

DARTS metoda proteomike u istraživanju bioloških meta erlotiniba

Finek, Marcela

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:181195>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-02**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA
Diplomski sveučilišni studij Medicinska kemija

Marcela Finek

DARTS metoda proteomike u
istraživanju bioloških meta erlotiniba

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA
Diplomski sveučilišni studij Medicinska kemija

Marcela Finek

DARTS metoda proteomike u
istraživanju bioloških meta erlotiniba

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

Mentor rada: prof. dr. sc. Milan Mesić

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF BIOTECHNOLOGY AND DRUG DEVELOPMENT
Graduate programme Medicinal chemistry

Marcela Finek
DARTS method in the researching of
biological targets of erlotinib
Masters degree

Rijeka, 2024.

Mentor: prof. dr. sc. Milan Mesić

Diplomski rad obranjen je dana 23. rujna 2024. pred povjerenstvom:

1. doc. dr. sc. Toni Todorovski

2. prof. dr. sc. Dean Marković

3. prof. dr. sc. Milan Mesić

Rad ima 43 stranice, 14 slika, 6 tablica i 21 literaturni navod.

Sažetak

Proteomika je jedna od *omics* metoda koja istražuje funkcije, strukture i ekspresiju svih proteina u biološkom sustavu. Ključna je za razumijevanje mehanizama bolesti, a okuplja neke inovativne tehnike poput masene spektrometrije, Western blottinga i elektroforeze. DARTS metoda (eng. *Drug affinity responsive target stability*) naziv je za skup tehnika proteomike koje se koriste za istraživanje bioloških meta lijekova. Princip njezinog rada počiva na činjenici da se proteini bolje odupiru digestiji proteolitičkih enzima ukoliko je za njih vezan ligand (lijek). Posebnu ulogu ima u istraživanju nepoznatih bioloških meta malih molekula koje imaju sposobnost ciljanja specifičnih proteina važnih za reguliranje unutarstaničnih signalnih puteva. Uzorci staničnih lizata se tretiraju malom molekulom, izlažu digestiji proteaze te se potom kvalitativno i kvantitativno analiziraju. Posebna prednost DARTS-a je ta što koristi lijek u svom nativnom obliku, bez potrebe modificiranja. Ova metoda koristi se za različite vrste istraživanja, a najviše za istraživanje poznatih i nepoznatih meta lijekova, mehanizama djelovanja lijekova i mehanizama rezistencije.

U ovom radu odabrana mala molekula je erlotinib (Tarceva) čija je poznata biološka meta receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR). Erlotinib je inhibitor tirozin-kinaza te vezanjem zaustavlja proliferaciju tumorske stanice i izbjegavanje apoptoze. Uzorke za DARTS metodu, pripremili smo pomoću lizata HeLa i A431 stanica koje pretjerano izražavaju EGFR. Kao proteazni enzim kojim je provedena digestija, korišten je enzim pronaza, a proteini su razdvajani pomoću gradijentne SDS-PAGE elektroforeze, prema molekularnoj masi. Western blottingom potvrđena je specifičnost upotrebom protutijela te je povećana je osjetljivost metode što je rezultiralo boljom vizualizacijom promjene intenziteta EGFR-a za kojeg je vezan erlotinib. Potvrđeno je da je EGFR direktna meta za vezanje erlotiniba te da je njegov mehanizam rada zaustavljanje autofosforilacije i prekid signalnog puta za

proliferaciju stanice. Također su istražene i nepoznate mete erlotiniba (tzv. *off-targets*) koje pokazuju značajnu promjenu u intenzitetu u njegovoj prisutnosti, no one nisu identificirane. Zaključeno je da je DARTS višenamjenska, brza i jednostavna biofizikalna metoda, koja ne zahtjeva kemijske modifikacije istraživanog lijeka, te je korisna u brojnim aspektima istraživanja i razvoja lijekova.

Ključne riječi: DARTS, proteomika, protein, ligand, erlotinib, EGFR

Summary

Proteomics one of the *omics* methods that investigates the functions, structures and expression of all proteins in a biological system. It is important for understanding the disease mechanisms and brings together some innovative techniques such as mass spectrometry, Western blotting and electrophoresis. The DARTS method (Drug affinity responsive target stability) is the name of a set of proteomics techniques used to investigate the biological targets of drugs. The principle of its work is based on the fact that proteins better resist the digestion of proteolytic enzymes if a ligand (drug) is attached to them. It has a special role in the research of unknown targets of small molecules that have the ability to aim at specific proteins important for regulating intracellular signaling pathways. Samples of cell lysates are treated with a small molecule, subjected to protease digestion and then analyzed qualitatively and quantitatively. A special advantage of DARTS is that it uses the drug in its native form, without any modification. This method is used for different types of research, and mostly for research into known and unknown targets of drugs, the mechanisms of action of drugs, but also the mechanisms of resistance.

The small molecule chosen in this thesis is erlotinib (Tarceva), whose known biological target is the Epidermal growth factor receptor (EGFR). Erlotinib is a tyrosine-kinase inhibitor which stops the proliferation of tumor cells and the avoidance of apoptosis when bound. Samples for the DARTS method were prepared using lysates of HeLa and A431 cells that overexpress EGFR. Pronase was the protease enzyme used for digestion, and proteins were separated using gradient SDS-PAGE electrophoresis, according to molecular weight. Western blotting confirmed the specificity using antibodies and increased the sensitivity of the method, which resulted in a better visualization of the change in the intensity of EGFR, to which erlotinib

is bound. It was confirmed that EGFR is a direct target of erlotinib, but also that its mechanism of action is stopping the autophosphorylation that interrupts the signaling pathway for cell proliferation. Unknown targets of erlotinib (off-targets), that show a significant change in intensity in its presence, were also investigated, but not identified. It was concluded that DARTS is a multipurpose, fast and simple biophysical method that does not require chemical modifications of the drug and is useful in many aspects of drug research and development.

Key words: DARTS, proteomics, protein, ligand, erlotinib, EGFR

Sadržaj

1. Uvod	1
Proteomika	1
DARTS metoda.....	3
EGFR – meta protutumorskih lijekova	5
EGFR	6
Erlotinib	8
2. Cilj rada	11
3. Materijali i metode	12
Uzgajanje staničnih kultura i izrada lizata	12
Inkubacija s erlotinibom	14
Proteoliza	14
Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu.....	15
Western blotting.....	16
4. Rezultati	20
Titracija otopine pronaze	20
Titracija erlotiniba	24
DARTS metoda u istraživanju mehanizma rada erlotiniba	30
DARTS metoda u istraživanju drugih meta erlotiniba.....	34
5. Diskusija	36
Titracija otopine pronaze	36
Titracija erlotiniba	37
DARTS metoda u istraživanju direktne mete erlotiniba	38
DARTS metoda u istraživanju mehanizma rada erlotiniba	38
DARTS metoda u istraživanju drugih meta erlotiniba.....	39
6. Zaključak	40
7. Reference	41

1. Uvod

Tehnološki napredak donio je brojne pomake u znanosti te smo svjedoci eksponencijalnog ubrzanja civilizacijskog dosega u svim područjima tehnologija. Tako su sve brojnija otkrića, dijagnostički alati i strojevi te terapijski pristupi olakšali svakodnevicu u medicini i farmaciji. Osim što se lijekovi istražuju i dizajniraju puno brže i učinkovitije, ključno za tretiranje bolesti je i bolje razumijevanje mehanizma iste. Sistemska medicina interdisciplinarno je područje koje na jedno mjesto okuplja klinička istraživanja populacije, okolišne čimbenike i molekularne mehanizme na višedimenzionalnoj razini (1). Ono što posebno pridonosi razumijevanju molekularnih mehanizama na takvim razinama, jesu takozvane *omics* metode. *Omics* metodama zajednički se nazivaju sve vrste bioloških pristupa za razumijevanje gena (genomika), proteina (proteomika), peptida i raznih metabolita (metabolomika) (1).

Proteomika

Proteomika je vrsta *omics* metoda koja se bavi proučavanjem proteoma – svih proteina u nekom biološkom sustavu. Ustanovljeno je da kod ljudske vrste ima oko milijun proteina kojima se pomoću proteomike analizira funkcija, njihova međusobna interakcija, struktura i uloga u stanici (2). Postoji čak i nekoliko vrsta proteomike, uključujući proteomike ekspresije, strukture i funkcije. Proteomika ekspresije kvalitativno i kvantitativno proučava ekspresiju proteina, što je pogotovo važno za proteine specifične za neku vrstu bolesti. Ovaj pristup, primjerice, omogućava identifikaciju pretjerane ekspresije proteina ili pojavu novih specifičnih proteina kod tumora. Strukturna proteomika koristi tehnike poput nuklearne magnetne rezonance ili kristalografije kako bi se identificirala promjena u strukturi proteina. Funkcionalna proteomika bazirana je na proučavanju međusobnih

interakcija proteina. Međutim, vrlo je korisna za definiranje biološke uloge određenog proteina u signalnom putu.

Najveći izazov u proteomici predstavlja kvalitetna priprema uzoraka te separacija i izolacija proteina od interesa. Danas se ona postiže pomoću tehnika poput 1D ili 2D elektroforeze, od kojih je jedna od najzastupljenijih PAGE (eng. *Polyacrylamide gel electrophoresis*). Jedna od najčešće korištenih, kao i za ovo istraživanje, je SDS-PAGE (eng. *Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Proteini se prvo denaturiraju pomoću anionskog deterdženta (natrijeva dodecil-sulfata) koji im daje negativan naboj proporcionalan molekularnoj masi. Potom se razdvajaju po akrilamidnom gelu prema molekularnoj masi, od najveće prema najmanjoj (najmanji proteini putuju najbrže kroz akrilamidni gel). Kada elektroforeza završi, proteini u gelu se mogu obojiti, primjerice *coomassie* bojom, kako bi se vidjeli i po potrebi slikali. Ona se veže za proteine i tako omogućava da se njihove vrpce vide i golim okom (3). Za specifičnu identifikaciju proteina koriste se tehnike koje uključuju Western blotting, tekućinsku kromatografiju (LC; eng. *Liquid chromatography*) i masenu spektrometriju (MS).

Western blotting je identifikacijska metoda kojom se razdvojeni proteini prenose s gela na membranu putem električnog polja. Nitrocelulozna membrana je smještena između gela i pozitivno nabijene elektrode kako bi negativno nabijeni proteini putovali prema njoj. Membrana s proteinima se nakon toga izloži otopini koja sadrži primarno protutijelo. Sekundarno protutijelo koje na sebi ima enzim peroksidazu (najčešće HRP, eng. *Horseradish peroxidase*) i omogućava detekciju signala tijekom vizualizacije, veže se na primarno (4). Konačna detekcija se vrši korištenjem supstrata koji u interakciji s peroksidazom stvara kemiluminiscenciju koju je moguće kvantificirati detektorom.

Tekućinska kromatografija najčešće se koristi u kombinaciji s masenom spektrometrijom za otkrivanje novih, nepoznatih peptida i proteina. Kod istraživanja tumora, pokazala se kao vrlo korisna metoda za istraživanje

karcinogeneze jer daje uvid u modifikaciju proteina (2). Kod masene spektrometrije, uzorci se prvo ioniziraju ESI (eng. *electrospray ionization*) ili MALDI (eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization*) metodom. Masa peptida i proteina je potom izračunata pomoću omjera mase i naboja.

Odabirom ispravnih metoda proteomike, moguće je doći do vrlo značajnih otkrića tijekom dizajniranja lijekova. Korisne su, primjerice, za identifikaciju ključnih bioloških markera neke bolesti, istraživanje mehanizama bolesti, ali i mehanizama rezistencije na lijek. Također je moguće potvrditi specifičnost vezanja lijeka za protein, stabilnost vezanja te predvidjeti tijek bolesti (5).

DARTS metoda

Inovativan pristup istraživanju lijekova 2009. godine je uveo dr. Daniel A. Lomenick i nazvao ga DARTS metodom (eng. *Drug affinity responsive target stability*). Naizgled se čini kao vrlo kompleksna, no zapravo je brza, jednostavna i izravna metoda za identifikaciju bioloških meta malih molekula. Male molekule su i dalje prisutne u liječenju skoro svih bolesti i stanja. Uz imunoterapiju, one su danas ključne u liječenju tumora s obzirom na njihovo svojstvo ciljanja unutarstaničnih signalnih puteva za regulaciju metabolizma, proliferacije i metastaziranja tumorskih stanica (6). Moderan pristup u otkrivanju i razvoju novih lijekova, temelji se na poznavanju biološke mete lijeka. Identifikacija biološke mete često koristi kemijski označene male molekule te je pristup vrlo ograničavajući jer zahtijeva modifikaciju lijeka, čime se gubi njegova specifičnost vezanja i afinitet (7). Kod DARTS metode, molekula lijeka koristi se u svom nativnom obliku te ne zahtijeva niti jednu vrstu modifikacije, već se oslanja na afinitet vezanja za protein. Temelj ove metode je činjenica da su proteini termodinamički stabilniji kada je na njih vezan ligand te se na taj način odupiru digestiji proteolitičkih enzima.

DARTS započinje izradom lizata, najbolje od onih stanica koje imaju pojačanu ekspresiju proteina od interesa. Stanični lizati rade se kako bi se poremetila struktura stanične membrane i kako bi pronaza mogla doprijeti do transmembranskih, ali i unutarstaničnih proteina. Prije inkubacije s pronazom, stanični lizati se inkubiraju s malom molekulom oko sat vremena kako bi se osiguralo vezanje za ciljne proteine. Za svaki DARTS potrebno je optimizirati koncentracije male molekule kao i omjer dodane pronaze prema ukupnoj količini proteina. Ako se ne zna kakav je afinitet vezanja lijeka i proteina (najčešće nepoznatog), obično se kao relevantna vrijednost uzima pola maksimalne efektivne koncentracije (EC_{50}) male molekule. Lomenick i njegovi suradnici predlažu da se koristi koncentracija male molekule koja je barem 10 puta veća od EC_{50} (8). Vrlo je važno dobro odrediti dovoljnu koncentraciju lijeka kako bi se dobio zadovoljavajući efekt zaštite proteina. S druge strane, pretjerano izlaganje lijeku bi dovelo do interakcija s drugim proteinima koje se ne događaju u normalnom terapijskom prizoru kod korištenja lijeka. Također, idealna temperatura za izvođenje DARTS-a je sobna ($25^{\circ}C$) ili maksimalno tjelesna temperatura ($37^{\circ}C$). Nakon male molekule, slijedi inkubacija proteolitičkim enzimom. U DARTS-u se koristi mnogo vrsta proteolitičkih enzima, a najčešće su to pronaza, termolizin i subtilizin. Pronaza je mješavina enzima izoliranih iz bakterije *Streptomyces griseus*. Ona je najčešće korištena proteaza jer vrši digestiju smotanih i nesmotanih proteina. Subtilizin je, kao i pronaza, nespecifičan enzim, a izoliran je iz vrste *Bacillus licheniformis*. S druge strane, termolizin, izoliran iz bakterije *Geobacillus stearothermophilus*, vrsta je pronaze koja se koristi isključivo za nesmotane proteine (8). Ovisno o jačini proteolitičkog enzima, vrijeme inkubacije bi se trebalo optimizirati kako bi efekt bio vidljiv. Digestija se zaustavlja dodavanjem koncentrirane otopine inhibitora proteaza te nakon ovog koraka priprema uzoraka za DARTS je gotova. Slijede metode proteomike za razdvajanje i identifikaciju proteina. Prvo se radi SDS-PAGE kako bi se proteini razdvojili na osnovu molekularne mase. Preporučeno je korištenje 4%-12% gradijentnog gela, uzimajući u obzir da u većini slučajeva nije poznata meta lijeka. Potom

slijedi Western blotting pomoću kojega se povećava osjetljivost metode te su proteini lakše identificirani. Nakon Western blottinga može se raditi daljnja analiza pomoću neke od metoda proteomike poput masene spektrometrije, pogotovo za nepoznate uzorke. Naravno, DARTS metoda nije limitirana nabrojenim tehnikama te Lomenick predlaže da svaki istraživač odabere metode proteomike za koje smatra da bi bile najpovoljnije za pojedino istraživanje (8).

DARTS metoda u istraživanju lijekova nije korisna samo za identifikaciju direktne biološke mete male molekule. Ona se uvelike koristi kako bi se potvrdio afinitet vezanja male molekule i proteina, ali i za otkrivanje mehanizma rada lijeka. Pogotovo kod tumora, signalni putevi za preživljavanje stanice i izbjegavanje apoptoze vrlo su kompleksni. Kod dizajniranja lijeka, vrlo je važno što bolje inhibirati prijenos signala kako tumorska stanica, nekom vrstom mutacije, ne bi stvorila rezistenciju. DARTS je tako koristan i u istraživanju mehanizama rezistencije koji su dosad bili velika nepoznanica (9). Njome se također, uz poznate mete lijekova, mogu identificirati i nepoznate mete (takozvane *off-targets*) koje, vezanjem lijeka, utječu na funkciju ili regulaciju signalnog puta.

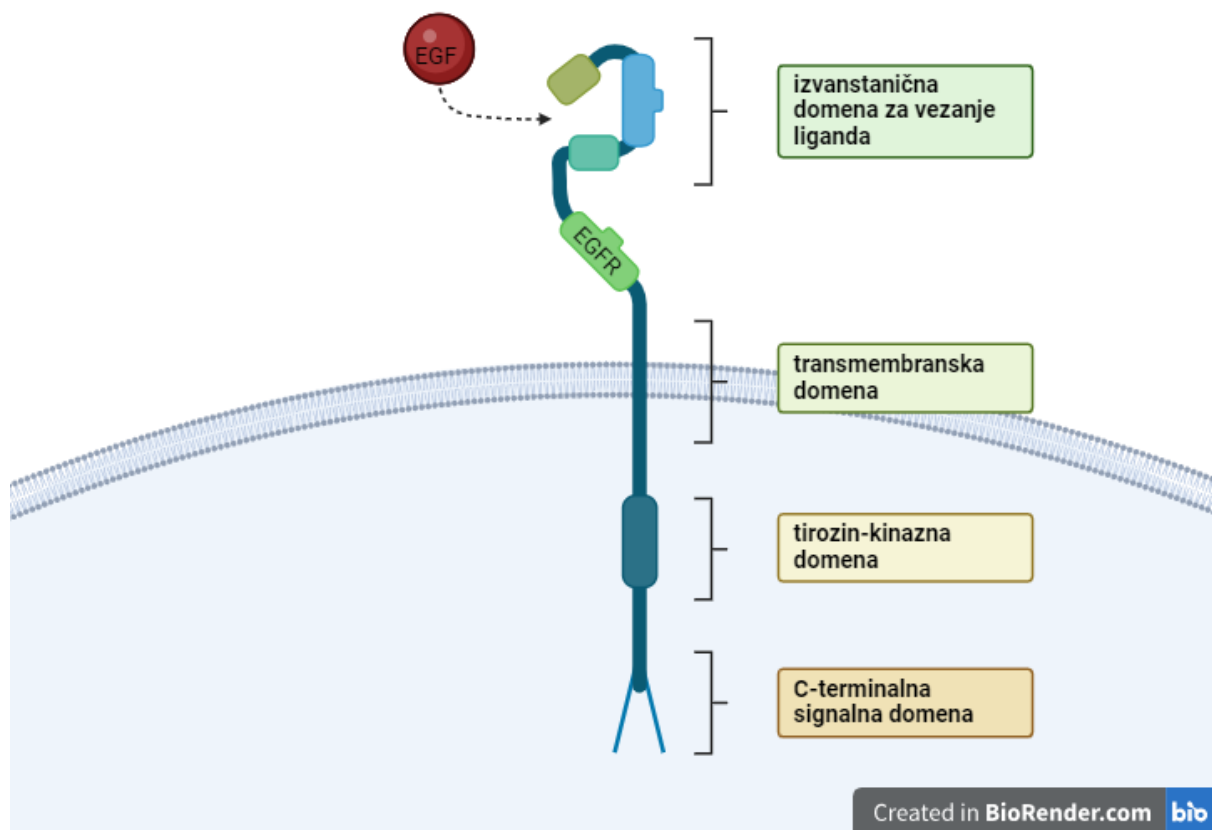
EGFR – meta protutumorskih lijekova

Vrlo kompleksna biologija tumora zadaje velike izazove u razvijanju lijekova. Njihovi višestruki mehanizmi prilagodbe i rezistencije obično su odgovorni za smanjenu učinkovitost brojnih terapijskih pristupa, a njihova što ranija dijagnostika je ključna za izbjegavanje komplikacija bolesti te preživljavanje pacijenta (10). Kod dizajniranja protutumorskih lijekova, glavni fokus su metabolički procesi i proteini koji utječu na rast i proliferaciju tumorske stanice (11). Jedan od njih je receptor epidermalnog faktora rasta (eng. *Epidermal growth factor receptor*; EGFR), koji je pretjerano izražen kod tumora nemalih stanica pluća (eng. *Non-small cell lung cancer*, NSCLC) i drugih. On ima važnu ulogu u proliferaciji i

metastaziranju tumorske stanice, što ga čini idealnim kandidatom za ciljanu terapiju.

EGFR

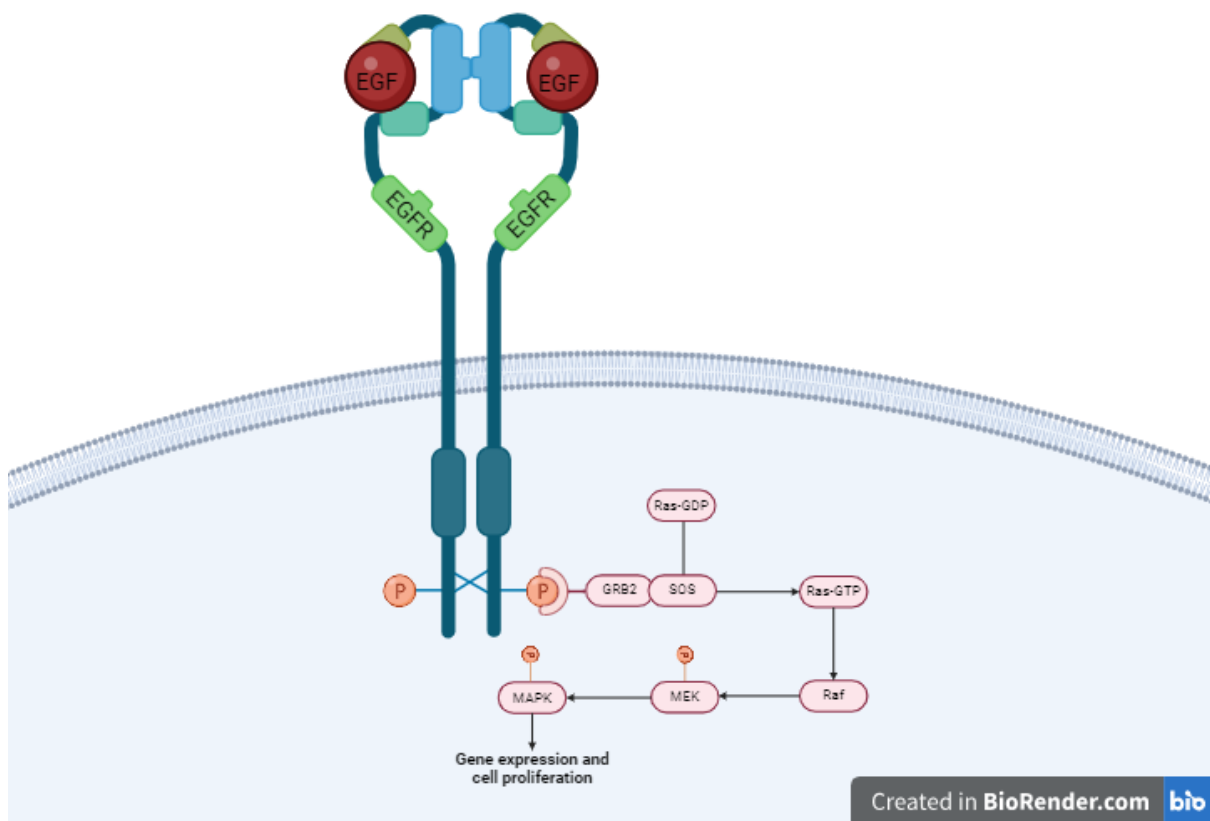
EGFR (ErbB-1 ili HER-1) je transmembranski glikoprotein koji je član porodice receptora tirozin-kinaza ErbB/HER. Njegovu strukturu čine četiri domene: izvanstanična domena za vezanje liganda, transmembranska domena, tirozin-kinazna domena u citoplazmi te C-terminalna signalna domena (11) (Slika 1.).



Slika 1. Četiri osnovne domene EGFR-a. EGFR je prikazan kao monomer sa slobodnim veznim mjestom za EGF. Slika je kreirana pomoću [BioRender.com](https://www.biorender.com), 08/2024.

Nakon što se veže ligand (npr. EGF), monomerni EGFR stvara homodimer s još jednim EGFR-om ili heterodimer s drugim receptorom iz porodice ErbB/HER. Na taj način pokreće se autofosforilacija tirozina na krajevima C-

terminalne signalne domene. Fosforilirani dijelovi služe za vezanje adaptorskih proteina (npr. GRB2), citoplazmatskih enzima ili faktora, koji potom aktiviraju RAS-RAF-MEK-MAPK signalni put. Aktivacijom ovog signalnog puta, reguliraju se proto-onkogeni, odnosno geni uključeni u normalni rast i razvoj stanice te inhibiciju apoptoze. Njihova povećana ekspresija ili mutacija, može dovesti do stvaranja onkogeni – gena zaslužnih za stvaranje tumora (12).

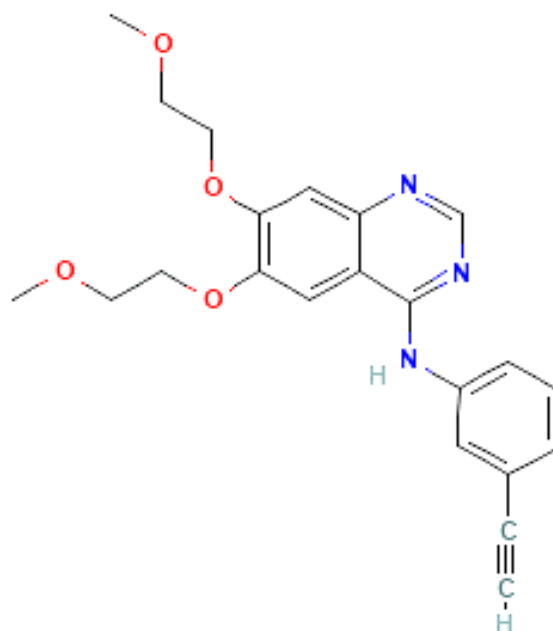


Slika 2. Aktivacija EGFR-a dovodi do autofosforilacije i regulacije signalnih puteva za proliferaciju stanice. EGFR je prikazan kao homodimer vezan s dva liganda (EGF-a). EGFR je aktiviran te je autofosforilacijom omogućeno pokretanje RAS-RAF-MEK-MAPK signalnog puta za proliferaciju stanice. Slika je kreirana pomoću [BioRender.com](https://www.biorender.com), 08/2024.

Aktivacija EGFR-a događa se u tirozin-kinaznoj domeni, gdje postoji DFG motiv koji omogućuje vezanje ATP-a. U pacijenata oboljelih od NSCLC-a javljaju se somatske mutacije upravo na tom dijelu receptora (u većini slučajeva delecije u egzonu 19 i substitucije L858R u egzonu 21) (11). Upravo zbog toga, jedne od terapijskih strategija za liječenje tumora jesu inhibitori tirozin kinaze. Postoje tri generacije inhibitora tirozin kinaza, a prvu generaciju čine erlotinib i gefitinib. Slijede afatinib i dacomitinib u drugoj i osimertinib i rociletinib u trećoj generaciji (13).

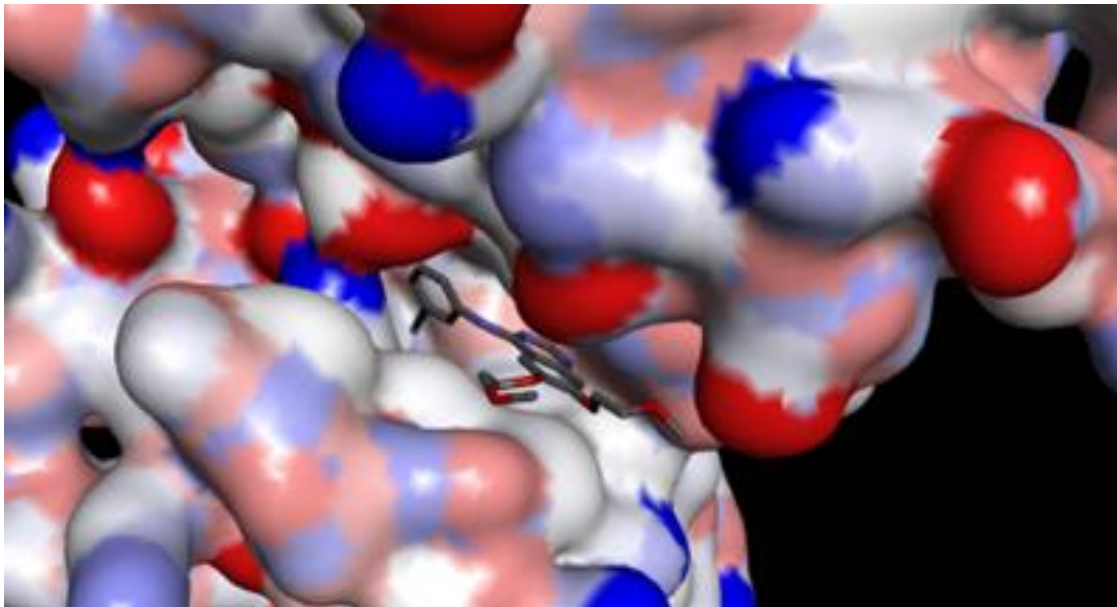
Erlotinib

Erlotinib je odobren 2004. godine od strane FDA te 2005. godine od strane EMA-e za liječenje naprednog NSLCL-a i karcinoma gušterače. Izrazito je efektivan u produljenju postotka preživljavanja i poboljšanju kvalitete života minimiziranjem progresije bolesti za razliku od kemoterapeutika (14). Po svojoj je strukturi kvinazolin (naftalen s dušikovim atomima umjesto ugljikovih na 1. i 3. mjestu), koji se reverzibilno veže za ATP-vezno mjesto EGFR-a kao kompetitivni inhibitor, stvarajući vodikove veze s aminokiselinama koje se nalaze u tirozin-kinaznoj domeni.



Slika 3. Struktura erlotiniba. Erlotinib je sačinjen od naftalenskog prstena s dušikovim atomima na 1. i 3. mjestu. Ima jednu 3-etinilfenil amino-skupinu vezanu na 4. mjestu te dvije 2-metoksietoksi skupine na 6. i 7. mjestu. Slika je preuzeta s internetske stranice Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (15).

Vežanjem erlotiniba za tirozin-kinaznu domenu EGFR-a, blokiraju se signalni putevi koji reguliraju rast i proliferaciju stanice te izbjegavanje apoptoze.



Slika 4. Vežanje erlotiniba za aktivno mjesto tirozin-kinazne domene EGFR-a. Slika je generirana korištenjem kristalografskih podataka 1M17 iz PDB baze i alatom Discovery Studio Vizualizer.

Na farmaceutskom tržištu, erlotinib je dostupan u obliku hidroklorida pod nazivom Tarceva. Uzima se oralno, a prije administracije lijeka, pacijentu je potrebno učiniti testiranje na mutacije EGFR-a (16). Naime, bez obzira na izvrstan klinički odgovor u početku administracije erlotiniba, nakon nekog vremena javljala bi se rezistencija. Zbog toga su se, nakon erlotiniba,

pojavile još dvije generacije inhibitora tirozin-kinaza, a danas se oni kombiniraju s drugim lijekovima (npr. monoklonalnim antitijelima) i terapijskim pristupima (npr. kemoterapijom ili radioterapijom) kako bi se maksimalno poboljšala remisija bolesti (17).

2. Cilj rada

Primarni fokus ovog rada je sama DARTS metoda te istraživanje mogućnosti koje nudi u razvoju lijekova. Erlotinib je uzet kao primjer lijeka za kojeg se istražuje direktna biološka meta, iako je ona već poznata. Cilj je pokazati da je ovu metodu moguće primijeniti i za lijekove za koje biološke mete i mehanizam djelovanja nisu potpuno poznati. Također je ispitana jednostavnost same metode te uvjeti koji su potrebni kako bi se dobili željeni rezultati s obzirom da metoda ne zahtjeva modifikaciju lijeka. Za potvrdu već poznatog identiteta EGFR-a, cilj je koristiti EGFR-specifična protutijela, isključivo zbog pojednostavljivanja eksperimenta. Alternativna opcija za identifikaciju je LC-MS ili druga kombinacija tehnika. Kada se potvrdi meta erlotiniba, ispituje se je li DARTS metoda pogodna za ispitivanje mehanizma lijeka – inhibiciju autofosforilacije koja prekida signalni put za proliferaciju stanice. Nadalje, u ovom radu se DARTS metoda koristi i za istraživanje *off-target* proteina za koje je moguća daljnja identifikacija te definiranje njihove uloge u biološkim putevima stanice.

3. Materijali i metode

Uzgajanje staničnih kultura i izrada lizata

Za potrebe ovog istraživanja, uzgajane su dvije vrste staničnih kultura, A431 stanice epidermoidnog karcinoma (American Type Culture Collection, ATCC) i stanice raka grlića maternice, HeLa stanice (American Type Culture Collection, ATCC). Obje stanične kulture uzgajane su i umnožene u bocama za uzgoj stanica (T-75; SARSTEDT AG & Co. KG, Njemačka), na temperaturi od 37°C, u vlažnoj atmosferi i 5% CO₂, u inkubatoru za stanice (inkubator EC 160; Nüve, Turska). Kao hranjiva podloga korišten je kompletirani medij koji sadržava Dulbeccov modificirani Eagle medij (DMEM, eng. Dulbecco's Modified Eagle Medium; 4.5 g/L glukoza, L-glutamin, 25 mM HEPES, 3.7 g/L NaHCO₃; Sigma – Aldrich, SAD), 10% fetalni goveđi serum (FBS, eng. Fetal bovine serum; Sigma – Aldrich, SAD), 1% Penicilin/Streptomycin (PAN – Biotech, Njemačka) i L-glutamin (Sigma – Aldrich, SAD). Kompletni medij je nakon pripreme filtriran te se čuvao na +4°C. Stanice su uzgajane do 80% konfluentnosti. Kod HeLa stanica, konfluentnost od 80% postizala se unutar 3 dana. A431 stanicama trebalo je oko 5 dana kako bi postigle 80% konfluencije, uz mijenjanje kompletnog medija nakon 3 dana.

Slijedi pasažiranje stanica. Digestor, u kojemu se izvodi pasaža stanica, prije svake pasaže je ozračen UV zrakama, očišćen incidinom, 70% izopropanolom (Gram-Mol d.o.o., Hrvatska) i 10% etanolom (Gram-Mol d.o.o., Hrvatska). Iz boce za uzgoj stanica izvučen je sav medij pomoću serološke pipete (SARSTEDT AG & Co. KG, Njemačka) te je dno boce isprano pomoću Dulbeccove fiziološke otopine puferirane fosfatom (DPBS, eng. Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline; PAN-Biotech, Njemačka). Kako bi se adherentne stanice odvojile s dna boce, korišteno je 1-2 mL tripsina (Trypsin/EDTA; PAN – Biotech, Njemačka) koji odvaja kolagen od staničnih proteina zaslužnih za adherenciju. Tripsin je nekoliko puta ispran pomoću

10 mL kompletnog medija. Na kraju je u boci za uzgajanje ostavljeno oko 1 mL suspenzije stanica u koje je dodano 9 mL novog kompletnog medija. Boca za uzgoj stanica odložena je u inkubator kako bi se stanice ponovno umnožile do 80% konfluentnosti. Ostalih 9 mL suspenzije stanica preneseno je u reakcijsku (falkon) tubu od 15 mL (SARSTEDT AG & Co. KG, Njemačka).

Izrada staničnih lizata započinje centrifugiranjem falkonice sa suspenzijom stanica, 5 minuta, na 4°C i 1500 rpm (Eppendorf centrifuga 5920R; Njemačka). Stanični pelet je potom otopljen u DPBS-u te je centrifuga ponovljena. Novi stanični pelet je otopljen u mješavini DPBS-a i otopine koktela inhibitora proteaza (cOmplete, EDTA free; Roche, Njemačka; 1 tbl u 1.5 mL ultračiste vode) u omjeru 6:1. Uslijedilo je mehaničko liziranje stanica. Uzorci su nekoliko puta, u kratkom vremenskom roku, smrzavani pomoću tekućeg dušika i otapani na sobnoj temperaturi. Time se postizalo razaranje staničnih struktura i oslobađanje međustaničnih i unutarstaničnih proteina. Kako bi se iz lizata maknuo stanični debris, uzorci su centrifugirani 20 minuta na 4°C i 1500 rpm pomoću stolne centrifuge (Eppendorf centrifuga 5427R; Njemačka). Supernatant koji sadržava pročišćeni stanični lizat, prebačen je u novu reakcijsku tubu od 2 mL (Greiner-bio-one, Njemačka) te čuvan u zamrzivaču na temperaturi od -20°C. Alternativno, isprobana je i precipitacija proteina u acetonu kako bi se uzorci pročistili. U otopinu staničnog lizata dodan je hladni aceton (Gram-Mol d.o.o., Hrvatska) u volumenu koji je pet puta veći od volumena lizata te je tako čuvan u zamrzivaču na -20°C preko noći.

Napravljeni lizati stanica kvantificirani su pomoću spektrofotometra (BioDrop μ Lite+ Microvolume Spectrophotometer, SAD). Duljina puta iznosila je 0.5 mm (μ Lite 0.5 mm), a za uzorak slijepe probe korištena je mješavina DPBS-a i otopina koktela inhibitora proteaza, u kojoj je otopljen stanični pelet. Maksimalni volumen, korišten za mjerenje koncentracije, iznosio je 8 μ L, a postizane koncentracije proteina iznosile su 1.5 – 2 μ g/ μ L. Alternativno, ako su lizati precipitirani u acetonu, prije kvantifikacije su

centrifugirani 20 minuta, na 4°C i maksimalnoj brzini (Eppendorf centrifuga 5427R; Njemačka), a pelet je otopljen u puferu za kvantifikaciju #2. Pufer za kvantifikaciju #2 izrađen je pomoću 0.5M Tris baze (Sigma – Aldrich, SAD) i ultračiste vode te mu je pH namješten na 6.8. Potom je u pufer dodan 10%-tni natrijev dodecil-sulfat (eng. Sodium dodecyl sulfate, SDS; Sigma – Aldrich, SAD) i glicerol (Kemika, Hrvatska). Tako napravljen pufer za kvantifikaciju #2 alikvotiran je i čuvan u zamrzivaču na -20°C.

Inkubacija s erlotinibom

Nakon što je određena koncentracija proteina, stanični lizat je podijeljen u reakcijske tube od 2 mL, tako da svaki uzorak sadržava 25-30 µg proteina. Erlotinib (Erlotinib hidroklorid, 97%; PharmaBlock, Kina) je otopljen u DPBS-u do koncentracije 10 mM, alikvotiran te čuvan na -20°C. Uzorci su inkubirani s erlotinibom različitih koncentracija (0.2 mM – 25 mM), u vremenskom periodu od jednog sata na sobnoj temperaturi.

Proteoliza

Otopina pronaze pripremljena je pomoću Pronaze E (4000 U/mg; MedChemExpress, SAD) i ultračiste vode do koncentracije 10 mg/mL te je čuvana u alikvotima na -20°C. Svaki je alikvot korišten samo jednom, bez ponovnog smrzavanja i odmrzavanja. Otopina pronaze je prema potrebi razrjeđivana pomoću DPBS-a te dodana u uzorke u omjerima od 1:25 (1µg pronaze na svakih 25µg proteina) do 1:400 (1µg pronaze na svakih 100µg proteina). Uzorci su inkubirani s pronazom od 30 minuta do 90 minuta na 25°C. Rad pronaze zaustavljen je 20x otopinom koktela inhibitora proteaza (cOmplete, EDTA free; Roche, Njemačka; 1 tbl u 0.5 mL ultračiste vode).

Ovim korakom završena je priprema uzoraka za DARTS metodu. Kako bi se povećala čistoća uzoraka, rađena je već spomenuta precipitacija u acetonu preko noći.

Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu

Metoda korištena za razdvajanje proteina je denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE, eng. *Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Za nju je korišten modul za elektroforezu (Mini-PROTEAN 3 Cell; Bio-Rad, SAD). Izrađen je donji (eng. *separating*) gradijentni gel, gustoće 4 – 12% te gornji (eng. *stacking*) gel gustoće 4%.

Za pripremu donjih gelova korištena je ultračista voda, 30%-tna otopina akrilamida (Sigma – Aldrich, SAD) i bisakrilamida (Sigma – Aldrich, SAD), 10%-tna otopina SDS-a i pufer za donji gel. Pufer za donji gel pripremljen je pomoću Tris baze do koncentracije 1.5 M te je pH namješten na 8.8. Gelovi gustoća od 4% i 12% pripremljeni su u odvojenim staklenim čašama i ostavljeni da se miješaju na magnetnoj miješalici dok ne dosegnu sobnu temperaturu. U svaki je gel potom dodano 60 µL 10%-tnog amonijeva persulfata (APS, eng. *ammonium persulfate*; ≥98 %, Carl Roth, Njemačka) i 10 µL tetrametiletilendiamina (TEMED, eng. *Tetramethylethylenediamine*; Carl Roth, Njemačka). Pomoću serološke pipete, uvučeno je 5 mL gela gustoće 4% pa 5 mL gela gustoće 12%. Potom je brzim potezom uvučen mjehurić zraka kako bi se gelovi pomiješali unutar serološkog tipsa, imitirajući gradijentnu pumpu. Približno je 7 mL gela, laganim potezanjem s lijeve na desnu stranu, ispušteno između stakalaca debljine 1.5 mm te nadopunjeno izopropanolom. Gel je ostavljen na sobnoj temperaturi kako bi se polimerizirao.

Za pripremu gornjeg gela korištena je ultračista voda, 30%-tna otopina akrilamida i bisakrilamida, 10%-tna otopina SDS-a i pufer za gornji gel. Pufer za gornji gel pripremljen je pomoću Tris baze do koncentracije 0.5 M te je pH namješten na 6.8. Nakon što je otopina dosegla sobnu temperaturu, a donji gel je u potpunosti polimeriziran, dodano je 60 µL 10%-tnog APS-a i 15 µL TEMED-a. Izopropanol je ispran ultračistom vodom

i gornji gel je uliven do vrha stakalca. Stavljen je češalj za izradu 10 jažica te je tako složen gel ostavljen preko noći u frižideru na +4°C potopljen u puferu za elektroforezu.

Uzorci su izvađeni iz zamrzivača te su centrifugirani na 4°C, 20 minuta i na maksimalnoj brzini centrifuge. Aceton je pomoću pipete izvađen iz uzoraka, a pelet je otopljen u DPBS-u i puferu za nanošenje uzoraka u omjeru 2:1. Pufer za nanošenje uzoraka napravljen je pomoću 78% (v/v) Laemmli pufera za uzorke (Bio-Rad, SAD), 5% (v/v) 2-merkaptoetanol (Sigma – Aldrich, SAD) te 17% (v/v) glicerola (Kemika, Hrvatska). Prije nanošenja na gel, uzorci su inkubirani na 95°C 5 minuta u termobloku (Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka).

Za pokretanje elektroforeze potreban je 10x pufer za elektroforezu koji je napravljen pomoću Tris baze, SDS-a i glicina (Sigma – Aldrich, SAD) te mu je pH namješten na 8.3. Za svaku elektroforezu je od 10x pufera za elektroforezu pripravljen 1x pufer za elektroforezu. Nakon što je gel postavljen u modul za elektroforezu te uronjen u pufer za elektroforezu, izvađen je češalj te su jažice dobro isprane. Potom su nanoseni su uzorci i 3 – 5 μ L unaprijed obojanog proteinskog markera (10-190 kDa; MedChemExpress, SAD). Elektroforeza je pokrenuta pod uvjetima od 80 V dok uzorci nisu prešli iz gornjeg gela u donji, a potom je pojačana na 150 V dok uzorci nisu došli do kraja donjeg gela.

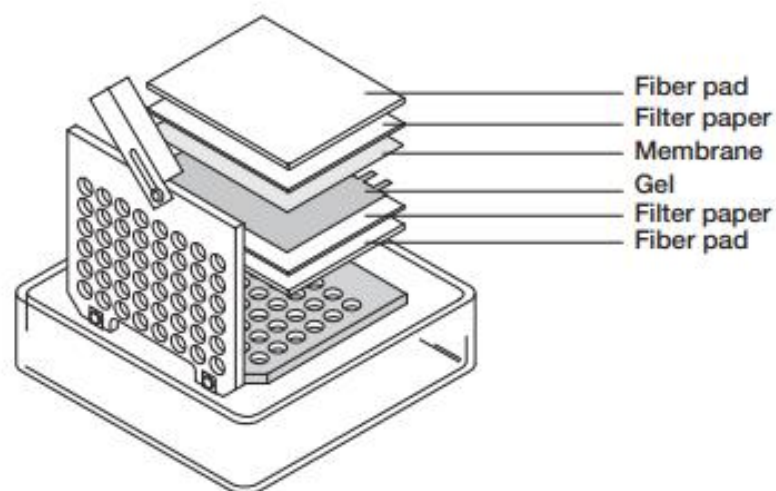
Po završetku elektroforeze, oni gelovi koji nisu namijenjeni za Western blotting, obojeni su po 15 minuta InstantBlue Comassie bojom (ab119211; Abcam, UK) uz lagano miješanje. Ispiranje gela rađeno je pomoću destilirane vode, tri puta po 10 minuta.

Western blotting

Kako bi se izdvojio te precizno identificirao EGFR, korištena je metoda Western blottinga. Kao standard korišten je β -aktin te je membrana izrezana na dva dijela, kako bi se svaki dio inkubirao sa zasebnim

primarnim i sekundarnim protutijelima. Prije prijenosa proteina na membranu, bilo je potrebno izraditi pufer za prijenos te njime natopiti cijeli modul za prijenos i ohladiti na 4°C. Pufer za prijenos napravljen je od 25 mM Tris baze, 192 mM glicina, 20% (v/v) metanola i ultračiste vode.

Po završetku elektroforeze, gel je izvađen iz modula za elektroforezu te je odstranjen gornji gel. Membrana (Immun-Blot LF PVDF membrana; Bio-Rad, SAD) je aktivirana pomoću metanola i isprana pomoću pufera za prijenos. Filter papiri (Thin Blot Paper; Bio-Rad, SAD), spužvice, aktivirana membrana i gel su po principu „sendviča“ (Slika 5.) složeni u modul za prijenos (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell; Bio-Rad, SAD). Ohlađenim puferom za prijenos cijeli modul je potopljen te je stavljena i jedinica za hlađenje kako bi se cijeli prijenos događao na što nižoj temperaturi. Dodan je i magnet, koji je omogućavao homogeniziranje temperature unutar modula. Prijenos je pokrenut pod uvjetima od 300 mA 1 sat i 30 minuta te dodatnih 20 minuta na 400 mA. Po završetku prijenosa, membrana je obojena pomoću 0.1% (w/v) Ponceau S boje (Thermo Fisher Scientific, SAD) 5 minuta uz lagano miješanje. Ispiranje je rađeno pomoću pufera za prijenos 3 puta po 10 minuta, također uz lagano miješanje.



Slika 5. Princip „sendviča“ za ispravno slaganje modula za prijenos proteina na membranu. Slika je preuzeta iz brošure modula za prijenos.

Blokiranje membrane odvijalo se u 4% otopini bezmasnog mlijeka u prahu (Dukat, Hrvatska). Mlijeko u prahu otopljeno je u Tris-puferiranoj fiziološkoj otopini pomiješanoj s polisorbatom 20 (TBST, eng. *Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20*). TBST sadržava 50 mM Tris bazu, 150 mM natrijev klorid (NaCl; Carl Roth, Njemačka), 0.1% Tween-20 (Sigma – Aldrich, SAD) deterdžent i ultračistu vodu te mu je pH namješten na 7.5. Membrane su inkubirane u ohlađenoj otopini za blokiranje 1 sat na sobnoj temperaturi te uz lagano miješanje.

Nakon blokiranja, polovica membrane na kojoj se nalazi EGFR je prebačena u zasebnu posudicu te inkubirana na 4°C i preko noći EGFR zečjim monoklonalnim primarnim protutijelom (EGFR XP Rabbit mAb #4267; Cell Signalling Technology, SAD). Druga polovica membrane također je inkubirana na 4°C preko noći, no s β-aktin mišjim monoklonalnim primarnim protutijelom (Kat. br. A3854; Sigma-Aldrich, SAD). Nakon inkubiranja primarnim protutijelom, svaka polovica membrane isprana je 4 puta po 15 minuta u TBST-u.

Polovica membrane na kojoj se nalazi EGFR je inkubirana kožjim HRP vezanim protutijelom koje je usmjereno protiv zečjih IgG (Kat. br. HY-P8001; MedChemExpress, SAD) 1 sat na sobnoj temperaturi. Druga polovica membrane gdje je β-aktin, inkubirana je HRP vezanim protutijelom koje je usmjereno protiv mišjih IgG (Kat. br. HY-P8004; MedChemExpress, SAD), također 1 sat na sobnoj temperaturi. Po završetku inkubacije sekundarnim protutijelom, membrane su isprane 4 puta po 15 minuta u TBST-u.

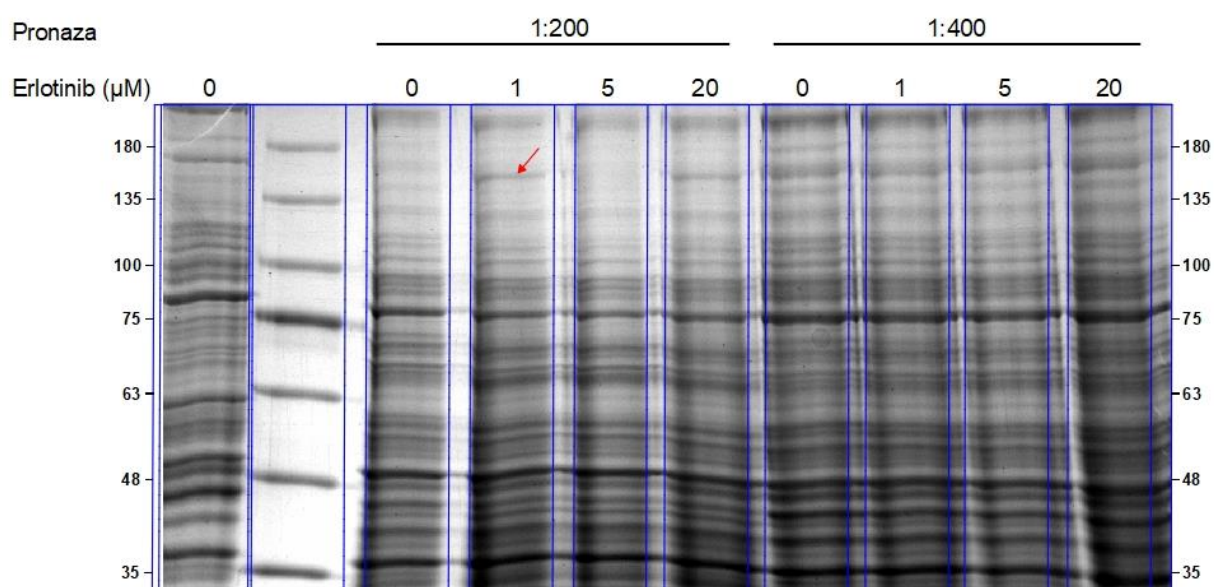
Kako bi se membrane detektirale kemiluminiscencijskom ekspozicijom, korišten je uređaj za vizualizaciju (ChemiDoc MP Imaging System, Bio-Rad, SAD). Prije ekspozicije, na membrane je bilo potrebno dodati

kemiluminiscencijske reagense za Western Blotting (Kat. br. A38555; Thermo Fisher Scientific, SAD) u omjeru 1:1.

4. Rezultati

Titracija otopine pronaze

Uspješno provođenje DARTS metode ovisi o optimalnim parametrima koji osiguravaju najbolji signal proteina zaštićenog ligandom u proteolitičkom djelovanju proteaze, u našem slučaju pronaze. Za inicijalne parametere (optimalnu koncentraciju erlotiniba i omjer dodane pronaze), uzeli smo uvjete publicirane u literaturi (8). Prema Lomenicku, optimalan omjer pronaze i proteina je od 1:100 do 1:1000. Zato je titracija pronaze prvo isprobana s omjerima 1:200 i 1:400, na lizatima A431 stanica volumena 60 μL i koncentracije 1.79 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Lizati stanica su prvo tretirani s erlotinibom u koncentracijama od 1 μM do 20 μM , a potom s pronazom u omjerima 1:200 te 1:400, 60 minuta na sobnoj temperaturi. Napravljen je gradijentni SDS Page gel (Slika 6). Nažalost, prilikom nanošenja uzoraka, dogodila se tehnička pogreška te se rezultati uzorka u petoj jažici (5 μM erlotinib, 1:200 pronaza) ne mogu usporediti s ostalim uzorcima.



Slika 6. Titracija otopina pronaze u staničnim lizatima tretiranima erlotinibom. Dva seta po četiri uzorka lizata A431 stanica inkubirana su s erlotinibom koncentracije 1 μM , 5 μM i 20 μM te je svaki set sadržavao i jednu kontrolu bez erlotiniba. Oba seta inkubirana su s pronazom 60 minuta, jedan u omjeru pronaze i proteina od 1:200, a drugi u omjeru od 1:400. Kao negativna kontrola korišten je uzorak koji nije tretiran niti erlotinibom, niti pronazom. Crvenom strelicom označena je vrpca koja odgovara molekularnoj težini EGFR-a (170 kDa).

Razlike u intenzitetima vrpce EGFR-a nije bilo moguće nedvojbeno utvrditi golim okom pa su zbog toga, pomoću programa za vizualizaciju gelova, Image Laba (18), generirane numeričke vrijednosti intenziteta denzitometrijskom metodom za usporedbu (Tablica 1.).

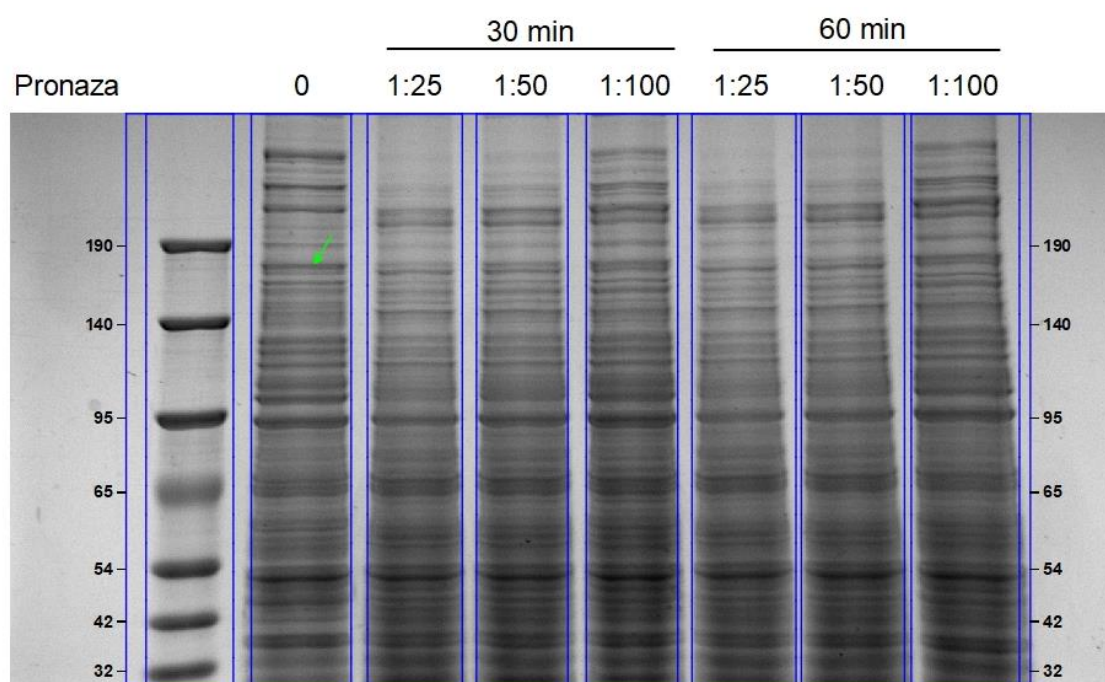
Pronaza	Erlotinib	int.
0	0	5998
	0 μM	1000
	1 μM	3335
	5 μM	333
	20 μM	3946
1:200	0 μM	5043
	1 μM	4705
	5 μM	4700
	20 μM	4770

Tablica 1. Razlike u intenzitetima vrpce EGFR-a. Za svaku vrpcu uzorka EGFR-a očitana je denzitometrijski vrijednost intenziteta. Rezultat vrpce iz linije 5 (obojen crveno) nije se koristio za usporedbu zbog tehničke pogreške prilikom nanošenja uzoraka.

Prema Tablici 1., vrpca EGFR-a u negativnoj kontroli najvećeg je intenziteta te služi kao standard za procjenu efektivnosti pronaze. Vrpca nezaštićenog

EGFR-a, u uzorku koji je tretiran pronazom 1:200, očekivano je najmanjeg intenziteta te pokazuje efektivan rad pronaze. Nadalje, zaštićenost proteina od digestije pronazom, dodanom u omjeru 1:200, ima trend rasta povećanjem koncentracije erlotiniba. Numeričke vrijednosti intenziteta svih vrpca uzoraka, tretiranih s pronazom u omjeru 1:400, ne pokazuju značajnu razliku od intenziteta standarda. Zaključuje se da pronaza, dodana u omjeru 1:400, nije dostatna i nije efektivna.

Nastavak optimizacije metode je proveden u idućem eksperimentu, gdje je isproban efekt pronaze u većim omjerima te bez tretiranja uzoraka erlotinibom. Na taj način se provjeravala aktivnost pronaze te optimalna koncentracija kod koje će se vrpca EGFR-a značajno smanjiti. Napravljen je novi SDS-PAGE gel (Slika 7.) koji je sadržavao uzorke lizata HeLa stanica, inkubirane isključivo s pronazom u različitim omjerima i vremenskim intervalima. Volumen svakog uzorka bio je 30 μL , a koncentracija proteina 1.17 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. 10 mg/mL *stock* otopina pronaze, serijski je razrijeđena kako bi se, dodavanjem 3.1 μL otopine pronaze, postizali omjeri 1:25, 1:50 te 1:100. Uzorci su inkubirani s pronazom 30 ili 60 minuta na sobnoj temperaturi. Pomoću Image Laba ponovno su generirane numeričke vrijednosti intenziteta vrpca kako bi se usporedila efektivnost digestije pronaze (Tablica 2.)



Slika 7. Titracija otopine pronaze i vremena inkubacije. Dva seta po tri različita uzorka lizata HeLa stanica, inkubirana su s pronazom u omjerima 1:25, 1:50 te 1:100. Jedan set uzoraka inkubiran je 30 minuta, a drugi set 60 minuta. Kao negativna kontrola uzet je uzorak lizata HeLa stanica koji nije tretiran pronazom. Zelenom strelicom označena je vrpca koja odgovara molekularnoj težini EGFR-a (170 kDa).

vrijeme	pronaza	int.	digestija (%)
kontrola	0	4152	0%
30 min	1:25	1640	61%
	1:50	2086	50%
	1:100	2201	47%
60 min	1:25	591	86%
	1:50	907	78%
	1:100	2001	52%

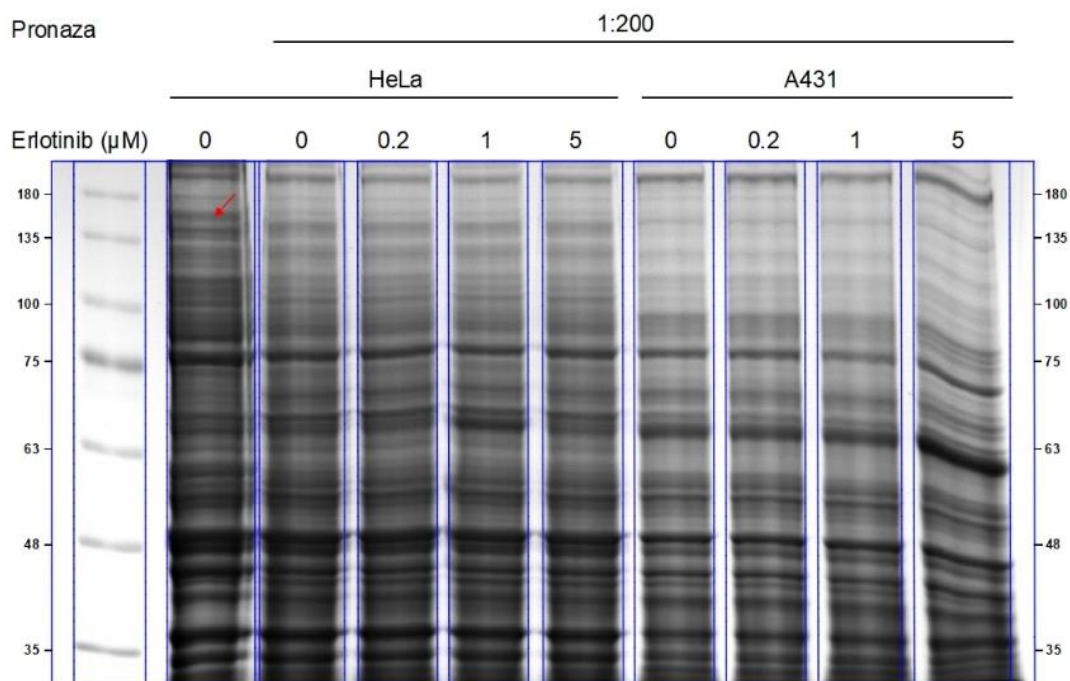
Tablica 2. Efektivnost pronaze izračunata prema intenzitetima vrpce EGFR-a u uzorcima. Tablica sadržava sve vrijednosti intenziteta vrpce uzoraka od kojih je, kao referentna vrijednost, uzet intenzitet vrpce EGFR-a u kontrolnom uzorku. Pomoću omjera intenziteta uzoraka i referentne

vrijednosti, izračunati su postotci digestije pronaze koji reflektiraju njezinu efektivnost.

Prema Tablici 2. vrpca EGFR-a u negativnoj kontroli, imala je najveći intenzitet te je poslužila kao referentna vrijednost za usporedbu ostalih uzoraka tretiranih pronazom. Niti jedan od intenziteta vrpce EGFR-a, u uzorcima koji su tretirani pronazom 30 minuta, nije dovoljno značajno smanjen. Pronaza, niti u jednom omjeru, nije postigla značajnu digestiju od približno 80%. Uzorci koji su inkubirani s pronazom 60 minuta, pokazali su značajnije promjene u intenzitetu vrpce EGFR-a. Pronaze dodane u omjerima 1:25 i 1:50 pokazale su vrlo značajan efekt digestije. Zaključeno je da je optimalno vrijeme inkubacije pronazom 60 minuta, te da ona mora biti dodana u uzorke proteina u omjerima 1:25 ili 1:50.

Titracija erlotiniba

Kako bi se testirao efekt zaštite proteina vezanog ligandom, uzorci su inkubirani s erlotinibom različitih koncentracija te su potom izloženi digestiji pronazom. U prvom eksperimentu, korišteni su lizati HeLa stanica te A431 stanica. Uzorci lizata HeLa stanica imali su koncentraciju od 1.87 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ i volumen od 30 μL , a A431 stanica koncentraciju od 0.54 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ i volumen od 100 μL . Lizati su inkubirani s erlotinibom počevši od koncentracije 0.2 μM do najveće koncentracije od 5 μM . S obzirom da u vrijeme izrade ovog eksperimenta, pronaza još nije bila optimizirana, svi su uzorci, osim negativne kontrole, inkubirani s pronazom dodanom u omjeru od 1:200, 30 minuta na sobnoj temperaturi. Na Slici 8. prikazan je gel nakon SDS-PAGE elektroforeze, a u Tablici 3. dane su numeričke vrijednosti intenziteta vrpce za usporedbu. Kao standardi za normalizaciju uzeti su intenziteti vrpce beta aktina na čiju razinu digestije ne utječe prisustvo erlotiniba.



Slika 8. Titriranje erlotiniba za uzorke HeLa i A431 staničnih lizata. Od svake vrste stanica napravljen je set od 4 uzorka lizata koji su inkubirani s erlotinibom koncentracija 0.2 μM , 1 μM te 5 μM . Svaki set sadržavao je kontrolu bez erlotiniba. Svi su uzorci tretirani pronazom u omjeru od 1:200, 30 minuta. Negativna kontrola je uzorak lizata HeLa stanica te nije tretiran niti erlotinibom, niti pronazom. Crvenom strelicom označena je vrpca EGFR-a (170 kDa).

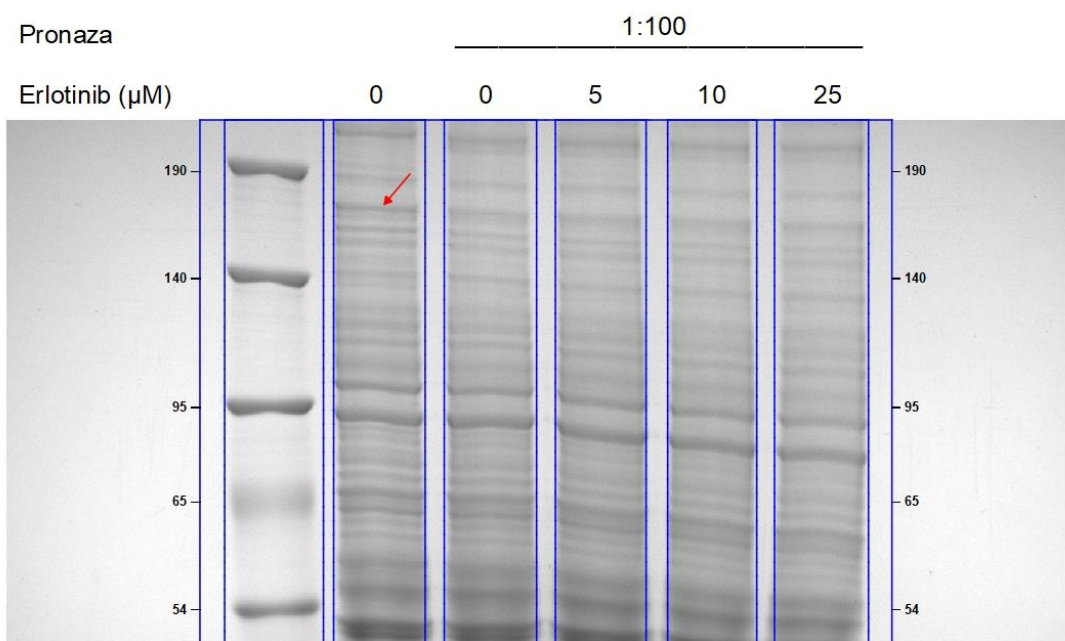
Pronaza	Stanice	Erlotinib	Intenzitet		Omjer intenziteta (EGFR/Beta aktin)	Zaštita (%)	Digestija (%)
			EGFR	Beta aktin			
1:200	HeLa	0	3936	9751	0.40		
		0 μM	1208	4735	0.26		37%
		0.2 μM	1058	5411	0.20	48%	
		1 μM	1158	5811	0.20	49%	
		5 μM	1526	5848	0.26	65%	
	A431	0 μM	1056	8626	0.12		
		0.2 μM	3374	8450	0.40		
		1 μM	3030	6120	0.50		
		5 μM	3461	8531	0.41		

Tablica 3. Usporedba intenziteta vrpca HeLa i A431 staničnih lizata inkubiranih s erlotinibom. U tablici su generirani intenziteti vrpca EGFR-a i beta aktina iz svih uzoraka. Beta aktin korišten je za normalizaciju, a iz

omjera normaliziranih vrijednosti, izračunati su postotci zaštite te postotak digestije.

Prema Tablici 3., kod uzoraka HeLa stanica, zaštita erlotiniba od 5 μM jedina odstupa po brojčanoj vrijednosti te pokazuje značajnu zaštitu proteina od digestije. Međutim, digestija pronaze ima vrlo malen postotak te se smatra da pronaza dodana u omjeru 1:200 nije efektivna. Procjenu digestije i zaštite proteina, kod A431 stanica, nije bilo moguće izračunati jer je nedostajala negativna kontrola, netretirana niti erlotinibom, niti pronazom.

Nakon prethodne titracije erlotiniba, zaključeno je da su koncentracije erlotiniba preniske, a omjer proteina i pronaze nedovoljan da bi se vidio efekt zaštite. Osim što je trebalo povećati koncentracije erlotiniba, također je trebalo povećati i omjer proteina i dodane pronaze. Za slijedeći eksperiment, odabrani su lizati HeLa stanica koncentracije 1.10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, a svaki je uzorak sadržavao 45 μL lizata. Koncentracije erlotniba povećane su na vrijednosti od 5 μM , 10 μM i 20 μM (Slika 9.). Uzorci su inkubirani s pronazom dodanom u omjeru od 1:100, 30 minuta na sobnoj temperaturi. U Tablici 4. generirane su numeričke vrijednosti intenziteta vrpce za usporedbu efektivnosti.



Slika 9. Titracija erlotiniba povećanih koncentracija. Tri uzorka lizata HeLa stanica inkubirana su s otopinom erlotiniba koncentracija 5 μM , 10 μM te 25 μM . Uz još jedan kontrolni uzorak (bez erlotiniba), sva tri uzorka su inkubirana s pronazom u omjeru 1:100, 30 minuta. Kao negativna kontrola korišten je uzorak koji nije tretiran niti pronazom, niti erlotinibom. Crvenom strelicom označena je vrpca koja odgovara molekularnoj težini EGFR-a (170 kDa).

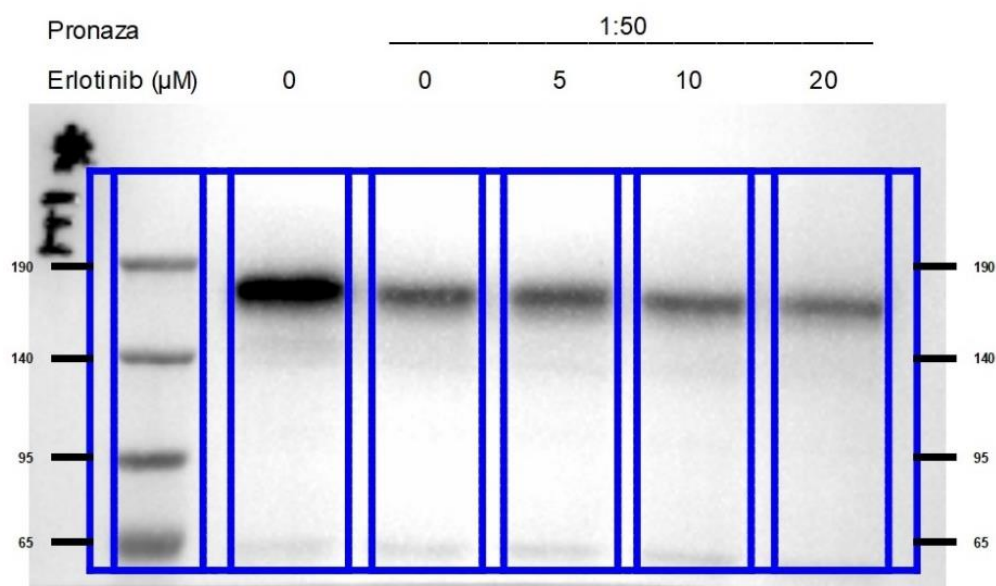
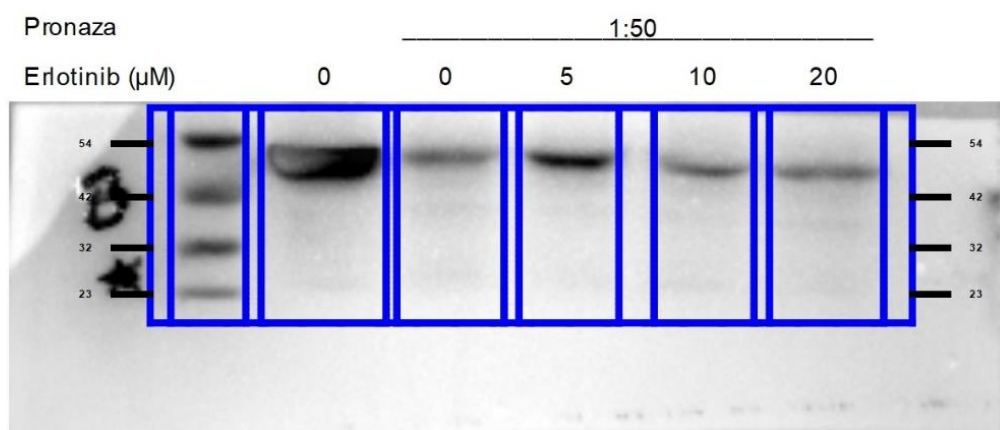
Pronaza	Erlotinib	Intenzitet		Omjer intenziteta (EGFR/Beta aktin)	Zaštita (%)	Digestija (%)
		EGFR	Beta aktin			
0	0	4988	5081	0.98		
	0 μM	2005	3501	0.57		42%
1:100	5 μM	2422	3706	0.65	67%	
	10 μM	2509	3384	0.74	76%	
	25 μM	2782	3918	0.71	72%	

Tablica 4. Usporedba intenziteta vrpce nezaštićenih proteina i proteina zaštićenih erlotinibom povećanih koncentracija. Izražene su vrijednosti intenziteta EGFR-a i beta aktina. Vrijednosti vrpce EGFR-a podijeljene su s vrijednostima beta aktina u svrhu normalizacije podataka. Iz omjera

normaliziranih vrijednosti, izračunati su postotci zaštite te postotak digestije.

Iz Tablice 4., vidljivo je da je erlotinib, dodan u koncentraciji od 10 μM , značajnije zaštitio protein od digestije nego erlotinib dodan u koncentraciji od 5 μM . Međutim, erlotinib koncentracije 25 μM ima podjednaki efekt zaštite proteina od digestije kao i erlotinib koncentracije 10 μM . Ovaj je eksperiment ponovljen s obzirom da pronaza nije dosegla značajnu razinu digestije.

Idući je eksperiment dizajniran tako da se pronaza doda u omjeru od 1:50 te inkubira jedan sat. Četiri uzorka lizata HeLa stanica, koncentracije 1.90 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ i volumena 15 μL , inkubirana su s erlotinibom koncentracija od 5 μM do 20 μM . Jedan je uzorak bez erlotiniba korišten kao kontrola. U sva četiri uzorka dodana je pronaza u omjeru 1:50 te su svi uzorci inkubirani 60 minuta na sobnoj temperaturi. Kao negativna kontrola korišten je uzorak netretiran niti erlotinibom, niti pronazom. Proteini su nakon elektroforeze s gela preneseni na membranu koja je potom inkubirana s primarnim i sekundarnim protutijelima. Dobiveni su rezultati Western blottinga na Slici 10.

a**b**

Slika 10. Rezultati Western blottinga titriranja erlotiniba. Od pet uzoraka, tri su inkubirana s erlotinibom koncentracija 5 μM , 10 μM te 20 μM te s pronazom u omjeru 1:50, 60 minuta na sobnoj temperaturi. Jedan uzorak je inkubiran samo s pronazom. Negativna kontrola je uzorak u prvoj jažici, netretiran niti erlotinibom, niti pronazom. Membrana je nakon transfera prerezana na dva dijela: a) EGFR, b) beta aktin. Svaki dio inkubiran je sa određenim primarnim i sekundarnim protutijelima.

Slike Western blottinga membrana pokazuju razlike u intenzitetima vrpce EGFR-a. Razlike u intenzitetima vidljive su i kod vrpce beta aktina što reflektira nanošenje nejednake količine proteina. Zbog toga su intenziteti ponovno numerički generirani kako bi se potvrdili rezultati (Tablica 5.).

Pronaza	Erlotinib	Intenzitet		Omjer intenziteta (EGFR/Beta aktin)	Zaštita (%)	Digestija (%)
		EGFR	Beta aktin			
0	0	44095	29782	1.48		
	0 μ M	12673	22178	0.57		61%
1:50	5 μ M	18289	24178	0.76	51%	
	10 μ M	20613	18368	1.12	76%	
	20 μ M	16978	18713	0.91	61%	

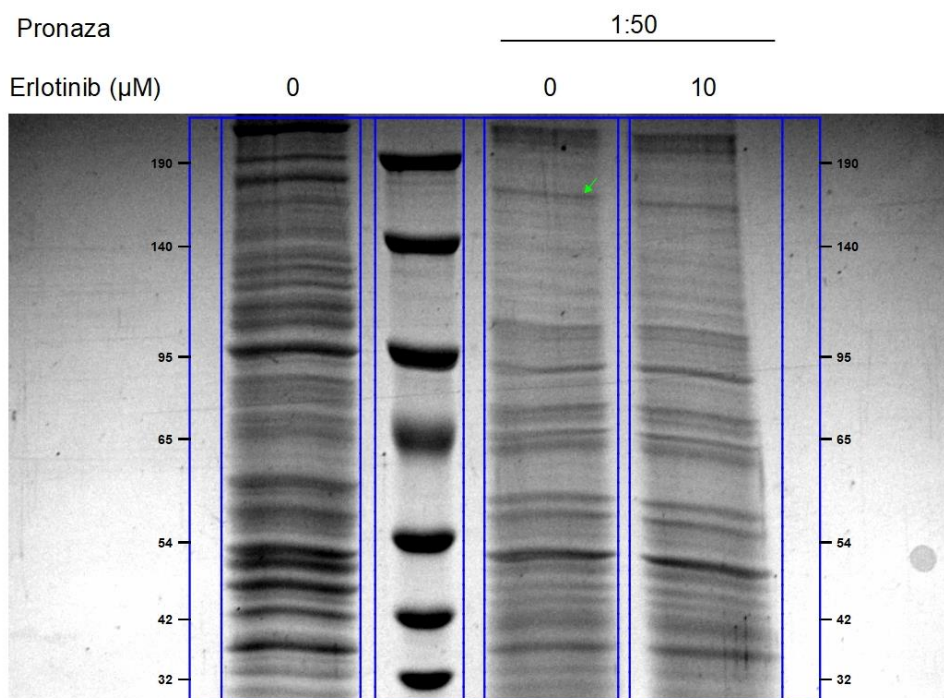
Tablica 5. Usporedba intenziteta vrpce EGFR-a i beta aktina nakon Western blottinga. Generirane su numeričke vrijednosti intenziteta kako bi se usporedili i očitali rezultati eksperimenta. Uz omjer intenziteta vrpce EGFR-a i beta aktina, izračunati su i postotci zaštite te digestije.

Prema Tablici 5., omjeri intenziteta pokazuju kako je najučinkovitiji erlotinib u koncentraciji od 10 μ M. Između netretiranog uzorka i uzorka koji je tretiran samo pronazom, razlika je značajna te reflektira efektivan učinak pronaze dodane u omjeru od 1:50 i inkubirane u vremenskom intervalu od jednog sata. Ovim je eksperimentom optimizirana koncentracija erlotiniba te je pokazano da njegovo vezanje štiti EGFR od digestije pronazom. To potvrđuje da je EGFR direktna meta za vezanje erlotiniba, što je osnovna svrha korištenja DARTS metode.

DARTS metoda u istraživanju mehanizma rada erlotiniba

Istraživanje mehanizma djelovanja lijeka još je jedna svrha korištenja DARTS metode. Točnije, ovim eksperimentom ispitan je poznati mehanizam erlotiniba – inhibicija tirozin kinaze EGFR-a te njezinog kaskadnog puta. Za ovu vrstu eksperimenta, bile su korisne A431 stanice zbog svoje izraženije

ekspresije EGFR-a. Nakon optimizacije metode titriranjem erlotiniba i pronaze, prethodni eksperiment je ponovljen s lizatima A431 stanica. Koncentracija erlotiniba koja je odabrana iznosila je $10 \mu\text{M}$, a omjer pronaze i proteina je bio 1:50. Inkubacija pronazom bila je jedan sat na sobnoj temperaturi. Izrađena su dva gela, za elektroforezu i Western blotting, a uzorci lizata A431 stanica imali su koncentraciju proteina od $1.17 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, odnosno $1.54 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Svaki gel sastojao se od seta s tri uzorka volumena $30 \mu\text{L}$, od kojih je jedan uzorak bio negativna kontrola, jedan uzorak tretiran samo pronazom, a jedan uzorak tretiran erlotinibom i pronazom.



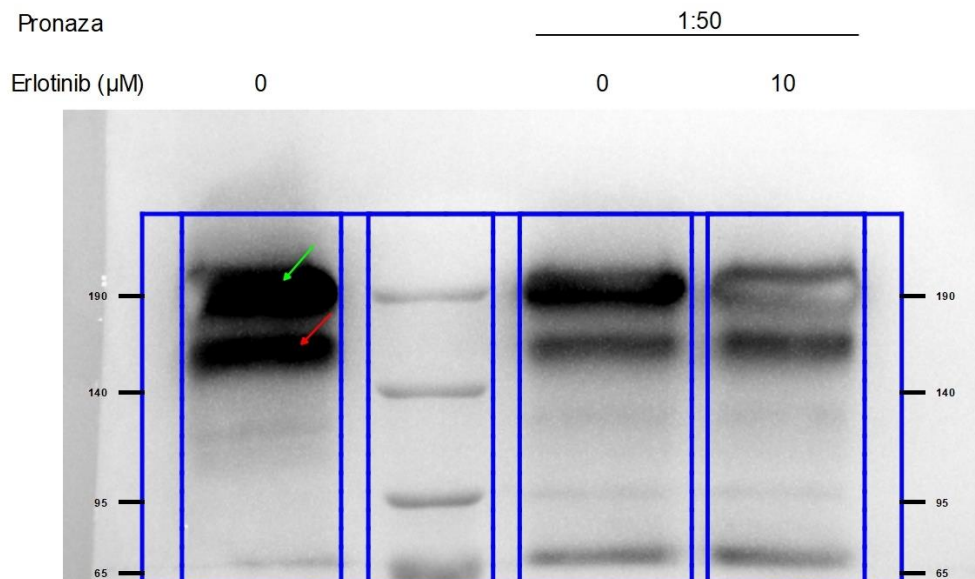
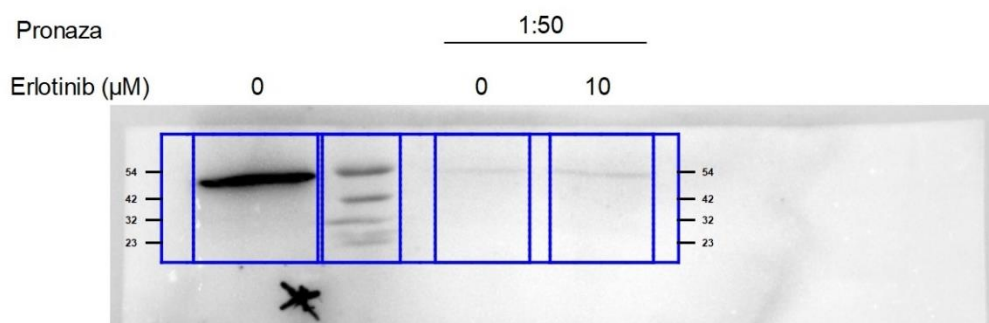
Slika 11. SDS-PAGE elektroforeza lizata A431 stanica tretiranih $10 \mu\text{M}$ erlotinibom i pronazom u omjeru 1:50. Na gel su nanesena 3 uzorka: negativna kontrola, uzorak tretiran samo pronazom te uzorak tretiran erlotinibom i pronazom. Zelenom strelicom označena je vrpca koja odgovara molekularnoj težini EGFR-a (170 kDa).

Pronaza	Erlotinib	Intenzitet		Omjer intenziteta (EGFR/Beta aktin)	Zaštita (%)	Digestija (%)
		EGFR	Beta aktin			
0	0	3195	2494	1.28		
	0 μ M	626	1331	0.47		63%
	10 μ M	964	1104	0.87	68%	

Tablica 6. Intenziteti vrpce EGFR-a u odnosu na vrpce beta aktina. Iskazane su numeričke vrijednosti intenziteta vrpce EGFR-a i beta aktina te postotci zaštite i digestije.

Prema Tablici 6. potvrđena je efektivna digestija pronaze dodane u omjeru 1:50 te inkubirane jedan sat. Vežanje erlotiniba, koji je dodan u koncentraciji od 10 μ M, u značajnom postotku (68%) štiti proteine od digestije.

Ovaj je eksperiment nadalje analiziran izradom Western blottinga kako bi se potvrdilo da je EGFR vrpca koja je na gelu pokazala efekt rezistencije na djelovanje pronaze kada je u interakciji s erlotinibom (Slika 12.).

a**b**

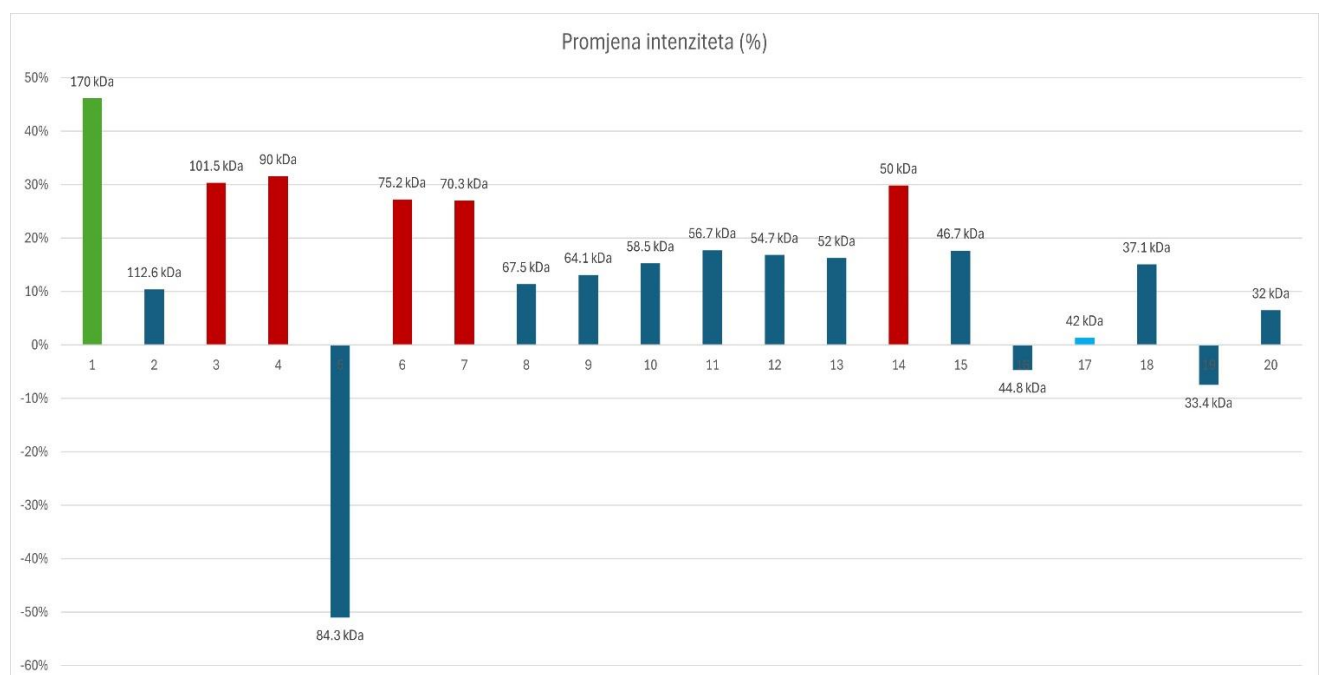
Slika 12. Western blotting lizata A431 stanica tretiranih 10 μM erlotinibom i pronazom u omjeru 1:50. Membrana je nakon transfera prerezana na dva dijela: a) EGFR, b) beta aktin. Svaki dio inkubiran je sa određenim primarnim i sekundarnim protutijelima. Crvenom strelicom označen je EGFR. Zelenom strelicom označen je fosforilirani oblik EGFR-a (pEGFR).

Slika 12.a) pokazuje da vrpca proteina EGFR-a, koji je zaštićen vezanjem erlotiniba, ima nešto veći intenzitet od vrpce EGFR-a za koji erlotinib nije vezan. Fosforilirani oblik EGFR-a, vezanjem erlotiniba ima smanjen intenzitet. Taj rezultat reflektira mehanizam djelovanja erlotiniba koji utječe

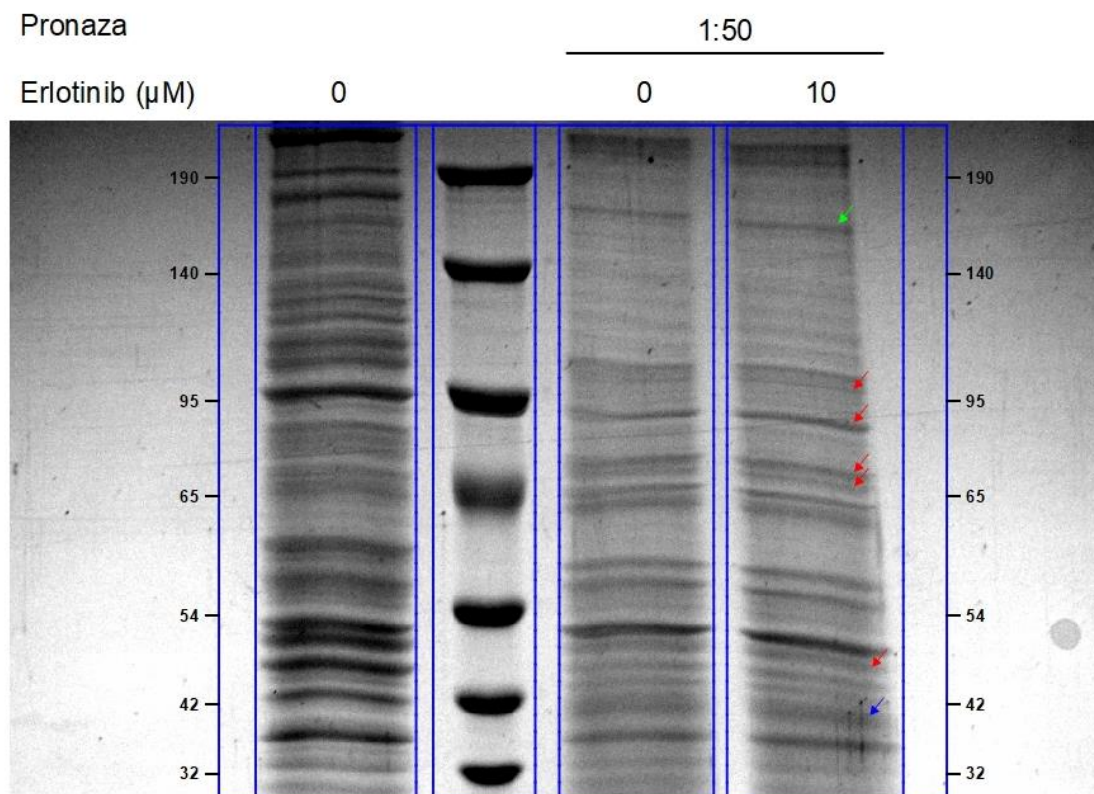
na smanjenje autofosforilacije. Na slici 12.b) vidljivo je da kod beta aktina, nema vezanja erlotiniba te su vrpce tih dvaju uzoraka podjednakih intenziteta.

DARTS metoda u istraživanju drugih meta erlotiniba

DARTS metoda posebno je korisna za istraživanje drugih (nepoznatih) meta lijekova. Ovoj vrsti istraživanja pristupili smo pomoću SDS-PAGE gela koji je napravljen na Slici 11. Na gelu su, pomoću programa za vizualizaciju, detektirane vrpce za 20 proteina. Njihove su vrijednosti normalizirane pomoću intenziteta beta aktina, s obzirom da je, prema Slici 12.b), vidljivo da na njegovu stabilnost ne utječe prisustvo erlotiniba. U literaturi, pronađeno je da proteini, koji također pokazuju porast stabilnosti u prisustvu erlotiniba, imaju oko 20% povećan intenzitet vrpce (9). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da, uz EGFR, još je pet proteina imalo značajan porast intenziteta vrpce (iznad 20%) u prisustvu erlotiniba (Slike 13. i 14.).



Slika 13. Grafički prikaz promjena intenziteta za 20 detektiranih proteina. Dijagram prikazuje promjenu intenziteta u obliku postotka za svaki protein označen brojem te svojom molekularnom masom (kDa). Zelenom bojom označen je EGFR, a svijetloplavom beta aktin. Crvenom bojom označeni su proteini koji pokazuju značajnu pozitivnu promjenu intenziteta (iznad 20%).



Slika 14. Druge mete erlotiniba na SDS-PAGE gelu. Zelenom strelicom označena je vrpca EGFR-a, a plavom beta aktina. Crvenim strelicama označeni su proteini koji pokazuju značajnu promjenu intenziteta prema Slici 13.

5. Diskusija

Ovim eksperimentalnim radom, htjeli smo pokazati različite prednosti DARTS metode. Dizajn eksperimenta osmišljen je na način da se prvo potvrdi osnovna svrha DARTS metode – ispitivanje direktne biološke mete lijeka. Kako bi se eksperiment mogao osmisliti, prvo je bilo potrebno odabrati vrste stanica, napraviti lizate, titraciju pronaze i erlotiniba te optimizirati sve uvjete. Tek nakon što su ostvareni ti uvjeti, bilo je moguće potvrditi da je EGFR direktna biološka meta erlotiniba. Za mnoge lijekove poznata je njihova biološka meta, no mehanizam djelovanja nije uvijek jasan. Zbog toga smo, nakon što je potvrđena meta erlotiniba, pokušali ovu metodu iskoristiti za ispitivanje njegovog mehanizma. Mehanizam je potvrđen pomoću fosforiliranog oblika EGFR-a kojemu se intenzitet smanjuje u prisustvu erlotiniba. Posljednjim eksperimentom pokušali smo pokazati i druge proteine za koje se također veže erlotinib (eng. *off-targets*), a koji pokazuju značajnu promjenu intenziteta. Uz EGFR, pronađeno je još pet proteina kod kojih je utvrđeno značajno manje proteolitičko razaranje u prisutnosti erlotiniba.

Titracija otopine pronaze

U početku dizajniranja eksperimenta, bilo je važno pronaći uvjete u kojima je enzim poput pronaze efektivan. Prema literaturi, za različite vrste proteolitičkih enzima, potrebni su različiti uvjeti. Ti uvjeti uključuju pH pri kojemu je enzim najaktivniji, ionsku jakost otopine te razne druge uvjete koji omogućuju strukturnu aktivnost enzima (19). Kako bi se ostvarili uvjeti za aktivaciju pronaze, odabir otapala bio je DPBS radije nego ultračista voda. Jedna od poteškoća na koje smo naišli prilikom titracije pronaze jest njezina kratkotrajna stabilnost. Velik broj eksperimenata bio je neuspješan zbog autodigestije enzima pronaze. Kako bi se to spriječilo, bilo je potrebno

sve otopine pronaze držati na ledu, a stock otopinu (10 mg/mL) alikvotirati i zamrznuti na temperaturi od -20°C. Na taj je način omogućeno da se za svaki eksperiment koristi „svježa“ otopina pronaze koja je odmrznuta samo jednom.

Nadalje, efektivnost digestije pronaze značajno je ovisila o razrjeđenju. Uspoređujući s rezultatima iz literature, gdje je pronaza pokazivala efektivnu digestiju već kod omjera 1:200, iz eksperimenata na Slikama 5. i 7., vidljivo je da taj omjer proteina i pronaze nije dostatan. Postupno je povećavan omjer proteina i pronaze te je tek omjer od 1:50 postigao značajan efekt digestije proteina. Moguće je da razlog tomu leži u različitim proizvođačima pronaze korištene za ovaj eksperiment (MedChemExpress, SAD) i pronaze koja je korištena u literaturi (Sigma - Aldrich, SAD), čije aktivnosti imaju različite vrijednosti.

Titracija erlotiniba

Titracija erlotiniba je vrlo važan dio optimizacije ove metode. U uzorke lizata mora se dodati dovoljna koncentraciju erlotiniba kako bi se postigao efekt zaštite proteina. Međutim, važno je i da koncentracija erlotiniba ne bude previsoka kako ne bi došlo do neželjenih efekata. Bez prethodno određene optimalne koncentracije pronaze, bilo je vrlo teško odrediti čak i koncentracijski rang erlotiniba. Tek kada je pronaza dosegula efektivnu razinu digestije, mogla se sa sigurnošću optimizirati koncentracija erlotiniba. Jedan od glavnih problema prilikom titriranja erlotiniba bilo je otapalo. Naime, u prvim dizajniranim eksperimentima, kao otapalo je korišten dimetil sulfoksid (DMSO; Sigma-Aldrich, SAD). DMSO je često korišteno reakcijsko otapalo, te je prema literaturi također preporučeno. Međutim, DMSO također ima velik učinak na vezanje i proteolizu ako je dodan u koncentracijama većima od 1-2%, čime može znatno utjecati na interpretaciju rezultata (8). Umjesto u DMSO-u, erlotinib je otapan i razrjeđivan u PBS-u.

DARTS metoda u istraživanju direktne mete erlotiniba

Nakon što je metoda optimizirana, dizajniran je eksperiment kojim smo htjeli potvrditi da je EGFR biološka meta erlotiniba. Literatura pokazuje da je već nakon SDS-PAGE elektroforeze moguće vidjeti razliku u intenzitetima vrpce između uzorka tretiranog erlotinibom, te uzorka koji nije tretiran erlotinibom (20). Rezultati naših gelova pokazali su tu razliku tek u numeričkom obliku, dok se oni vizualno vrlo teško primjećuju. Lomenick i njegovi suradnici kažu da je idealna koncentracija proteina za uzorke između 4 i 6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (8). Pretpostavka je da zbog znatno manje koncentracije proteina u našim uzorcima, vizualni efekt nije bio značajno postignut. Zbog toga je za potvrdu korištena metoda Western blottinga. Western blotting je, i vizualno i numerički, vrlo jasno pokazao da je razlika između tretiranih i netretiranih uzoraka postojana te da je EGFR direktna biološka meta erlotiniba.

Kao i pripremu uzoraka, trebalo je optimizirati i Western blotting. Najveći problem bilo je trajanje i jakost struje prijenosa zbog veličine EGFR-a. Nakon nekoliko pokušaja, određeni su uvjeti koji su omogućili uspješan prijenos – 1 sat i 30 minuta transfera na 300 mA te dodatnih 20 minuta na 400 mA. Također, bilo je vrlo bitno otopinu protutijela koristiti maksimalno dva do tri puta. Velik broj korištenja iste otopine protutijela rezultirao je gubitkom njegovih svojstava što je bilo vidljivo prilikom slikanja membrane.

DARTS metoda u istraživanju mehanizma rada erlotiniba

Nakon što je potvrđeno da je EGFR direktna biološka meta erlotiniba, zanimalo nas je je li moguće pomoću DARTS metode uočiti njegov mehanizam djelovanja. Za taj eksperiment odabrani su lizati A431 stanica, čija je ekspresija EGFR proteina veća nego u HeLa stanica. Vezanjem liganda na EGFR, aktivira se tirozin-kinazna domena te se pokreće autofosforilacija kako bi se aktivirali signalni putevi koji bi doveli do stanične proliferacije. Vezanjem na ATP-vezno mjesto, erlotinib blokira

autofosforilaciju te navedene signalne puteve. Vrpca fosforiliranog oblika EGFR-a u uzorku koji nije tretiran erlotinibom, vidljiva je na Slici 12.a). Također je vidljivo da ta vrpca ima značajno jači intenzitet nego vrpca uzorka koji je tretiran erlotinibom. To ukazuje da je, vezanjem erlotiniba, onemogućena autofosforilacija što potvrđuje njegov mehanizam djelovanja – inhibiciju tirozin-kinazne aktivnosti EGFR-a.

DARTS metoda u istraživanju drugih meta erlotiniba

Nedirektne mete za vezanje lijekova pogotovo je važno detektirati zbog njihove uloge u rezistenciji kod tumorskih stanica. Naime, kod 60% pacijenata oboljelih od raka nemalih stanica pluća, nakon 9 do 14 mjeseci dolazi do rezistencije na erlotinib te do progresije bolesti zbog povećanja DNA mutacija kod tumorskih stanica (21). Tae Young Kim i njegovi suradnici su potvrdili da je DNA polimeraza alfa 2, POLA2 (eng. *DNA polymerase alpha 2*), još jedna vezna meta erlotiniba koja direktno sudjeluje u mehanizmu rezistencije tumorskih stanica na erlotinib (9). U tu svrhu koristili su DARTS metodu kojom su pokazali značajnu promjenu u intenzitetu vrpce proteina POLA2, vrlo sličnu promjeni intenziteta kod EGFR-a. Naš posljednji eksperiment dizajniran je upravo da bi se istražio broj proteina koji, poput EGFR-a, pokazuju značajnu promjenu intenziteta vrpce, a koja reflektira njihovu stabilizaciju ili destabilizaciju erlotinibom. Tako je, prema Slici 13., pronađeno još pet proteina sa značajnom pozitivnom promjenom intenziteta, što bi mogla biti posljedica stabilizacije vezanjem erlotiniba. Također, jedan protein pokazuje značajan suprotan utjecaj vezanja – destabilizaciju erlotinibom. Na temelju ovih podataka, bilo bi poželjno identificirati te proteine pomoću LC-MS/MS SWATH analize kako su to učinili Tae Young Kim i njegovi suradnici (9). Nakon identifikacije dodatno se može proučiti važnost tih proteina u onkogenezi, što može biti vrlo korisno za razvoj protutumorskih lijekova i modificiranje terapije kod pacijenata oboljelih od NSCLC-a.

6. Zaključak

Ovim istraživačkim radom potvrđeno je da je DARTS jednostavna, brza i multi-funkcionalna metoda kojom se, uz spregu sa masenom spektrometrijom, može odrediti direktna biološka meta male molekule. Usporedbom intenziteta vrpca i korištenjem Western blotting analize uzoraka, potvrđeno je da je EGFR direktna meta za vezanje erlotiniba i da on vezanjem uzrokuje inhibiciju autofosforilacije. Inhibicija autofosforilacije posljedično dovodi do prekida RAS-RAF-MEK-MAPK signalnog puta koji regulira gensku ekspresiju i proliferaciju tumorske stanice. Također je potvrđeno da postoje i drugi proteini za koje se veže erlotinib, a koji tada pokazuju iznimnu razliku u stabilnosti. Identifikacijom tih *off-target* proteina moguće je doći i do važnih zaključaka u vezi rezistencije tumorskih stanica na lijekove, koja je kod terapije erlotinibom, nažalost, vrlo česta pojava. DARTS metoda nudi niz mogućnosti u istraživanju i dizajniranju lijekova, ali i njihovoj modifikaciji. S obzirom da je direktna meta erlotiniba poznata, u ovom radu nije bilo potrebno zasebno identificirati EGFR nekom od tehnika proteomike, no za nepoznate otkrivene mete, identifikacija bi bila itekako važna zbog pronalaženja njihovih uloga u unutarstaničnim signalnim putevima. Još jedna prednost ove metode jest ta da se ona može koristiti za bilo koju malu molekulu, no za svako novo istraživanje neophodna je optimizacija. Bez kvalitetne optimizacije metode, produljuju se vrijeme i troškovi samog istraživanja, a gubi se i kvaliteta rezultata. S obzirom na visoku osjetljivost tehnika proteomike poput SDS-PAGE, Western blotting ili LC-MS tehnike, potrebno je dobro poznavati princip rada svake od njih ili barem raditi u timu s iskusnim istraživačima kako bi se brzo i efikasno rješavale tehničke poteškoće.

7. Reference

1. Tebani A, Afonso C, Marret S, Bekri S. Omics-based strategies in precision medicine: Toward a paradigm shift in inborn errors of metabolism investigations. Vol. 17, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2016.
2. Al-Amrani S, Al-Jabri Z, Al-Zaabi A, Alshekaili J, Al-Khabori M. Proteomics: Concepts and applications in human medicine. World J Biol Chem. 2021 Sep 27;12(5):57–69.
3. Nowakowski AB, Wobig WJ, Petering DH. Native SDS-PAGE: High resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. Metallomics. 2014;6(5):1068–78.
4. Mahmood T, Yang PC. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. N Am J Med Sci. 2012 Sep;4(9):429–34..
5. Haymond A, Davis JB, Espina V. Proteomics for cancer drug design. Expert Rev Proteomics. 2019;16(8):647–64.
6. Li J, Van Valkenburgh J, Hong X, Conti PS, Zhang X, Chen K. Small molecules as theranostic agents in cancer immunology. Theranostics. 2019;9(25):7849–71.
7. Pai MY, Lomenick B, Hwang H, Schiestl R, McBride W, Loo JA, et al. Drug Affinity Responsive Target Stability (DARTS) for Small-Molecule Target Identification. In 2015. p. 287–98.

8. Lomenick B, Hao R, Jonai N, Chin RM, Aghajan M, Warburton S, et al. Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Dec 22;106(51):21984–9.
9. Kim TY, Ji ES, Lee JY, Kim JY, Yoo JS, Marcell Szasz A, et al. Dna polymerase alpha subunit b is a binding protein for erlotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Sep 1;12(9):1–14.
10. Holtedahl K. Challenges in early diagnosis of cancer: the fast track. *Scand J Prim Health Care*. 2020 Jul 2;38(3):251–2.
11. Amelia T, Kartasasmita RE, Ohwada T, Tjahjono DH. Structural Insight and Development of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. Vol. 27, *Molecules*. MDPI; 2022.
12. Pecorino, L. (2021). *Molecular biology of cancer : mechanisms, targets, and therapeutics* (Fifth edition). Oxford University Press.
13. Reita D, Pabst L, Pencreach E, Guérin E, Dano L, Rimelen V, et al. Molecular mechanism of egfr-tki resistance in egfr-mutated non-small cell lung cancer: Application to biological diagnostic and monitoring. Vol. 13, *Cancers*. MDPI; 2021.
14. Deng P, Sun G, Zhao J, Yao K, Yuan M, Peng L, et al. Synthesis and Antitumor Activity of Erlotinib Derivatives Linked With 1,2,3-Triazole. *Front Pharmacol*. 2022 Jan 17;12.
15. National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 176870, Erlotinib. Retrieved August 20, 2024.

16. Agencija za lijekove i medicinske proizvode - HALMED. Sažetak opisa svojstava lijeka H A L M E D. Zagreb; 2023 Mar.
17. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Non-Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ®): Patient Version. 2002.
18. Laboratories BR. Image Lab Software User Guide [Internet]. 2020. Available from: www.bio-rad.com
19. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer. *Biochemistry, Fifth Edition*. V New York: W. H. Freeman And Company, New York, 2002.
20. Wang C, Li Z, Zhai H, Shen X, Li F, Zhang Q, et al. Targeted blocking of EGFR and GLUT1 by compound H reveals a new strategy for treatment of triple-negative breast cancer and nasopharyngeal carcinoma. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2024 Jul 1;198.
21. Walter, Annette O et al. "Discovery of a mutant-selective covalent inhibitor of EGFR that overcomes T790M-mediated resistance in NSCLC." *Cancer discovery* vol. 3,12 (2013): 1404-15. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0314