne mreže, ovisno o prisutnosti liganda (47). Nadalje, kombinacije homodimernih receptora manje su mitogene i transformirajuće od odgovarajućih heterodimernih kombinacija. Heterodimeri koji sadrže ErbB2 izazivaju najpotentniji stanični odgovor (27).

Povezanost prekomjerne ekspresije i aktivacije ErbB receptora s gorom prognozom, razvojem rezistencija na lijekove, metastatskim oblicima i nižom stopom preživljenja, potaknula je istraživanja novih lijekova koji ciljaju te receptore. U tijeku su brojna klinička ispitivanja koja testiraju učinkovitost različitih lijekova usmjerenih na ErbB receptore (8, 48).

### 1.3. ErbB obitelj i terapija

EGFR i njegovi srodnici poznati su onkogeni pokretači novotvorina kao što su tumor pluća, dojke i glioblastom, a inhibitori ovih receptora među najuspješnijim su primjerima ciljane terapije tumora, uključujući terapiju protutijelima (npr. trastuzumab i cetuksimab) i inhibitore tirozin kinaze (npr. erlotinib, gefitinib, lapatinib) (1). Kako je prizakano na slici 11, ErbB tirozin kinazni inhibitori (TKI) izravno se vežu na kinaznu domenu i blokiraju njenu aktivnost, dok se antitijela usmjerena na ErbB vežu izvanstanično, blokirajući vezanje liganda ili onemogućujući dimerizaciju receptora (49).



**Slika 11.** Prikaz mjesta djelovanja tirozin kinaznih inhibitora i monoklonskih protutijela. Preuzeto iz Tebbutt N, Pedersen MW, Johns TG. Targeting the ERBB family in cancer: couples therapy. Nature Reviews Cancer. 2013;13:663-73.

Većina programa razvoja lijekova i kliničkih ispitivanja usmjerena je na ErbB1 i ErbB2 zbog njihove povećane ekspresije u određenim tumorskim stanicama u odnosu na normalne stanice. Opsežni preklinički i početni klinički podaci sugeriraju da se ciljanjem EGFR-a ili ErbB-2 putem dvojne terapije, primjenom dvaju različitih protutijela ili protutijela i inhibitora tirozin kinaze, postiže sinergistički učinak (27, 49).

### 1.3.1. Tirozin kinazni inhibitori

Obitelj protein-tirozin kinaze sastoji se od 58 transmembranskih, receptorskih, i 32 unutarstanična proteina. Protein kinaze čine oko 2,5% ljudskog genoma. Važnost protein kinazne obitelji očituje se podatkom da otprilike jedan na svakih 40 ljudskih gena (518 gena za protein kinazu od procijenjenih 20 000 gena koji kodiraju ljudske proteine) kodira protein kinazu. Mapiranjem kromosoma otkriveno je da 244 protein kinaze mapiraju amplikone tumora i druge lokuse bolesti što ih čini jako važnom metom za razvoj terapija. Američka Uprava za hranu i lijekove (FDA), prema podacima dostupnim do 1. siječnja 2024., odobrila je 80 inhibitora protein kinaze malih molekula, od kojih je 69 indicirano za liječenje solidnih i nesolidnih novotvorina (50).

EGFR TKI prve generacije reverzibilno vežu EGF receptore te kompetitivno inhibiraju vezanje ATP-a na TK domenu, pritom onemogućavajući fosforilaciju tirozina. Ova blokada sprječava staničnu proliferaciju što, u konačnici, dovodi do stanične smrti (51). Budući da su ograničeno selektivni, mogu dovesti do niza nuspojava, primjerice inhibirajući kinaze povezane sa srčanom funkcijom.

Gefitinib se koristi za liječenje pacijenata s metastatskim tumorom pluća ne-malih stanica (NSCLC) koji imaju EGFR mutacije, L858R i Ex19del, u svojim tumorima.

Erlotinib je indiciran za liječenje lokalno uznapredovalog ili metastatskog NSCLC-a. Odobren je i kao prva linija terapije za pacijente s rakom gušterače u kombinaciji s gemcitabinom.

Icotinib je visoko selektivan EGFR TKI koji je odobren za liječenje NSCLC-a u Kini.

Lapatinib je dvostruki inhibitor EGFR/ErbB-2 kinaze prvotno odobren od strane FDA 2007. godine za uznapredovali ili metastatski tumor dojke u kombinaciji s kapecitabinom (52).

EGFR TKI druge generacije ireverzibilni su inhibitori koji se kovalentno vežu na kinaznu domenu EGFR-a. Razvijeni su za liječenje mutacija T790M, međutim važni nedostaci, koji ograničavaju daljnji razvoj ove skupine lijekova, su niska selektivnost, odnosno djelovanje na druge receptore humanog epidermalnog faktora rasta, i toksičnost koja ograničava dozu (53).

Afatinib je odobren u SAD-u (srpanj 2013.) i Europi (rujan 2013.) kao prva linija terapije pacijenata s NSCLC-om koji sadrži mutacije EGFR-a.

Brigatinib je derivat fosfora koji inhibira više kinaza. Propisuje se za liječenje tumora pluća nemalih stanica, anaplastičnog limfoma velikih stanica i neuroblastoma (52).

Neratinib je inhibitor tirozin kinaze receptora ErbB-2/-4. Odobren je za liječenje HER2 pozitivnog tumora dojke te HER2 pozitivnog metastatskog tumora dojke (53).

TKI treće generacije kovalentno se vežu za ATP vezno mjesto čime ireverzibilno inhibiraju EGFR. Imaju slab inhibicijski učinak na divlji tip EGFR-a, veću selektivnost i manje nuspojava od druge generacije TKI (54).

Osimertinib je pokazao učinkovitost prilikom tretiranja mutacija EGFR-a (L858R, L858R/T790M, Ex19del i Ex19del/T790M) u testovima EGFR-rekombinantnog enzima (50). Prema podacima dvostruko slijepe, randomizirane, multicentrične kliničke studije FLAURA, osimertinib je značajno poboljšao u svim aspektima u usporedbi s gefitinibom ili erlotinibom kao prve linije liječenja lokalno uznapredovalog ili metastatskog EGFR senzibiliziranog NSCLC s pozitivnim mutacijama.

Lazertinib je imao prihvatljiv sigurnosni profil i trajno djelovanje protiv tumora, posebno središnjeg živčanog sustava, s najdužim preživljenjem bez progresije bolesti (engl. *progression-free survival*, PFS) među EGFR TKI treće generacije (54).

U četvrtu generaciju spadaju alosterički inhibitori, EAI001, EAI045, DDC4002 i DDC-01-163, koji se vežu na mjesto u EGFR-u koje nije domena tirozin kinaze. Kao monoterapija, neučinkoviti su u liječenju NSCLC s mutiranim EGFR-om, no upareni s inhibitorom EGFR-a, kao što je osimertinib, ili monoklonskim protutijelom cetuksimabom, djeluju sinergijski u terapiji tumora.

EAI045 je prvi otkriveni inhibitor koji može nadvladati mutacije EGFR T790M i C797S.

DDC4002 je novootkrivena molekula koja inhibira put kaspaze-7, enzima važnog za inicijaciju apoptoze. Pokazala se djelotvornom kod mutacije L858R (52).

Većina pacijenata liječenih EGFR TKI razvija relativno umjerenu toksičnost. Mali dio prekida terapiju zbog pojave značajnih i onesposobljavajućih nuspojava koje utječu na kvalitetu života, uključujući dermatološke reakcije, proljev, hepatotoksičnost, stomatitis, intersticijsku bolest pluća i okularnu toksičnost. Smanjenje doze, zamjena lijeka ili privremeni prekid terapije prije nego što pacijent razvije teške nuspojave, poboljšavaju učinak terapije i prognozu pacijenata s tumorima pozitivnim na mutirane forme EGFR-a (55).

### **1.3.2. Monoklonska protutijela**

Monoklonska protutijela (mAb) vežu se za izvanstaničnu ligand vezujuću domenu EGF receptora, potiču internalizaciju receptora i mogu stimulirati imunološki odgovor domaćina putem stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (engl. *Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*, ADCC) (56, 58).

Cetuksimab je kimerno mišje anti-EGFR mAb (IgG1) i prvi je lijek u ovoj klasi odobren za kliničku upotrebu, od strane FDA, za liječenje kolorektalnog karcinoma rezistentnog na irinotekan.

Panitumumab je humano anti-EGFR mAb (IgG2) koje je podvrgnuto ranim kliničkim ispitivanjima za terapiju tumora prostate. Prema dosadašnjim podacima, panitumumab inhibira angiogenezu, potvrđujući prekliničke modele koji povezuju inhibiciju EGFR-a i angiogeneze (56).

Nimotuzumab je humanizirano EGFR monoklonsko protutijelo. Trenutno je odobreno u pojedinim zemljama za terapiju tumora pločastih stanica glave i vrata, nazofaringealni tumor te gliome (57).

Pertuzumab je humanizirano monoklonsko protutijelo koje onemogućava stvaranje dimera vezanjem za dimerizacijski krak domene II ErbB-2. Indiciran je za upotrebu u kombinaciji s trastuzumabom i docetakselom za liječenje bolesnika s ErbB-2 pozitivnim metastatskim tumorom dojke koji prethodno nisu primili anti-ErbB-2 terapiju ili kemoterapiju za metastatsku bolest.

Trastuzumab je protutijelo koje specifično cilja ErbB-2/HER-2 receptore te se pokazalo da izaziva imunološki odgovor protiv HER2 pozitivnih tumora. U terapiji HER2 pozitivnih tumora dojke koristi se u kombinaciji s drugim lijekovima, kao što je mAb pertuzumab ili TKI, kako bi se prevladao mogući razvoj rezistencije (58).

### **1.3.3. Terapija usmjerena na ligande EGF receptora**

S obzirom na vrlo različite učinke liganada na aktivaciju EGF receptora, od velike je važnosti istražiti koje kombinacije tumor eksprimira. Kod raka mokraćnog mjehura, HB-EGF, EPI, AR i TGF- $\alpha$  povezani su s nižim ukupnim preživljenjem nego BTC i EGF. Zanimljivo, osim HB-EGF, ligandi EGF receptora povezani s lošim preživljenjem su oni koji ne stimuliraju razgradnju receptora čime omogućavaju njegovu ponovnu aktivaciju (34).

Rezultati prekliničke studije inhibicije signala EGFR-a blokadom njegovih liganada, u kombinaciji s kemoterapijom, ukazuju da inhibicija HB-EGF ili AR vraća osjetljivost na konvencionalne kemoterapijske agense. Razvoj inhibitora HB-EGF ili AR kao antagonista EGFR-a može pružiti kliničke mogućnosti za terapiju novotvorina (38). Nadalje, HB-EGF može biti obećavajuća meta kod terapije tumora jajnika. Toksin difterije, kojeg luči *Corynebacterium diphtheriae*, veže se na EGF domenu HB-EGF-a te inhibira staničnu proliferaciju, no ne može se koristiti u svrhu terapije zbog jake toksičnosti. Međutim, mutirani toksin difterije, CRM197, netoksičan je protein koji se veže na HB-EGF jače nego difterijski

toksin. Prema dosadašnjim podacima, CRM197 pokazuje sinergijski učinak u kombinaciji s paklitakselom te je značajno potisnuo peritonealno širenje tumora, i to pri koncentracijama koje nisu pokazale zadovoljavajuće antitumorske učinke u pojedinačnom liječenju s bilo kojim sredstvom (59).

Također, istražuje se i primjena kimernih (rekombinantnih) molekula proizvedenih genetskim inženjeringom. Kimerni fuzijski proteini mogu se sastojati od efektorskih peptida, primjerice vezujuće domene citokina ili faktora rasta, povezanih s odgovarajućim fuzijskim partnerom, najčešće humanim imunoglobulinom G1 (60). RB200 je kimerna molekula sastavljena od izvanstaničnih domena EGFR i HER3 spojenih s Fc domenom humanog imunoglobulina G1. Vezujući ligande EGF receptora, uključujući EGF, TGF $\alpha$ , HB-EGF i neureguline, RB200 je potisnuo fosforilaciju ErbB receptora te pokazao antitumorski učinak u *in vivo* modelu ksenografta tumora pločastih stanica i NSCLC-a (59).

#### **1.3.4. Rezistencija na terapiju**

Najznačajniji nedostatak EGFR TKI je razvoj rezistencije, odnosno mutiranih varijanti EGFR-a (10). Također, odgovor na terapiju monoklonskim protutijelima na EGFR-e slabo je uspješan; poboljšanja u preživljenju traju samo nekoliko mjeseci, a učinkovitost je ograničena na određene podtipove bolesnika (49).

Odgovor na EGFR TKI prve i druge generacije ozbiljno je oslabljen u gotovo svih pacijenata neizbježnom pojavom rezistencije unutar 10-12 mjeseci. Utvrđeno je nekoliko mehanizama stečene rezistencije, a najčešća je sekundarna mutacija T790M, prijavljena u više od polovice svih slučajeva. Naziva se i "čuvarem vrata" (engl. *gatekeeping*) zbog položaja na ulazu u ATP vezujući džep, a nastaje zamjenom treonina na poziciji 790 volumno većim metioninom, pri čemu dolazi do povećanja afiniteta za vezanje ATP-a i steričke smetnje za vezanje inhibitora. EGFR TKI druge generacije nisu uspjeli nadvladati otpornost na mutaciju T790M jer bi postizanje terapijske doze, pri kojoj ti lijekovi pretklinički nadvladaju aktivnost T790M, kod pacijenata bilo previše toksično (49). Trećom generacijom EGFR TKI postignut je uspješan terapijski odgovor na mutaciju T790M, no u 40% slučajeva dolazi do razvoja rezistencije pojavom tercijarne točkaste mutacije C797S, zamjene cisteina na poziciji 797 serinom, u ATP veznom džepu. Učinkoviti lijekovi za mutacije C797S i ex20ins još uvijek su u fazi istraživanja i razvoja (43, 61).

Treća generacija EGFR TKI, kao što su osimertinib i rociletinib, trenutno se pretklinički testiraju za terapiju glioblastoma. Mnogi lijekovi i protutijela usmjerena na EGFRvIII ne mogu proći krvno-moždanu barijeru, što ograničava njihovu učinkovitost (42). U pretkliničkoj fazi

testiranja najobčavajajući rezultati proizašli su kombiniranjem TKI dacomitiniba i foretiniba te foretiniba i AZD3759, selektivnog EGFR inhibitora koji ima dobru permeabilnost krvno-moždane barijere (62).

U terapiji metastatskog EGFR pozitivnog kolorektalnog karcinoma rezistentnog na kemoterapiju, odobrena su monoklonska protutijela cetuximab i panitumumab kao monoterapija ili u kombinaciji s irinotekanom. Zabilježen je razvoj rezistencije na mAb mutacijama u izvanstaničnoj domeni EGFR-a, a posebnu pozornost treba obratiti na varijantu S492 koja je nađena u 16% bolesnika nakon izlaganja cetuksimabu i u samo 1% nakon liječenja panitumumabom (63). Nedavno su razvijene nove mješavine protutijela usmjerenih na EGFR, uključujući Sym004 i MM-15, koje imaju obećavajuće rezultate u pretkliničkim istraživanjima (33).

Klinički rezultati pokazuju da dvije trećine pacijenata ne reagiraju na trastuzumab, a pacijenti koji su prvotno odgovorili na terapiju, kasnije razviju rezistenciju raznim mehanizmima: izražajem HER2 bez izvanstanične domene što onemogućuje vezanje lijeka, pojačanom aktivacijom drugih receptora tirozin kinaze, aktivirajućim mutacijama PI3K i/ili inaktivirajućim mutacijama u PTEN tumor supresorskom genu. Navedene se mutacije nastoje izbjeći ili zaobići kombinacijom trastuzumaba s mAb pertuzumabom i docetakselom, još uvijek s nedovoljno dobrim terapijskim učinkom (58).

Mnogo truda je uloženo u istraživanja ErbB obitelji receptora u svrhu razvijanja terapije za liječenje novotvorina. Međutim, slab odgovor na terapiju i razvoj rezistencije predstavljaju velike izazove u formiranju daljnjih strategija. Također, studije sugeriraju da visoke koncentracije liganada ErbB receptora mogu zaobići učinkovitost terapije te da terapija lijekovima protiv tumora može potencijalno utjecati na ekspresiju liganada. Prethodno navedeno ukazuje na važnost uzimanja u obzir prisutnosti i razina liganada ErbB receptora, te signalnih puteva koje induciraju, kako bismo poboljšali pristup liječenju tumora (33).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**



## **2.1. Cilj istraživanja**

Cilj ovog istraživanja je producirati i ispitati djelovanje dvaju kimernih molekula čimbenika rasta EGF receptora na signalizaciju u stanici, u svrhu kreiranja biološki aktivnih homogenih i heterogenih rekombinantnih molekula dimernih čimbenika rasta koje bi inhibirale aktivnost receptora. U ovom radu pozornost je stavljena na ispitivanje djelovanja homogenih dimernih čimbenika rasta u obliku fuzijskih proteina na fosforilaciju EGF receptora i nizvodni RAS/MAPK signalni put u CHO staničnoj liniji.

## **2.2. Hipoteze**

Vežanje homogenih molekula dimernih čimbenika rasta u obliku fuzijskih proteina s pomičnim povezičaćem za EGFR receptor ne utječe na aktivaciju istog.

Vežanjem homogenih molekula dimernih čimbenika rasta u obliku fuzijskih proteina s krutim povezičaćem za EGFR receptor alosterički se onemogućuje njegova aktivacija.

Vežanje homogenih molekula dimernih čimbenika rasta u obliku fuzijskih proteina s pomičnim povezičaćem za EGFR receptor ne utječe na nizvodne signalne puteve.

Vežanjem homogenih molekula dimernih čimbenika rasta u obliku fuzijskih proteina s krutim povezičaćem za EGFR receptor inhibiraju se nizvodni signalni putevi.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Stanična linija

U radu je korištena CHO-K1 (ATCC, 2021.) stanična linija izolirana biopsijom jajnika kineskog hrčka (engl. *Chinese hamster ovary*), koja ne eksplicira EGFR.

Stanice su održavane na 10-90% konfluentnosti u inkubatoru s kontroliranom atmosferom (95% zraka i 5 %CO<sub>2</sub>), na temperaturi 37°C. Stanice su uzgajane u DMEM mediju (engl. *Dulbeccos Modification on Eagles Medium*) s dodatkom FBS-a (engl. *Fetal Bovine Serum*).

#### 3.1.2. Bakterijski soj

*Escherichia coli*, soj DH5 $\alpha$  (za izolaciju plazmidne DNA), BL21 (za produkciju proteina)

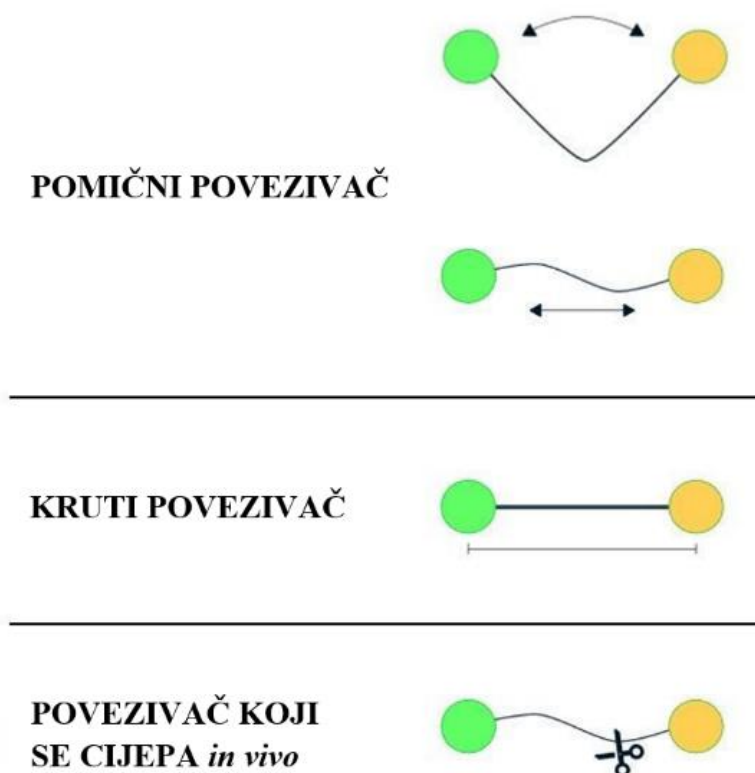
#### 3.1.3. Kimerne molekule

Kimerni (rekombinantni) fuzijski proteini korišteni u ovom radu sastoje se od dvaju peptida, epidermalnih faktora rasta, međusobno spojenih povezičaćem. Izravno spajanje proteina bez povezičaća dovodi do neželjenih karakteristika kimere, u vidu smanjene aktivnosti proteina, pogrešnog savijanja (engl. *misfolding*) ili oslabljene bioaktivnosti (64). Pravilno odabrani povezičać osigurava odgovarajuć razmak između proteina kimere čime omogućuje poboljšanje biološke aktivnosti, povećanje ekspresije i postizanje poželjnog farmakokinetičkog profila.

Dizajnirani povezičaći dijele se u tri kategorije prema strukturi (Slika 12):

- Pomični povezičaći: Sastoje od malih, nepolarnih (npr. glicin) ili polarnih (npr. serin, treonin), aminokiselina koje omogućuju pokretljivost povezanih funkcionalnih domena kimere. Najčešće se upotrebljavaju “GS” povezičaći koji sadrže glicinske i serinske ostatke.
- Kruti povezičaći: Obično se primjenjuju kada je potrebno prostorno razdvajanje domena u svrhu očuvanja stabilnosti ili bioaktivnosti fuzijskih proteina, što im omogućuje sastav od  $\alpha$ -zavojnica ili višestrukih prolinskih ostataka.
- Povezičaći koji se cijepaju *in vivo*: Cijepanjem povezičaća u određenim uvjetima, kao što je prisutnost redukcijjskih reagensa ili proteaza, dolazi do odvajanja

funkcionalnih domena što može smanjiti steričku smetnju, poboljšati bioaktivnost ili postići neovisno djelovanje pojedinačnih domena fuzijskog proteina (65).



**Slika 12.** Vrste poveziavača. Preuzeto iz Samant S. Tech Note: The Latest on Linkers for Recombinant Fusion Proteins [Internet]. Kbdna.com. 2020 [cited 2024 Sep 13]. Available from: <https://www.kbdna.com/publishinglab/lnkr>

U ovom radu upotrijebljene su kimerne molekule s pomičnim i krutim poveziavačem, označene GST proteinom (glutation-S-transferaza) kako bi se olakšala izolacija iz bakterijskog lizata.

Kimerna molekula 1 (ProteoGenix) s EGF i pomičnim poveziavačem

MNSDSECPLSHDSDHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR  
 LRGGGGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSGTGSGGGNSDSECPLSHD  
 GYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR

Kimerna molekula 2 (ProteoGenix) s EGF i krutim poveziavačem

MNSDSECPLSHDSDHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR  
 LRGGGQEEEAERLRRIQEEMEKERKRREDEQRRRKEEEEERRMKLEMEAKRKQEEE  
 ERKKEEDGGGGNSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYR  
 DLKWWELR

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Transformacija kompetentnih bakterija metodom toplinskog šoka

U svrhu unosa plazmidne DNA u bakteriju *E. coli* upotrijebljena je metoda toplinskog šoka (engl. *heat shock*) koja, naglim promjenama temperature, mijenja propusnost stanične stijenke i membrane. Kompetentne bakterije su transformirane s navedenim plazmidima kimere 1 i 2. U 10 µl kompetentnih bakterija dodano je 100 µl plazmidne DNA pa inkubirano na ledu 10 minuta. Potom je uslijedilo zagrijavanje na 42 °C 45 sekundi te ponovno hlađenje na ledu 2 minute. U sljedećem koraku dodano je 300 µl LB medija, zatim je ostavljeno na 37 °C 30 min. Transformirane bakterije prebačene su na ploče s LB agarom i ampicilinom nakon čega su ostavljene u inkubatoru na 37 °C preko noći. Budući da plazmidi sadrže gen za rezistenciju na ampicilin, očekuje se porast jedino transformiranih bakterija.

Pojedinačna kolonija s LB agar ploče inokulira se u određenom volumenu LB medija uz dodatak ampicilina i ostavi preko noći na 37 °C i 220 rpm. Određeni volumen prekonoćne kulture prenosi se u svježi LB medij te se periodično provjerava optička gustoća ( $\lambda$ ) suspenzije na spektrofotometru, koja je idealno između 0,4-0,6 kada je produkcija proteina najveća. Ukoliko je taj uvjet zadovoljen, dodaje se IPTG (izopropil  $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid), nakon čega slijedi indukcija u inkubatoru 4 sata na 37°C i 220 rpm. Prije indukcije bakterija potrebno je odvojiti po 1 ml uzorka bakterijske suspenzije koji se pohranjuje za kasniju analizu (*non-induced* uzorak kimere 1 i 2).

### 3.2.2. Izolacija plazmidne DNA

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

### 3.2.3. Ekstrakcija proteina iz bakterija

Nakon indukcije, provodi se postupak izolacije proteina iz transformiranih bakterija. Svi se koraci izvode na ledu u svrhu očuvanja proteina. Potrebno je izdvojiti po 1 ml bakterijske suspenzije za kasniju analizu (*induced* uzorak kimere 1 i 2), a ostatak medija prelije se u tube volumena 50 ml te centrifugira 15 minuta na 3000 rpm pri 4°C. Supernatant, odnosno tekući medij, se odlije i odbaci, a u daljnjim koracima koristi se preostali talog za izolaciju GST fuzijskih proteina kimere 1 i 2. Talogu se doda pufer B (50 mM TrisHCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% NP-40) uz dodatak proteaznih inhibitora (DTT, lizozim, leupeptin, PMSF, aprotinin i DNaza). Nakon vorteksiranja u puferu B, provodi se sonikacija medija (3 ciklusa po 15 sekundi pri 30 mA) kako bi primjena zvučnih valova visoke frekvencije pospješila lizu stanica. Soniciranim suspenzijama potrebno je dodati eksperimentalno određenu količinu

prethodno ispranih glutation sefarnoznih kuglica (engl. *Glutathione Sepharose 4B*) koje se vežu za GST fuzijski protein. Proces ispiranja, prvi put u PBS-u, zatim u puferu B, ponavlja se tri puta uz centrifugiranje 5 minuta na 2000 rpm. Bakterijski lizat s kuglicama inkubira se preko noći uz rotaciju na 4°C.

U sljedećim koracima cilj je pročistiti kuglice vezane za GST označene proteine od nevezanih proteina i ostalih nečistoća te, naposljetku, odvojiti GST biljeg povezan s kuglicama i fuzijski protein od interesa. Nakon inkubacije, uzorci se centrifugiraju 5 minuta na 2000 rpm. Potom se supernatant pažljivo odsiše i odbaci, a talog glutation sefarnoznih kuglica vezanih za GST fuzijske proteine serijski se ispiru, resuspendira i centrifugira. U procesu ispiranja korišteni su pufer B s inhibitorima i cijepajući pufer (engl. *cleavage buffer*) koji sadrži 50mM TrisHCl pH 7,0, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, PMSF i 0,001% NP-40. Od konačnog volumena odvoji se 1 ml svakog uzorka koji se pohrani za daljnju analizu (uzorak *beads* kimera 1 i 2). U preostali talog doda se eksperimentalno određena količina cijepajućeg pufera i PreScission enzima, u svrhu odvajanja kimera 1 i 2 od GST biljega, nakon čega slijedi inkubacija na rotatoru pri 4°C 24 sata.

### **3.2.4. Transfekcija CHO-K1 stanica**

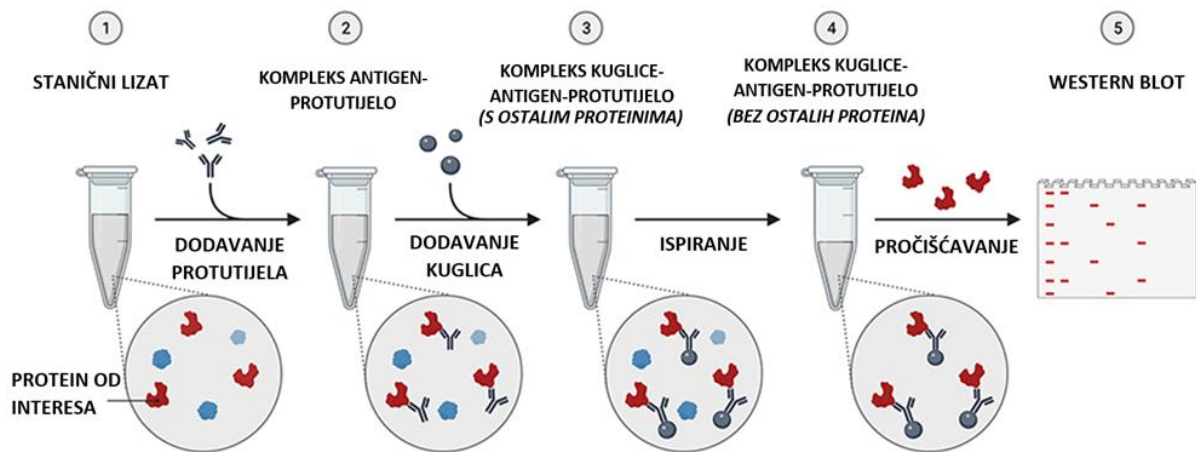
Transfekcijom se u eukariotske stanice unosi nukleinska kiselina. Transfekcija je provedena korištenjem jetOPTIMUS Transfection Kit. CHO-K1 stanice, nasadne na 10 cm ploču s DMEM medijem i inkubirane na 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> u inkubatoru za stanične kulture, pri konfluentnosti od 70-80% transfektirane su sljedećim konstruktima: EGFR WT (Segatto O. i Anastasi S.), EGFR I682Q (Zhang i sur.) i EGFR V924R (Zhang i sur.). Korišteno je 300 µl jetPRIME pufera te omjer 1µg DNA : 1 µl jetOPTIMUS DNA transfekcijskog reagensa. Ukupna količina plazmidne DNA po ploči od 10 cm je 5 µg. Transfekcijska smjesa se centrifugira i vorteksira te inkubira na sobnoj temperaturi 10 minuta, nakon čega se prebaci na pripremljene ploče s DMEM medijem. Transfektirane stanice inkubiraju se preko noći u inkubatoru s kontroliranom atmosferom (95% zraka i 5 % CO<sub>2</sub>), na temperaturi 37°C.

### **3.2.5. Stimulacija CHO-K1 stanica kimernim molekulama**

Transfektirane stanice konfluentnosti 70-80% podijeljene su u 24 x 6 cm ploče, po 8 za svaki konstrukt. Nakon 6-8 h promijenjen je medij te su ostavljene preko noći u inkubatoru na 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Potom su stanice izgladnjivane 8 sati u mediju bez dodanog FBS kako bi došlo do gašenja stanične signalizacije. Stanice su stimulirane s 50 ng EGF-a, kimere 1 i kimere 2 na 5, 10, 15 i 30 minuta, uz netretiranu kontrolnu ploču za svaki konstrukt. U svrhu utvrđivanja djelovanja ispitivanih liganada na staničnu signalizaciju, korištena je metoda Western blot.

### 3.2.6. Imunoprecipitacija

Dio staničnog lizata transfektiranih stanica odvojen je za imunoprecipitaciju (Slika 13), a ostatak je korišten kao ukupni stanični lizat za ispitivanje aktivacije nizvodnog signalnog RAS/MAPK puta. U dio staničnog lizata dodano je 2  $\mu$ l anti-total pY (Cell Signaling, 9411) te inkubirano preko noći pri 4°C na rotatoru. Uslijedilo je dodavanje 20  $\mu$ l protein G-agaroznih kuglica i ponovna inkubacija pri 4°C 60 minuta. Potom je imunoprecipitacijski kompleks ispran s puferom za lizu stanica, dodan je Laemmlli pufer nakon čega je zagrijan 5 minuta na 95°C kako bi došlo do odvajanja precipitiranih proteina od agaroznih kuglica. U svrhu utvrđivanja ukupne fosforilacije, korištena je metoda Western blot.



**Slika 13.** Shematski prikaz imunoprecipitacije. Preuzeto s Rockland [Internet]. Rockland: Resource Library. Immunoprecipitation Technique [citirano 2. rujna 2024.]. Dostupno na: <https://www.rockland.com/resources/immunoprecipitation-technique/>

### 3.2.7. Western blot

Western blot je metoda koja služi za odvajanje i identifikaciju proteina, a uključuje gel elektroforezu, prijenos (engl. *blotting*) proteina na membranu te selektivnu imunodetekciju imobiliziranog antigena (66).

Proteini su razdvojeni SDS-PAGE elektroforezom, na temelju molekularne mase, u prethodno izrađenom gradijentnom gelu (6-15%). Jednake količine uzoraka nanešene su nakon pripreme koja podrazumijeva razrjeđivanje pojedinih uzoraka puferom na temelju kvantifikacije, zagrijavanje na 95°C i centrifugiranje. Elektroforeza se odvijala 40 min na 45 mA pri 220V. Po završetku, uslijedilo je bojanje (Coomassie Brilliant Blue) i odbojavanje poliakrilamidnog gela.

Prijenos proteina na PVDF (poliviniliden fluorid) membranu odvija se uz pomoć električnog polja gdje se negativno nabijeni proteini vežu na pozitivno nabijenu membranu. Postupak „mokrog“ prijenosa podrazumijeva natapanje komponenti takozvanog sendviča u puferu za prijenos. Slaganje se vrši na kazeti, a redom se postavljaju spužvica, filter papir, poliakrilamidni gel, membrana prethodno tretirana metanolom pa ponovno filter papir i spužvica, nakon čega se kazeta preklopi. Postupak se vrši u kadici ispunjenoj puferom za prijenos pri jakosti struje 200mA u trajanju od 90 minuta.

Membrane se potom inkubiraju u TBST-BSA puferu za blokiranje 60 minuta, kako bi se onemogućilo nespecifično vezanje proteina na membranu. Nakon toga slijedi inkubacija s primarnim protutijelom preko noći na 4 °C. Primarna protutijela korištena u ovom radu su anti-total EGFR (Cell Signaling, 2232, 1:1000), anti-total pY (Cell Signaling, 9411, 1:1000), anti-pEGFR Y1173 (Cell Signaling, 4407, 1:1000), anti-pEGFR Y1068 (Cell Signaling, 2234, 1:1000) i anti-pERK (Cell Signaling, 9101, 1:1000). U idućem koraku, membrane se ispiru tri puta po 10 minuta s TBST, nakon čega se tretiraju sekundarnim protutijelima anti-zec (Dako, P0448, 1:4000) i anti-miš (Bio Rad, 170-6516, 1:4000) te inkubiraju 60 minuta. Membrane se zatim ispiru tri puta po 10 min s TBST kako bi se uklonila nevezana protutijela i smanjio pozadinski signal. Za detekciju proteina korišten je ECL reagens (1M Tris pH 8.8, 250 mM Luminol, 90 mM 4-jodofenilboronična kiselina) kojem se doda 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pred upotrebu. Kemiluminiscencija analizirana je putem *ChemiDoc*. Slike su obrađene u Adobe Photoshopu i Adobe Illustratoru verzije 21.0.2 (Adobe, San Jose, SAD).

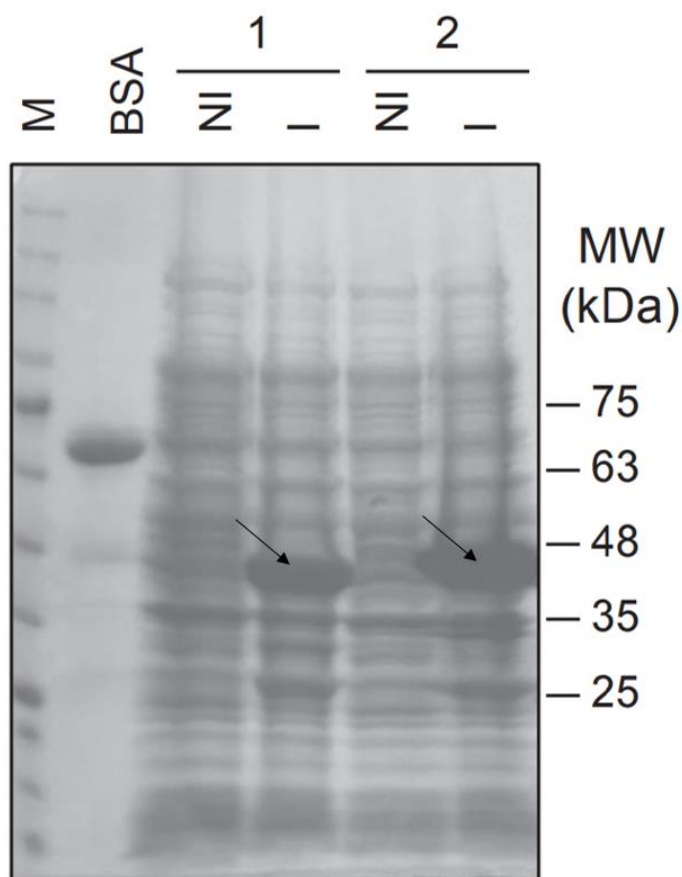
### **3.2.8. Kvantifikacija podataka i statističke metode**

Za kvantifikaciju signala upotrijebljen je Image Lab softver (verzija 5.2.1 build 11, Biorad, Hercules, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države) te su dobiveni rezultati prikazani kao postotak u odnosu na kontrolu, odnosno stimulaciju EGF-om nakon 5 minuta. Svi prikupljeni podaci su se unosili i pohranjivali u računalni program Microsoft Excel 2007 (Microsoft, SAD). Kvalitativne varijable prikazane su kao cijeli broj i postotak, a kvantitativne u obliku srednje vrijednosti ( $\bar{x}$ ) i standardne devijacije (SD). Za ispitivanje razine značajnosti razlike između skupina korišten je t-test. Vrijednosti  $P < 0,05$  smatraju se statistički značajnima. Grafički prikazi izrađeni su računalnom programom Microsoft Excel 2007 (Microsoft, SAD).



## **4. REZULTATI**

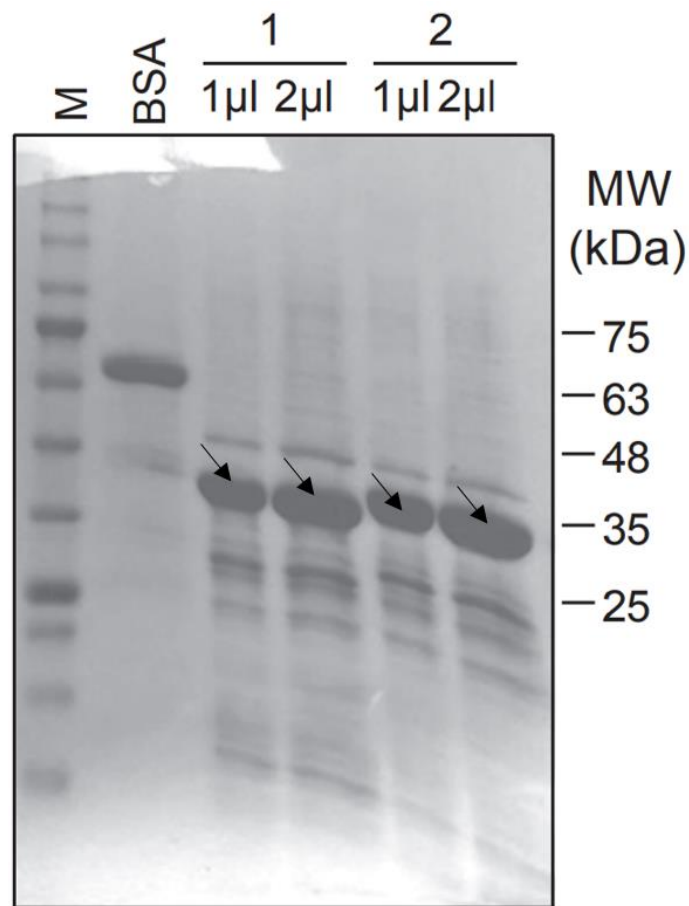
Za ekspresiju proteina korišteno je 200 ml bakterijske kulture. Uspješnost produkcije proteina određena je analizom izdvojenih uzoraka bakterijske suspenzije prije i nakon indukcije IPTG-om putem SDS-PAGE elektroforeze. Očekivana molekulska masa GST označenih kimernih proteina je 42kDa. Na slici 14 vidljivo je da su nakon indukcije u uzorcima *induced* 1 i 2 producirani proteini na pozicijama koje odgovaraju toj molekulskoj masi. Stoga možemo zaključiti da je produkcija GST označenih kimera 1 i 2 bila uspješna.



**Slika 14.** Prikaz produciranih proteina, prije (NI) i nakon indukcije (I) transformiranih bakterija, razdvojenih elektroforezom SDS-PAGE i bojanih s Coomassie Brilliant R-250. Strelicom su označeni uspješno producirani GST fuzijski proteini (42 kDa), odnosno kimere 1 i 2. Oznaka kDa predstavlja proteinski molekularni standard. M – marker; BSA – standard za kvantifikaciju koncentracije proteina; kimera 1 NI – neinducirani uzorak, I - inducirani uzorak; kimera 2 NI – neinducirani uzorak, I - inducirani uzorak. Slika je djelo autora.

Nakon inkubacije induciranih uzoraka kimere 1 i 2 s glutation sefarnim kuglicama, očekuje se da je većina GST fuzijskih proteina vezana za kuglice. U sljedećem koraku, analizirani su pročišćeni uzorci *beads* kimera 1 i 2 različitih koncentracija (1  $\mu$ l i 2  $\mu$ l ) u svrhu

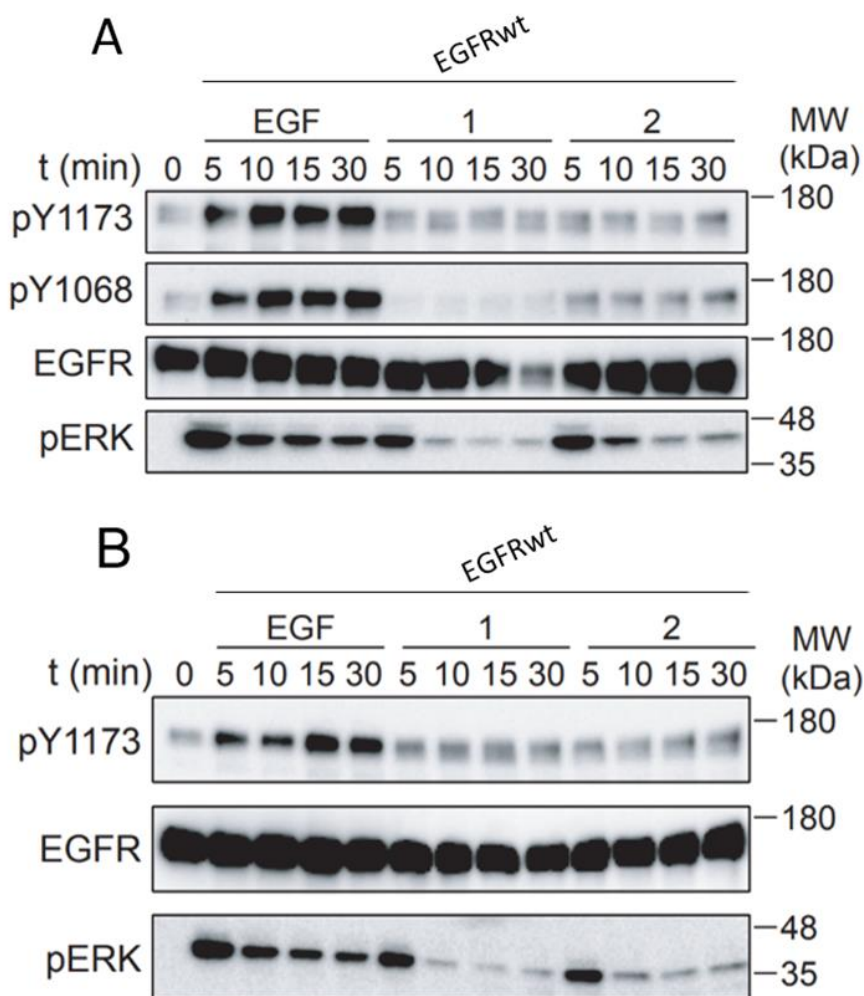
kvantifikacije vezanih proteina (Slika 15). Utvrđeno je da je količina vezanog proteina dovoljna za daljnje postupke, odnosno odvajanje kimera 1 i 2 od GST biljega te stimulaciju CHO stanica.



**Slika 15.** Kvantifikacija GST fuzijskih proteina vezanih za kuglice (označeni strelicom), razdvojenih elektroforezom SDS-PAGE i bojanih s Coomassie Brilliant R-250. Uzorci *beads* kimera 1 i 2 različite koncentracije (1  $\mu$ l i 2  $\mu$ l), na pozicijama koje odgovaraju molekularnoj masi GST fuzijskih proteina vezanih za kuglice, uspoređeni su s BSA (2  $\mu$ l) u svrhu kvantifikacije. Oznaka kDa predstavlja proteinski molekularni standard. M – marker; BSA – standard za kvantifikaciju koncentracije proteina; kimera 1-1  $\mu$ l i 2  $\mu$ l; kimera 2 - 1  $\mu$ l i 2  $\mu$ l. Slika je djelo autora.

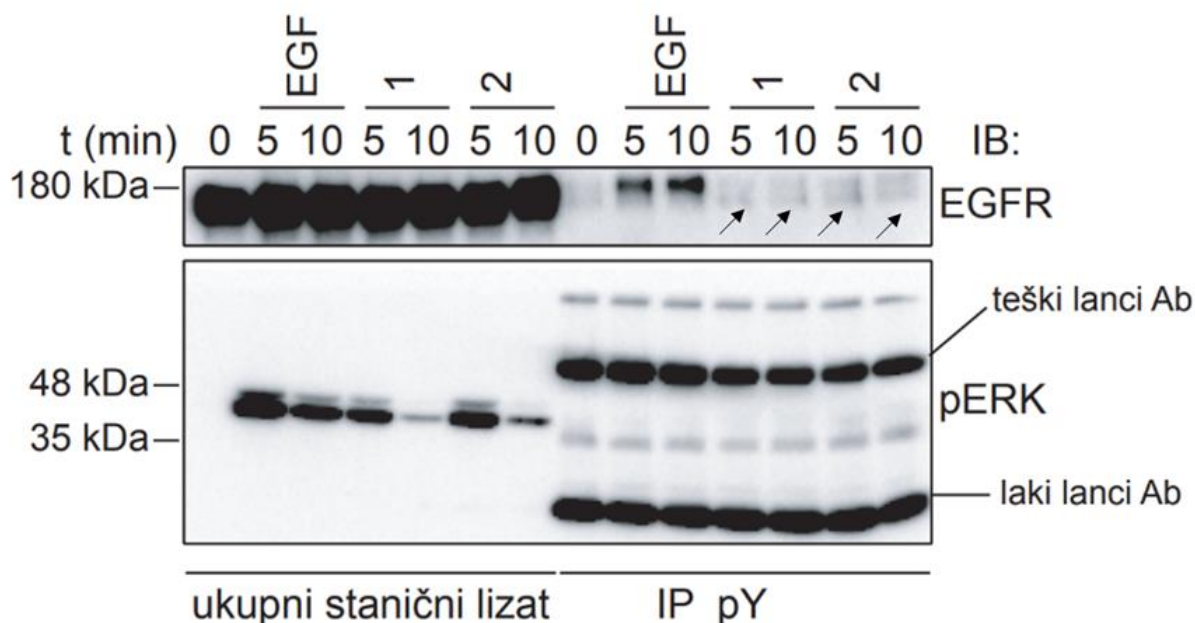
Nakon odvajanja od GST biljega prema protokolu PreScission enzima, kimerne molekule 1 i 2 korištene su za stimulaciju CHO stanica u vremenskom razmaku. CHO stanice su prethodno transfektirane konstruktima EGFRwt, EGFR I682Q i EGFR V924R te izgladnjivane. U svrhu utvrđivanja djelovanja ispitivanih liganada na staničnu signalizaciju, korištena je metoda *Western blot*. Protutijelo anti-EGFR služi za potvrdu transfekcije stanica, anti-pY za ukupnu fosforilaciju, a za fosforilaciju specifičnih tirozinskih ostataka anti-PEGFR

Y1173 i Y1068. Za utvrđivanje aktivacije nizvodnog signalnog RAS/MAPK puta upotrijebljeno je protutijelo anti-pERK. Na slici 16A prikazana je uspješna transfekcija CHO stanica te je vidljiv signal fosforilacije receptora i aktivacija nizvodnog RAS/MAPK puta EGF-om. Signal fosforilacije specifičnih tirozina izostaje prilikom stimulacije kimerama 1 i 2, dok je signal fosforilacije ERK kinaze vidljiv samo nakon 5 minuta. Ponovljenom transfekcijom i stimulacijom pod istim uvjetima potvrđeni su rezultati prvog eksperimenta (Slika 16B).



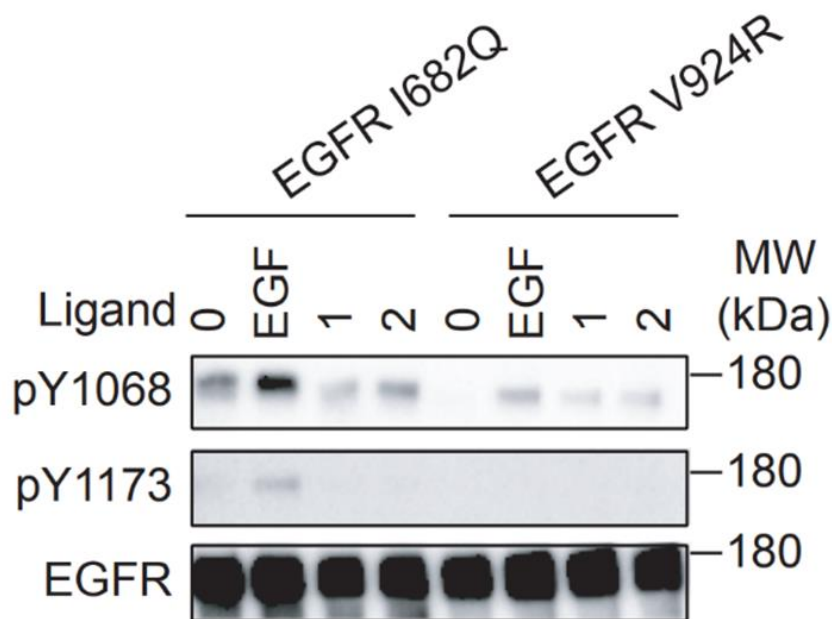
**Slika 16.** Imunoblot analiza aktivacije EGFRwt receptora i nizvodne signalizacije. Na PVDF membrani slike A, anti-EGFR protutijelom utvrđena je uspješna transfekcija CHO stanica. Vidljiv je signal fosforilacije receptora (pY1173, pY1068) stimuliranih EGF-om, nakon 5, 10, 15 i 30 minuta, dok isti nije vidljiv kod stimulacije kimerama 1 i 2. Također je vidljiv signal fosforilacije ERK kinaze nakon stimulacije EGF-om, dok je za kimeru 1 i 2 signal zabilježen samo nakon 5 minuta, a kasnije izostaje. Slika B je prikaz ponovljenog eksperimenta, te su rezultati istovjetni onima sa slike A. Slika je djelo autora.

Za ispitivanje fosforilacije na ostalim tirozinskim ostacima EGFRwt, korištena je imunoprecipitacija proteina za anti-pY. Na slici 17 utvrđen je izostanak fosforilacije receptora stimuliranih kimerama 1 i 2. Stimulacija EGF-om poslužila je kao kontrola, te je signal fosforilacije receptora zabilježen nakon 5 i 10 min.



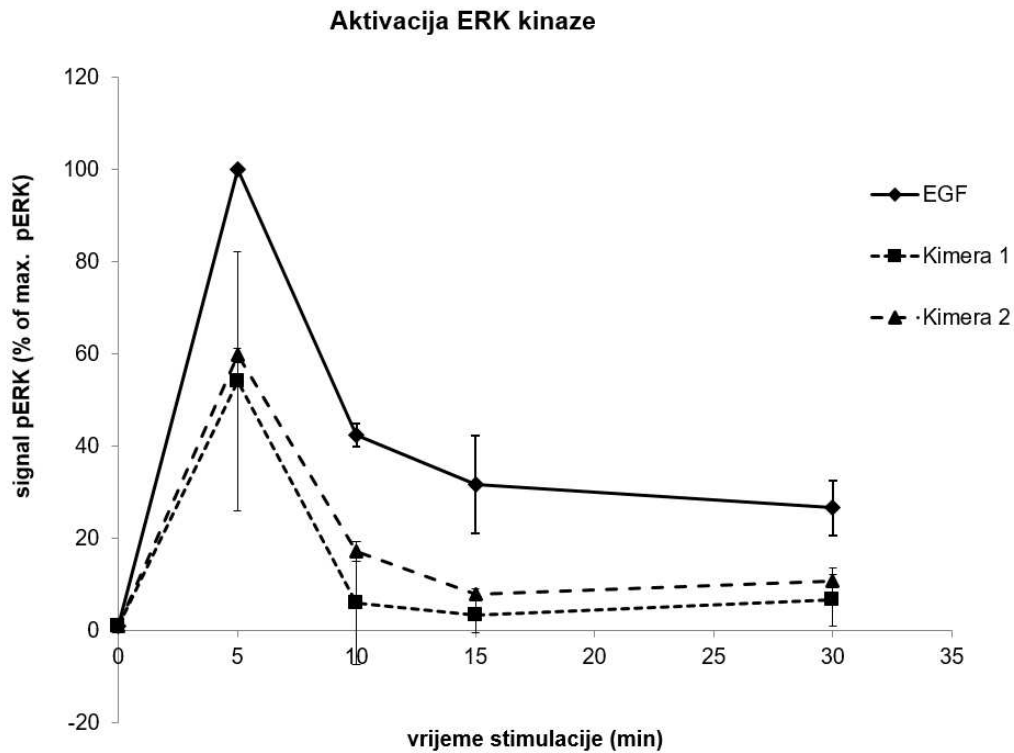
**Slika 17.** Imunoblot analiza imunoprecipitiranog EGFRwt receptora. Signal fosforilacije receptora stimuliranih EGF-om vidljiv je nakon 5 i 10 min, dok isti nije zabilježen prilikom stimulacije kimerama 1 i 2 (označeno strelicama). Zabilježeni nespecifični signali protutijela anti-pY potvrđuju da je jednaka količina protutijela korištena u svim uzorcima imunoprecipitata (IP). U ukupnom staničnom lizatu vidljiva je jednaka količina EGF receptora. Potvrđena je fosforilacija ERK kinaze prilikom stimulacije EGF-om, dok je ista zabilježena za kimere 1 i 2 nakon 5 minuta, a potom na 10 minuta signal izostaje. Slika je djelo autora.

Hibridizacijom po Westernu također je ispitano djelovanje kimera 1 i 2 na aktivaciju mutiranih oblika receptora, EGFR I682Q i EGFR V924R, u svrhu utvrđivanja potencijalnih alosteričkih promjena koje bi utjecale na aktivaciju receptora (Slika 18). Signal fosforilacije specifičnih tirozina nije zabilježen ni za jedan oblik mutirane forme receptora, osim blage fosforilacije tirozina 1068 za EGFR I682Q prilikom stimulacije EGF-om.

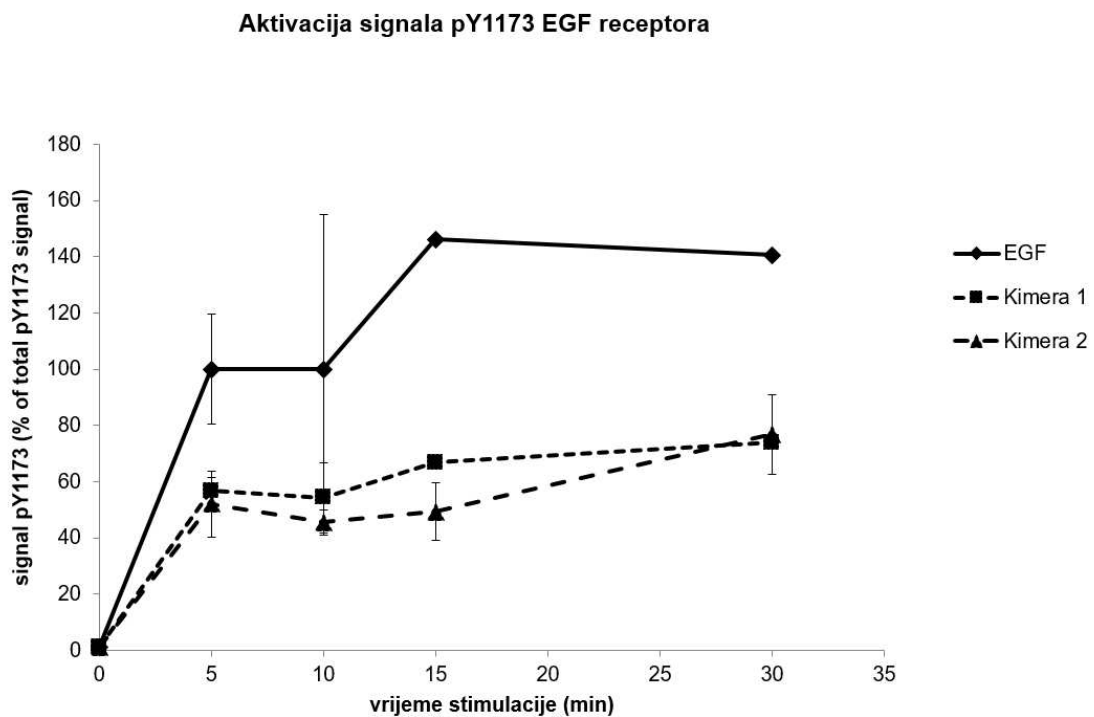


**Slika 18.** Imunoblot analiza aktivacije mutiranih oblika receptora. Na PVDF membrani anti-EGFR protutijelom utvrđena je uspješna transfekcija CHO stanica mutiranim oblicima receptora. Signal fosforilacije tirozina 1068 i 1173 nije zabilježen ni za jedan oblik mutirane forme receptora, osim blage fosforilacije tirozina 1068 za EGFR I682Q prilikom stimulacije EGF-om. Slika je djelo autora.

Kvantifikacijom navedenih signala, dobiveni podaci upotrijebljeni su za izradu grafičkih prikaza za pY1173 i pERK. Stimulacija EGF-om poslužila je kao kontrola, za koju intenzitet aktivacije receptora i nizvodnog signalnog puta nakon 5 minuta iznosi 100%. Podaci grafičkog prikaza na slici 19 ukazuju da prilikom stimulacije kimerama 1 i 2 dolazi do aktivacije ERK kinaze nakon 5 minuta, a kasnije signal izostaje. Postoji statistički značajna razlika prilikom stimulacije s EGF-om u odnosu na stimulaciju kimerom 1 ( $P < 0,001$ ), odnosno kimerom 2 ( $P < 0,002$ ). Nije bilo statistički značajne razlike prilikom usporedbe kimerama 1 i 2 ( $P = 0,153$ ). Podaci grafičkog prikaza na slici 20 ukazuju da stimulacijom EGF receptora kimerama 1 i 2, za razliku stimulacije EGF-om, nije došlo do aktivacije EGF receptora. Postoji statistički značajna razlika prilikom stimulacije s EGF-om u odnosu na stimulaciju kimerom 1 ( $P = 0,004$ ), odnosno 2 ( $P = 0,002$ ). Nije bilo statistički značajne razlike prilikom usporedbe kimerama 1 i 2 ( $P = 0,447$ ).



**Slika 19.** Grafički prikaz intenziteta signala fosforilacije ERK kinaze divljeg tipa receptora kroz vrijeme (u minutama). Vrijednosti su prikazane u obliku postotka i SD.



**Slika 20.** Grafički prikaz intenziteta signala fosforilacije specifičnog tirozina divljeg tipa receptora kroz vrijeme (u minutama). Vrijednosti su prikazane u obliku postotka i SD.

## **5. RASPRAVA**



U novije vrijeme, nastanak tumora je prepoznat kao proces koji uključuje stalne dinamične i uzajamne interakcije između malignih stanica i tumorskog mikrookoliša (TME). Oslanjanje na TME nudi priliku za terapijsku intervenciju ciljanjem pojedinih elemenata mikrookoliša ili njegovih signalnih puteva (37). EGFR je prvi receptor na površini stanice izravno povezan s nastankom tumora, poglavito zbog ključne uloge u regulaciji stanične proliferacije, preživljenja, migracije i diferencijacije (1, 36). Povezanost prekomjernog izražaja i aktivacije ErbB receptora s gorom prognozom, razvojem rezistencija na lijekove, metastatskim oblicima i nižom stopom preživljenja, potaknula je istraživanja novih terapijskih pristupa (48). Analizom sadržaja okoliša tumora, primjerice tumora pluća nemalih stanica, kolorektalnog karcinoma i glioblastoma, utvrđena je povezanost povišene razine, te heterogenog izražaja, liganada EGF receptora s agresivnijim oblicima primarnih tumora i većom stopom razvoja sekundarnih oblika, odnosno metastaza (38, 40). Stoga, sinergijsko djelovanje i heterogeni izražaj čimbenika rasta EGF receptora predstavljaju iznimno zanimljiv molekularni mehanizam rezistencije tumorskih stanica.

Cilj ovog istraživanja je producirati i ispitati djelovanje dvaju rekombinantnih molekula čimbenika rasta EGF receptora na signalizaciju u stanici, u svrhu kreiranja biološki aktivnih homogenih i heterogenih rekombinantnih molekula dimernih čimbenika rasta koje bi inhibirale aktivnost receptora. U ovom radu, pozornost je stavljena na ispitivanje djelovanja homogenih dimernih čimbenika rasta, u obliku fuzijskih proteina, na aktivaciju EGF receptora i nizvodni RAS/MAPK signalni put u CHO staničnoj liniji.

Kako bi proveli eksperiment, prvo je potrebno producirati i izolirati kimerne molekule. Postizanje uspješne produkcije rekombinantnih proteina 1 i 2 u transformiranim bakterijama *E. coli*, te povećanje topljivosti istih u svrhu izolacije proteina od interesa, zahtijevalo je optimizaciju uvjeta ekspresije i uvođenje modifikacije sadržaja pufera koji se koristio za lizu bakterija. Nije poznato kako, i u kojoj mjeri, bi sadržaj pufera za lizu bakterijskog taloga mogao utjecati na strukturu rekombinantnih proteina. U budućem istraživanju bi trebalo planirati ispitivanje pufera različitih koncentracija soli, reducirajućeg sredstva, ditiotreitola (DTT) i pH, kako bi ispitali mogućnost utjecaja na biološku aktivnost kimera, odnosno sposobnost vezanja za receptore. Uspješnost produkcije proteina određena je analizom izdvojenih uzoraka bakterijske suspenzije, prije i nakon indukcije IPTG-om, putem SDS-PAGE elektroforeze, te su producirane kimerne molekule u sljedećem koraku odvojene od GST biljega (Slike 1 i 2).

U nastavku istraživanja ispitano je djelovanje kimernih molekula 1 i 2, uz kontrolu u obliku stimulacije EGF ligandom, na aktivaciju EGF receptora i RAS/MAPK signalnog puta.

U tu svrhu, korišten je CHO stanični model i metoda hibridizacije po Westernu za prikaz rezultata. Za ispitivanje razine značajnosti razlike između skupina upotrijebljen je t-test. Stimulacijom EGF receptora kimerama 1 i 2, za razliku stimulacije EGF-om, nije zabilježena aktivacija EGF receptora (Slika 19). Nije bilo statistički značajne razlike prilikom usporedbe kimerama 1 i 2 ( $P=0,153$ ). Potvrđena je hipoteza da postoji mogućnost inhibicije aktivacije receptora kimernom molekulom s krutim povezivačem, no rezultat stimulacije kimernom molekulom s pokretljivim povezivačem nije bio u skladu s očekivanjima.

Dobiveni rezultati mogu biti posljedica kombinacije raznih čimbenika koji se odnose na duljinu i pokretljivost povezivača te na samu strukturu dimernih rekombinantnih proteina, uvjetovanu sadržajem pufera za lizu bakterijskog taloga. Unatoč tome što stimulacija receptora kimernim molekulama 1 i 2 nije dovela do fosforilacije, rezultati su pokazali aktivaciju nizvodnog RAS/MAPK signalnog puta nakon 5 minuta (Slika 20). Prema podacima, postoji statistički značajna razlika prilikom stimulacije s EGF-om u odnosu na stimulaciju kimerom 1 ( $P=0,004$ ), odnosno 2 ( $P=0,002$ ). Nije bilo statistički značajne razlike prilikom usporedbe kimerama 1 i 2 ( $P=0,447$ ). Moguće je da dimerne molekule 1 i 2 stupaju u interakciju s receptorom na membrani te uzrokuju aktivaciju RAS/MAPK signalnog puta nepoznatim mehanizmom. Osim toga, odsutstvo signala fosforilacije ERK kinaze u kasnijim vremenskim intervalima (10, 15 i 30 minuta) moglo bi se objasniti izostankom endocitoze receptora zbog biofizičkih svojstava strukture povezivača (Slika 16). Također, u svrhu utvrđivanja potencijalnih alosteričkih promjena koje bi utjecale na aktivaciju receptora, različitih od promjena nastalih prilikom aktivacije EGF-om, korišteni su mutirani oblici kinazne domene EGFR. Rezultati aktivacije mutiranih oblika EGF receptora pokazali su da rekombinantne dimerne molekule 1 i 2 ne utječu na promjenu trodimenzionalne strukture receptora (Slika 18).

Ovim radom dobiveni su preliminarni rezultati ispitivanja djelovanja kimernih molekula faktora rasta EGF receptora, povezanih povezivačima različite duljine i pokretljivosti, na staničnu signalizaciju. U budućim istraživanjima, bit će potrebno dokazati sposobnost vezanja dimernih rekombinantnih molekula za EGF receptore na membrani te ispitati njihovo djelovanje na ostale nizvodne signalne puteve i primarne stanične odgovore, uključujući proliferaciju, migraciju, diferencijaciju i apoptozu. Ako se u konačnici potvrdi vezanje ovih molekula za populaciju EGF receptora na membrani i izostanak aktivacije ostalih nizvodnih signalnih puteva, rezultati ovog istraživanja postavili bi temelje za razvoj potpuno novog modela inhibicije aktivacije EGF receptora, u osnovi novog oblika tumorske terapije. Nadalje, ovo istraživanje je pružilo temelje za daljnji razvoj potpuno nove paradigme aktivacije

membranskih tirozin kinaznih receptora, odnosno potencijalne stimulacije receptora heterodimernim rekombinantim molekulama čimbenika rasta EGF receptora, čijom bi se primjenom simulirao biološki odgovor uvjetovan heterogenim sadržajem tumorskog mikrookoliša.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. Homodimerne rekombinantne molekule 1 i 2 nemaju sposobnost aktivacije EGF receptora.
2. Homodimerne rekombinantne molekule 1 i 2 utječu na izostanak aktivacije nizvodnih signalnih puteva u stanici.
3. Homodimerne rekombinantne molekule 1 i 2 ne dovode do alosteričkih promjena receptora koje se razlikuju od promjena izazvanih EGF ligandom.
4. Postoji statistički značajna razlika signala fosforilacije receptora i ERK kinaze nizvodno od receptora stimuliranih EGF-om i kimernim molekulama 1 i 2.

## **7. LITERATURA**

1. Lemmon MA, Schlessinger J, Ferguson KM. The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6:a020768.
2. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2000;103:211-225.
3. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer.* 2001;37 Suppl 4:S3-8.
4. Friedländer E, Barok M, Szöllosi J, Vereb G. ErbB-directed immunotherapy: antibodies in current practice and promising new agents. *Immunol Lett.* 2008;116:126-40.
5. Arkhipov A, Shan Y, Das R, Endres NF, Eastwood MP, Wemmer DE i sur. Architecture and membrane interactions of the EGF receptor. *Cell.* 2013;152:557-69.
6. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2010;141:1117-34.
7. Wee P, Wang Z. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers (Basel).* 2017;9:52.
8. Roskoski R Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res.* 2014;79:34-74.
9. Lemmon MA. Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Exp Cell Res.* 2009;315:638-48.
10. Amelia T, Kartasasmita RE, Ohwada T, Tjahjono DH. Structural insight and development of EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Molecules.* 2022;27:819.
11. Thiel KW, Carpenter G. Epidermal growth factor receptor juxtamembrane region regulates allosteric tyrosine kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:19238-43.
12. Rayego-Mateos S, Rodrigues-Diez R, Morgado-Pascual JL, Valentijn F, Valdivielso JM, Goldschmeding R i sur. Role of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its ligands in kidney inflammation and damage. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:8739473.
13. Singh AB, Harris RC. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal.* 2005;17:1183-93.
14. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem.* 1979;48:193-216.
15. Singh B, Coffey RJ. From wavy hair to naked proteins: the role of transforming growth factor alpha in health and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;28:12-21.
16. Dahlhoff M, Wolf E, Schneider MR. The ABC of BTC: structural properties and biological roles of betacellulin. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;28:42-8.
17. Taylor SR, Markesbery MG, Harding PA. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) and proteolytic processing by a disintegrin and

- metalloproteinases (ADAM): a regulator of several pathways. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;28:22-30.
18. Berasain C, Avila MA. Amphiregulin. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;28:31-41.
  19. Riese DJ 2nd, Cullum RL. Epiregulin: roles in normal physiology and cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;28:49-56.
  20. Schneider MR, Yarden Y. Structure and function of epigen, the last EGFR ligand. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;28:57-61.
  21. Freed DM, Bessman NJ, Kiyatkin A, Salazar-Cavazos E, Byrne PO, Moore JO i sur. EGFR ligands differentially stabilize receptor dimers to specify signaling kinetics. *Cell.* 2017;171:683-695.e18.
  22. Wilson KJ, Gilmore JL, Foley J, Lemmon MA, Riese DJ 2nd. Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer. *Pharmacol Ther.* 2009;122:1-8.
  23. Bocharov EV, Lesovoy DM, Pavlov KV, Pustovalova YE, Bocharova OV, Arseniev AS. Alternative packing of EGFR transmembrane domain suggests that protein-lipid interactions underlie signal conduction across membrane. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1858:1254-61.
  24. Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell.* 2006;125:1137-49.
  25. Bublil EM, Yarden Y. The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19:124-34.
  26. Singh B, Carpenter G, Coffey RJ. EGF receptor ligands: recent advances. *F1000Res.* 2016;5:F1000 Faculty Rev-2270.
  27. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:127-37.
  28. Martinelli E, Morgillo F, Troiani T, Ciardiello F. Cancer resistance to therapies against the EGFR-RAS-RAF pathway: The role of MEK. *Cancer Treat Rev.* 2017;53:61-9.
  29. Dibble CC, Cantley LC. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol.* 2015;25:545-55.
  30. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012;149:274-93.
  31. Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13:195-203.



32. Mandal S, Bandyopadhyay S, Tyagi K, Roy A. Recent advances in understanding the molecular role of phosphoinositide-specific phospholipase C gamma 1 as an emerging onco-driver and novel therapeutic target in human carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2021;1876:188619.
33. Knudsen SL, Mac AS, Henriksen L, van Deurs B, Grøvdal LM. EGFR signaling patterns are regulated by its different ligands. *Growth Factors*. 2014;32:155-63.
34. Roepstorff K, Grandal MV, Henriksen L, Knudsen SL, Lerdrup M, Grøvdal L i sur. Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic*. 2009;10:1115-27.
35. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:341-54.
36. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ i sur. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell*. 2003;12:541-52.
37. Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacol Ther*. 202;221:107753.
38. Miyamoto S, Fukami T, Yagi H, Kuroki M, Yotsumoto F. Potential for molecularly targeted therapy against epidermal growth factor receptor ligands. *Anticancer Res*. 2009;29:823-30.
39. Sunaga N, Kaira K. Epireregulin as a therapeutic target in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer (Auckl)*. 2015;6:91-8.
40. Yoshida M, Shimura T, Sato M, Ebi M, Nakazawa T, Takeyama H, Joh T. A novel predictive strategy by immunohistochemical analysis of four EGFR ligands in metastatic colorectal cancer treated with anti-EGFR antibodies. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013;139:367-78.
41. Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH i sur. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*. 2002;110:775-87.
42. An Z, Aksoy O, Zheng T, Fan QW, Weiss WA. Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene*. 2018;37:1561-75.
43. Pacini L, Jenks AD, Vyse S, Wilding CP, Arthur A, Huang PH. Tackling drug resistance in EGFR exon 20 insertion mutant lung cancer. *Pharmgenomics Pers Med*. 2021;14:301-17.

44. Ooi A, Takehana T, Li X, Suzuki S, Kunitomo K, Iino H i sur. Protein overexpression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: an immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study. *Mod Pathol.* 2004;17:895-904.
45. Beytagh MC, Weiss WA. EGFR ligands dictate tumour suppression. *Nat Cell Biol.* 2022;24:1189-91.
46. Maennling AE, Tur MK, Niebert M, Klockenbring T, Zeppernick F, Gattenlöhner S i sur. Molecular targeting therapy against EGFR family in breast cancer: progress and future potentials. *Cancers (Basel).* 2019;11:1826.
47. Guo G, Gong K, Wohlfeld B, Hatanpaa KJ, Zhao D, Habib AA. Ligand-independent EGFR signaling. *Cancer Res.* 2015;75:3436-41.
48. Wang Z. ErbB Receptors and Cancer. *Methods Mol Biol.* 2017;1652:3-35.
49. Tebbutt N, Pedersen MW, Johns TG. Targeting the ERBB family in cancer: couples therapy. *Nat Rev Cancer.* 2013;13:663-73.
50. Roskoski R Jr. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2024 update. *Pharmacol Res.* 2024;200:107059.
51. Bartholomew C, Eastlake L, Dunn P, Yiannakis D. EGFR targeted therapy in lung cancer; an evolving story. *Respir Med Case Rep.* 2017;20:137-40.
52. Zubair T, Bandyopadhyay D. Small molecule EGFR inhibitors as anti-cancer agents: Discovery, mechanisms of action, and opportunities. *Int J Mol Sci.* 2023;24:2651.
53. Levantini E, Maroni G, Del Re M, Tenen DG. EGFR signaling pathway as therapeutic target in human cancers. *Semin Cancer Biol.* 2022;85:253-75.
54. Cheng Z, Cui H, Wang Y, Yang J, Lin C, Shi X i sur. The advance of the third-generation EGFR-TKI in the treatment of non-small cell lung cancer (Review). *Oncol Rep.* 2024;51:16.
55. Solassol I, Pinguet F, Quantin X. FDA- and EMA-approved tyrosine kinase inhibitors in advanced EGFR-mutated Non-Small Cell Lung Cancer: safety, tolerability, plasma concentration monitoring, and management. *Biomolecules.* 2019;9:668.
56. Harari PM, Allen GW, Bonner JA. Biology of interactions: anti-epidermal growth factor receptor agents. *J Clin Oncol.* 2007;25:4057-65.
57. Ramakrishnan MS, Eswaraiah A, Crombet T, Piedra P, Suarez G, Iyer H i sur. Nimotuzumab, a promising therapeutic monoclonal for treatment of tumors of epithelial origin. *mAbs.* 2009;1:41-8.
58. Maadi H, Soheilifar MH, Choi WS, Moshtaghian A, Wang Z. Trastuzumab Mechanism of Action; 20 Years of Research to Unravel a Dilemma. *Cancers (Basel).* 2021;13:3540.

59. Yotsumoto F, Sanui A, Fukami T, Shirota K, Horiuchi S, Tsujioka H i sur. Efficacy of ligand-based targeting for the EGF system in cancer. *Anticancer Res.* 2009;29:4879-85.
60. Baldo BA. Chimeric fusion proteins used for therapy: indications, mechanisms, and safety. *Drug Saf.* 2015;38:455-79.
61. Mansour MA, AboulMagd AM, Abbas SH, Abdel-Rahman HM, Abdel-Aziz M. Insights into fourth generation selective inhibitors of (C797S) EGFR mutation combating non-small cell lung cancer resistance: a critical review. *RSC Adv.* 2023;13:18825-53.
62. Kucinska M, Pospieszna J, Tang J, Lisiak N, Toton E, Rubis B, Murias M. The combination therapy using tyrosine kinase receptors inhibitors and repurposed drugs to target patient-derived glioblastoma stem cells. *Biomed Pharmacother.* 2024;176:116892.
63. Doleschal B, Petzer A, Rumpold H. Current concepts of anti-EGFR targeting in metastatic colorectal cancer. *Front Oncol.* 2022;12:1048166.
64. Patel DK, Menon DV, Patel DH, Dave G. Linkers: A synergistic way for the synthesis of chimeric proteins. *Protein Expr Purif.* 2022;191:106012.
65. Chen X, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65:1357-69.
66. Hnasko TS, Hnasko RM. The Western Blot. *Methods Mol Biol.* 2015;1318:87-96.

## **8. SAŽETAK**

**Ciljevi istraživanja:**

Cilj ovog istraživanja je producirati i ispitati djelovanje dvaju kimernih molekula čimbenika rasta EGF receptora na signalizaciju u stanici, u svrhu kreiranja biološki aktivnih homogenih i heterogenih rekombinantnih molekula dimernih čimbenika rasta koje bi inhibirale aktivnost receptora. U ovom radu pozornost je stavljena na ispitivanje djelovanja homogenih dimernih čimbenika rasta, u obliku fuzijskih proteina, na fosforilaciju EGF receptora i nizvodni RAS/MAPK signalni put u CHO staničnoj liniji.

**Materijali i metode:**

Transfektirane stanice CHO stanične linije stimulirane su produciranim kimernim molekulama s pomičnim, odnosno krutim, povezičaćem, te je imunoblotom analizirana fosforilacija EGF receptora i nizvodni RAS/MAPK signalni put.

**Rezultati:**

Postoji statistički značajna razlika signala fosforilacije receptora i ERK kinaze nizvodno od receptora stimuliranih EGF-om, u odnosu na kimerne molekule 1 i 2. Stimulacijom EGF receptora kimerama 1 i 2, za razliku od stimulacije monomernim čimbenikom rasta, nije zabilježena aktivacija EGF receptora. Potvrđena je hipoteza da postoji mogućnost inhibicije aktivacije receptora kimernom molekulom s krutim povezičaćem te je utvrđeno da kimerna molekula s pomičnim povezičaćem ima jednak učinak. Unatoč tome što stimulacija receptora kimernim molekulama nije dovela do fosforilacije, rezultati su pokazali aktivaciju nizvodnog RAS/MAPK signalnog puta nakon 5 minuta. Moguće je da kimerne molekule 1 i 2 stupaju u interakciju s receptorom na membrani te uzrokuju aktivaciju RAS/MAPK signalnog puta nepoznatim mehanizmom. Osim toga, odsutstvo fosforilacije ERK kinaze u kasnijim vremenskim intervalima moglo bi se objasniti izostankom endocitoze receptora zbog biofizičkih svojstava strukture povezičaća. Rezultati aktivacije mutiranih oblika EGF receptora pokazali su da rekombinantne homodimerne molekule 1 i 2 ne utječu na promjenu trodimenzionalne strukture receptora.

**Zaključci:**

Homodimerne rekombinantne molekule 1 i 2 nemaju sposobnost aktivacije EGF receptora ni utjecaj na promjenu njegove trodimenzionalne strukture. Također, utječu na izostanak aktivacije nizvodnih signalnih puteva u stanici. Ako se u konačnici potvrdi vezanje ovih molekula za populaciju EGF receptora na membrani, i izostanak aktivacije ostalih nizvodnih signalnih puteva, rezultati ovog istraživanja postavili bi temelje za razvoj potpuno novog modela inhibicije aktivacije EGF receptora, u osnovi novog oblika tumorske terapije.

## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:**

Effects of chimeric EGF receptor growth factor molecules on cell signaling

**Objectives:**

The aim is to produce two chimeric EGF receptor growth factor molecules to test their effect on cell signaling, in order to create biologically active homogeneous and heterogeneous recombinant molecules of dimeric growth factors that could potentially inhibit receptor activity. In this study, we focused on examining the effect of homogeneous dimeric growth factors, in the form of fusion proteins, on the phosphorylation of the EGF receptor and the downstream RAS/MAPK signaling pathway in the CHO cell line.

**Results:**

The transfected cells of the CHO cell line were stimulated with the produced chimeric molecules containing flexible or rigid linker, followed by immunoblot analysis of the phosphorylation of the EGF receptor and the downstream RAS/MAPK signaling pathway.

**Materials and methods:**

A statistically significant result was observed in the difference of phosphorylation signal of the receptor and ERK kinase stimulated by EGF, in relation to chimeric molecules 1 and 2. Stimulation of EGF receptors by chimeras 1 and 2, in contrast to stimulation by monomeric growth factor, did not result in activation of EGF receptors. The hypothesis that there is a possibility of inhibition of receptor activation by a chimeric molecule with rigid linker was confirmed; furthermore it was determined that a chimeric molecule with a flexible linker has the same effect. Despite the fact that receptor stimulation with chimeric molecules did not induce receptor phosphorylation, the results showed activation of the downstream RAS/MAPK signaling pathway after 5 minutes. It is possible that chimeric molecules 1 and 2 interact with the receptor on the membrane and cause the activation of the RAS/MAPK signaling pathway by an unknown mechanism. In addition, the absence of ERK kinase phosphorylation at later time intervals could be interpreted by the absence of receptor endocytosis due to the biophysical properties of the linker structure. The results of the activation of mutated forms of the EGF receptor showed that recombinant homodimeric molecules 1 and 2 do not affect the three-dimensional structure of the receptor.

**Conclusions:**

Homodimeric recombinant molecules 1 and 2 do not have the ability to activate the EGF receptor and induce downstream signaling pathways of the cell. Furthermore, they do not cause alterations in the three-dimensional structure of the receptor. If the binding of these molecules to the population of EGF receptors on the membrane, and the absence of activation of other

downstream signaling pathways is ultimately confirmed, the results of this study could lay the foundations for the development of a completely new model of inhibition of EGF receptor activation, essentially a new form of tumor treatment.