

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Zorica Milošević

Uloga mTOR i MAPK signalnih puteva u
rezistenciji karcinoma štitaste žlezde na
hemioterapiju

Doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Zorica Milošević

The role of mTOR and MAPK signaling
pathways in resistance of thyroid
carcinoma to chemotherapy

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE

MENTORI:

dr Marina Stamenković - Radak, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Jasna Banković, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Nikola Tanić, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

dr Milica Pešić, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

dr Radan Dzodić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

dr Katarina Zeljić, docent

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

DATUM ODBRANE:

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu neurobiologiju, Odeljenja za neurobiologiju, na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković” u Beogradu, u okviru projekta III41031 Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj, pod rukovodstvom dr Nikole Tanića.

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru, dr Jasni Banković i kolegici dr Milici Pešić koje su kvalitetno osmislile ovu disertaciju i pružale mi pomoć i u eksperimentalnom radu i prilikom pisanja ove teze.

Svom mentoru dr Jasni Banković se neizmerno zahvaljujem na velikom poverenju, na bodrenju, strpljenju i dugim prijateljskim razgovorima.

Dr Milici Pešić se zahvaljujem na nesebičnoj podršci i pruženoj prilici za naučno usavršavanje na Medicinskom fakultetu, u Sijudad Realu u Španiji.

Dr Nikoli Taniću se zahvaljujem na podršci i pomoći u eksperimentalnom radu kao i tumačenju dobijenih rezultata.

Posebno bih se zahvalila dr Saberi Ruždijić na ukazanom poverenju i pruženoj prilici za rad u nauci.

Svojim kolegicama i kolegama iz laboratorije 25 se zahvaljujem na razumevanju, prijateljskom pomaganju i prijatnom vremenu provedenim sa njima.

Dr Tijani Stanković sam posebno zahvalna na svim nesebično pruženim savetima u toku izrade ove doktorske disertacije, a najviše na prijateljstvu.

Najveću zahvalnost dugujem roditeljima, koji su moja najveća podrška u životu i bez čije ljubavi nijedan moj uspeh ne bi imao smisao.

REZIME

Karcinomi štitaste žlezde su najčešći maligniteti endokrinog sistema. Klasifikacija ovih maligniteta je izvršena na osnovu njihovih histopatoloških karakteristika na papilarni, folikularni medularni i anaplastični karcinom (ATC). Većina karcinoma štitaste žlezde je dobro diferencirana i ima odličnu prognozu (papilarni i folikularni), dok anaplastični karcinom predstavlja agresivni tip sa izrazito lošom prognozom uprkos različitim terapijskim pristupima u njegovom lečenju. Promene u PI3K/AKT/mTOR i RAS/MAPK/ERK signalnim putevima su karakteristične za nastanak karcinoma štitaste žlezde, koji su urođeno rezistentni na klasičnu hemioterapiju. Upravo promene u aktivnosti PI3K/AKT/mTOR i RAS/MAPK/ERK signalnih puteva mogu dovesti i do rezistencije na klasične hemioterapeutike. Još jedan od mogućih uzroka neuspeha hemioterapije je i pojava višestruke (engl. multi-drug, MDR) rezistencije. Najčešći uzrok MDR-a je povišena ekspresija P-gp i BCRP transportnih pumpi.

Cilj ove studije je bio ispitivanje uloge ključnih komponenti PI3K/AKT/mTOR i RAS/MAPK/ERK signalnih puteva u patogenezi i rezistenciji ATC. Analizirane su promene na genskom i proteinskom nivou u uzorcima pacijenata obolelih od ovog tipa karcinoma, kao i efekat inhibicije komponenti signalnih puteva kod humanih ATC ćelijskih linija. Pored toga, ispitana je i uloga P-gp i BCRP pumpi u rezistenciji ATC.

Pokazano je da su i PI3K/AKT/mTOR i RAS/MAPK/ERK signalni putevi važni za genezu ATC, kao i da se pritom međusobno isključuju. *NRAS* onkogen i *p53* tumor supresor su izmenjeni u ispitivanim tumorskim uzorcima sa visokom učestalošću. Najčešće je izmenjen *NRAS* gen što ukazuje na njegovu ključnu ulogu u razvoju ATC. Sve otkrivene mutacije u *NRAS* genu i dve mutacije u *p53* genu su po prvi put prijavljene kod ATC.

In vitro studije su pokazale da se inhibicijom komponenti RAS/MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR signalnih puteva povećava senzitivnost humanih ATC ćelija na klasičnu hemioterapiju. Najefikasnijim se pokazao dvostruki mTOR inhibitor AZD2014, kako u pojedinačnim tretmanima tako i u kombinaciji sa paklitakselom (PTX) i doksorubicinom (DOX).

Imunohistochemijska analiza P-gp i BCRP pumpi pokazala je njihovo značajno prisustvo kod ATC pacijenata što ukazuje na učešće ovih proteina u rezistenciji ATC. Sortiranjem ATC ćelija sa smanjenom akumulacijom rodamina 123 (Rho123), poznatog P-gp supstrata, uspostavljena je nova ATC ćelijska linija. Na taj način, dobijen je model koji više odgovara fenotipu uočenom kod ATC pacijenata nego komercijalne ATC ćelijske linije korišćene u ovoj studiji.. Na ovom modelu je ispitana efikasnost kombinovanog tretmanadvostrukim mTOR inhibitorom AZD2014 i PTX-om. Pokazano je da AZD2014 ne samo da povećava osetljivost ATC ćelija na PTX, već u kombinaciji sa ovim citostatikom efikasno inhibira i migraciju i invaziju ATC ćelija. Imajući u vidu da su rezistentnost i invazivnost ATC glavni uzroci loše prognoze, terapija kombinacijom dvostrukog mTOR inhibitora i PTX-a bi mogla doprineti efikasnijem lečenju pacijenata obolelih od ovog karcinoma.

KLJUČNE REČI: Anaplastični karcinom štitaste žlezde (ATC), PI3K/AKT/mTOR signalni put, RAS/MAPK/ERK signalni put, rezistencija ATC, invazivnost ATC, dvostruki mTOR inhibitor, AZD2014, paklitaksel (PTX).

OBLAST: Molekularna onkologija

UŽA OBLAST: Kancerogeneza

UDK BROJ: [[616-006.6 + 611.44] : [57.053]: 615.277 (043.3)

SUMMARY

Thyroid carcinoma is the most common malignancy of the endocrine system. Thyroid malignancies are classified according to their histopathological characteristic as papillary, follicular, medullary and anaplastic thyroid carcinoma (ATC). Most thyroid malignancies (papillary thyroid carcinoma and follicular thyroid carcinoma) are well differentiated and have favorable prognosis. On the other hand, ATC is one of the most aggressive human cancers, with an intrinsic resistance and dismal prognosis despite various therapeutic modalities. Changes in components of RAS/MAPK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways are common in thyroid cancer genesis which are resistant to classic chemotherapy agents. Changes in the activity of RAS/MAPK/ERK and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways can lead to drug resistance. Besides these changes, possible cause of chemotherapy resistance is also multi-drug resistance (MDR). The most common cause of MDR is high expression of P-gp and BCRP proteins.

The aim of this study was to investigate the role of the key components of RAS/MAPK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways in the pathogenesis and chemoresistance of ATC. We analyzed gene and protein changes in set of ATC patient samples. We also investigated the role of inhibition of RAS/MAPK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways in ATC chemosensitization using human ATC cell lines. The role of P-gp and BCRP proteins in ATC chemoresistance was also investigated.

Analysis of alterations in RAS/MAPK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways in ATC patients indicated that both pathways cooperate in the development of ATC. Our results revealed a negative correlation between the activity of RAS/MAPK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways in the samples of ATC patients. *NRAS* oncogene and *p53* tumor suppressor are mutated with high frequency in our set of ATC samples. *NRAS* is dominantly mutated gene, indicating the importance of this gene in ATC development. All detected mutations in *NRAS* gene, and two mutations in *p53* gene, have never been reported in ATC genesis before.

In vitro results suggest that the inhibition of either RAS/MAPK/ERK or PI3K/AKT/mTOR components may confer sensitivity of ATC cells to classic chemotherapeutics. Treatment with dual mTOR inhibitor, AZD2014, alone or in combination with paclitaxel (PTX) or doxorubicin (DOX) was shown to be the most effective.

Immunohistochemical analysis showed high P-gp and BCRP expression in our ATC samples, which indicates the role of these proteins in ATC chemoresistance. We sorted ATC cells with the low Rhodamin123 (Rho123) accumulation which is substrate of P-gp protein and established new ATC cell line. In this way we obtained *in vitro* model system more similar to the patients' phenotype, then commercial ATC cell lines used in this study. We investigated the potential of dual mTOR inhibitor, AZD2014 combined with PTX to sensitize this new ATC cell line. It was showed that treatment with AZD2014 not only sensitizes ATC cells to PTX, but also combined with this cytostatic, efficiently inhibits ATC cell migration and invasion. Taking into account that chemoresistance and invasiveness of ATC are the main causes of poor outcome, the application of dual mTOR inhibitor combined with PTX, seems to be a logical therapeutic strategy for patients with ATC.

KEY WORDS: Anaplastic thyroid cancer (ATC), RAS/MAPK/ERK pathway, PI3K/AKT/mTOR pathway, ATC chemoresistance, ATC invasiveness, dual mTOR inhibitor, AZD2014, paclitaxel (PTX).

RESEARCH AREA: Molecular oncology

RESEARCH FIELD: Cancerogenesis

UDC NUMBER: [[616-006.6 + 611.44] : [57.053]: 615.277 (043.3)

SKRAĆENICE

ABC - engl. ATP binding cassette (ATP vezujući transporteri)

ADP - adenzin difosfat

AKT - familija serin/treonin specifičnih protein kinaza

AP-PCR engl. Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction

ATC- engl. Anaplastic thyroid carcinoma (Anaplastični karcinom štitaste žlezde)

ATP - adenzin trifosfat

Bad - engl. Bcl-2-associated death

promoter

Bax - engl. Bcl-2-associated X protei

Bcl-2 - engl. B cell lymphoma-2 (familija proapoptotskih i antiapoptotskih proteina,)

BCRP-engl. Breast cancer resistance protein (transportna pumpa)

BSA engl. bovine serum albumine, prev. albumin goveđeg seruma

CCND1 ciklin D1 gen

CI – kombinacioni indeks

CIN engl. chromosomal instability, prev. hromozomska nestabilnost

c-Jun - pripada familiji transkripcionih

faktora ranog odgovora

c-Myc - protoonkogen (kodira transkripcione faktore, koji regulišuekspresiju velikog broja gena)

Cpt – cisplatin

DEPC - dietil pirokarbonat

DMSO dimetil sulfoksid

ddATP didezoksiadenozin-trifosfat

ddCTP didezoksicitidin-trifosfat

ddGTP didezoksiguanozin-trifosfat

ddNTP didezoksiribonukleotid-trifosfat

ddTTP didezoksitimidin-trifosfat

dNTP dezoksiribonukleotid-trifosfat

DNK dezoksiribonukleinska kiselina

DOX – doksorubicin

DTC- engl. Differentiated thyroid cancer (Diferencirani kancer štitaste žlezde)

E2F4- E2F transkripcioni faktor 4
(učestvuje u kontroli ćelijskog ciklusa i
delovanja tumor supresora)

EDTA - etilendiamin tetraacetat

EGF - engl. epidermal growth factor (epidermalni faktor rasta)

EGFR - engl. epidermal growth factor receptor (receptor za epidermalni factor rasta)

EIF4E - engl. eukaryotic translation initiation factor 4E

ELISA - engl. enzyme-linked immune sorbent assay

ERK - engl. extracellular signal-regulated protein kinases

FBS - engl. fetal bovine serum (fetalni goveđi serum)

FMCT- engl. familial medullary thyroid carcinoma

FOXO engl. forkhead box transcription factors

FTC- engl. Follicular thyroid cancer (Folikularni karcinom štitaste žlezde)

GDP - guanozin difosfat

GTP - guanozin trifosfat

HRAS- engl. Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog

HRP - engl. horseradish peroxidase

IC50 - inhibitorna koncentracija (50% inhibicije ćelijskog rasta u odnosu na kontrolu)

JNK/SAPK - engl. c-Jun amino-terminal kinases/stress-activated protein kinases

KRAS- engl. Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LOH engl. loss of heterozigosity, prev. gubitak heterozigotnosti

MAPK - engl. mitogen activated protein kinase

MDM2 engl. Murine Double Minute 2

MDR engl. multidrug resistance

MDR - engl. multidrug resistance

mdr1 - gen koji kodira P-gp

MEK - engl. mitogen-activated protein
kinase kinase

MEM – engl. minimum essential medium

MEN- engl. multiple endocrine neoplasia

MIN engl. microsatellite instability, prev. mikrosatelitska nestabilnost

MTT- engl. (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

mTOR engl. mammalian target of rapamycin

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

PBS - fosfatni pufer

PKC - engl. phosphoinositide dependent
kinase-1

PCR - engl. polymerase chain reaction
(lančana reakcija polimeraze)

P-gp - P-glikoprotein

PI3K - fosfatidil inozitol 3-kinaza

PIN - engl. point mutation instability
(nestabilnost pojedinačnih nukleotida)

PIP3 fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat

PKB engl. protein kinase B

PTEN engl. phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten

PTC – engl. Papillary thyroid cancer (Papilarni karcinom štitaste žlezde)

PTX – paklitaksel

RAS- engl. Rat sarcoma gene, proteinska familija GTP-aza

RNA ribonukleinska kiselina

SSCP engl. single strand conformation polymorfis

TBE - Tris boratni EDTA puffer

TBS- engl. Tris Buffered Saline (Tris natrijum hloridni pufer)

TKI - inhibitori tirozin kinaza

TRIS - trihidroksimetil aminometan

VEGFR - engl. Vascular endothelial growth factor receptor

wt - engl. wild type

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. KANCER – KARAKTERISTIKE	1
1.2. GENI ODGOVORNI ZA NASTANAK KANCERA	5
1.2.1. P53 I PTEN TUMOR-SUPRESORI	7
1.2.2. RAS I BRAF ONKOGENI	10
1.3. RAS/MAPK/ERK I PI3K/AKT/mTOR SIGNALNI PUTEVI	12
1.4. KANCER ŠTITASTE ŽLEZDE	16
1.4.1. EPIDEMIOLOGIJA KANCERA ŠTITASTE ŽLEZDE	16
1.4.2. KLASIFIKACIJA KANCERA ŠTITASTE ŽLEZDE	17
1.4.3. GENETIČKA OSNOVA KANCERA ŠTITASTE ŽLEZDE	18
1.5. ANAPLASTIČNI KARCINOM ŠTITASTE ŽLEZDE	21
1.6. TERAPIJA KANCERA ŠTITASTE ŽLEZDE	22
1.7. MEHANIZAM REZISTENCIJE KANCERA ŠTITASTE ŽLEZDE	24
1.8. STRATEGIJE ZA PREVAZILAŽENJE REZISTENCIJE KANCERA ŠTITASTE ŽLEZDE	26
1.8.1. AKT INHIBITOR-GSK690693	27
1.8.2. RAS INHIBITOR-TIPICARNIB	27
1.8.3. BRAF INHIBITOR-DABRAFENIB	28
1.8.4. PI3K INHIBITOR- VORTMANIN	28
1.8.5. mTOR INHIBITOR- AZD2014	29
2. CILJEVI	31
3. MATERIJAL I METODE	32
3.1. UZORCI TKIVA	32
3.1.1. IZOLACIJA DNK IZ TUMORSKOG TKIVA	32
3.1.1.1. Izolacija genomske DNK iz parafinskih preseka tumorskog tkiva	33
3.1.1.2. Provera kvaliteta DNK	33
3.1.2. ANALIZA MUTACIONOG STATUSA <i>p53</i> , <i>RAS</i> (<i>KRAS</i> , <i>HRAS</i> , <i>NRAS</i>) i <i>BRAF</i> GENA	33
3.1.2.1. PCR SSCP metoda	33
3.1.2.2. DNK sekvenciranje	35
3.1.3. IMUNOHISTOHEMIJSKA ANALIZA PTEN, pAKT, pERK, P-gp i BCRP PROTEINA	37
3.2. <i>IN VITRO</i> EKSPERIMENTALNE PROCEDURE	42
3.2.1. TERAPEUTICI	42
3.2.2. ČELIJSKE LINIJE	42
3.2.3. SORTIRANJE 8505C ČELIJSKE LINIJE SA NISKOM AKUMULACIJOM RODAMINA	43
3.2.4. ODREĐIVANJE BROJA ČELIJA	44
3.2.5. MTT TEST VIJABILNOSTI	44
3.2.5.1. Jednokratni tretman i istovremene kombinacije	45
3.2.6. ANALIZA EFEKATA DOBIJENIH KOMBINOVANJEM TERAPEUTIKA	46
3.2.7. IMUNOCITOHEMIJSKA ANALIZA PTEN, pAKT, pERK, P-gp i BCRP PROTEINA	46
3.2.8. ANALIZA AKUMULACIJE RODAMINA I EKSPRESIJE P-gp I BCRP PUMPI KOD 8505C I Rho- ČELIJA	47
3.2.9. IZOLACIJA PROTEINA IZ ČELIJA I WESTERN BLOT ANALIZA pAKT I pERK PROTEINA	48
3.2.9.1. Izolacija proteina	48
3.2.9.2. Western blot analiza	48
3.2.9.2.1. Elektroforeza proteina	48
3.2.9.2.2. Prenos proteina sa SDS-poliakrilamidnog gela na PVDF membranu i imunološka detekcija imobilizovanih proteina	49

3.2.9.2.3. Imunološka detekcija imobilizovanih proteina	50
3.2.9.2.4. Semikvantitativna analiza imunoblotova	50
3.2.10. ZARASTANJE POVREDE.....	51
3.2.11. DEGRADACIJA ŽELATINA.....	51
3.2.12. TEST INVAZIVNOSTI	53
3.2.13. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA.....	54
4. REZULTATI	55
4.1. STUDIJE NA UZORCIMA TKIVA ANAPLASTIČNOG KARCINOMA ŠTITASTE ŽLEZDE.....	55
4.1.1. ANALIZA PROMENA U <i>p53</i> TUMOR SUPRESOR GENU	55
4.1.2. ANALIZA PROMENA U <i>RAS</i> I <i>BRAF</i> ONKOGENIMA	58
4.1.3. IMUNOHISTOHEMIJSKA ANALIZA PTEN, pAKT, pERK, P-gp I BCRP PROTEINA	59
4.1.4. ANALIZA POVEZANOSTI <i>NRAS</i> , <i>p53</i> , PTEN, pAKT, pERK, P-gp I BCRP PROMENA	62
4.1.4.1. Analiza povezanosti promena u <i>NRAS</i> genu i pAKT proteinu	62
4.1.4.2. Analiza povezanosti promena u PTEN i pERK proteinskoj ekspresiji	63
4.2 <i>IN VITRO</i> STUDIJE.....	63
4.2.1. IMUNOCITOHEMIJSKA ANALIZA PTEN, pAKT, pERK I P-gp PROTEINA.....	64
4.2.2. ISPITIVANJE EFEKTA KLASIČNIH HEMIOTERAPEUTIKA I INHIBITORA RAS/MAPK/ERK I PI3K/AKT/mTOR SIGNALNIH PUTEVA NA ČELIJSKIM LINIJAMA KARCINOMA ŠTITASTE ŽLEZDE	65
4.2.3. KOMBINOVANI TRETMANI INHIBITORA SIGNALNIH PUTEVA SA KLASIČNIM HEMIOTERAPEUTICIMA	68
4.2.4. ANALIZA EKSPRESIJE P-gp I BCRP TRANSPORTNIH PUMPI KOD SORTIRANIH 8505C ČELIJA SA NISKOM AKUMULACIJOM RODAMINA.....	70
4.2.5. ANALIZA EKSPRESIJE pAKT I pERK PROTEINA U 8505C I Rho- ČELIJAMA	72
4.2.6. UPOREĐIVANJE EFEKATA PTX-a I AZD2014 NA 8505C I Rho- ČELIJSKIM LINIJAMA	74
4.2.7. EFEKAT AZD2014 NA SENZITIZACIJU 8505C I Rho- ČELIJA NA PTX	74
4.2.8. RAZLIKE U INVAZIVNIM KARAKTERISTIKAMA 8505C I Rho- ČELIJA	76
4.2.9. EFEKAT AZD2014 I PTX-a, KAO I NJIHOVE KOMBINACIJE NA INHIBICIJU MIGRACIJE I INVAZIJE	79
5. DISKUSIJA.....	84
5.1. ULOGA RAS/MAPK/ERK I PI3K/AKT/MTOR SIGNALNIH PUTEVA U PATOGENEZI ATC.....	84
5.2. ULOGA RAS/MAPK/ERK I PI3K/AKT/mTOR SIGNALNIH PUTEVA U REZISTENCIJI NA KLASIČNE HEMIOTERAPEUTIKE.....	88
5.3. MDR FENOTIP ANAPLASTIČNOG KARCINOMA ŠTITASTE ŽLEZDE	92
5.4. ULOGA PI3K/AKT/mTOR PUTA U INVAZIJI ATC ČELIJA	94
6. ZAKLJUČCI	96
LITERATURA	99

1. UVOD

1.1 . KANCER – KARAKTERISTIKE

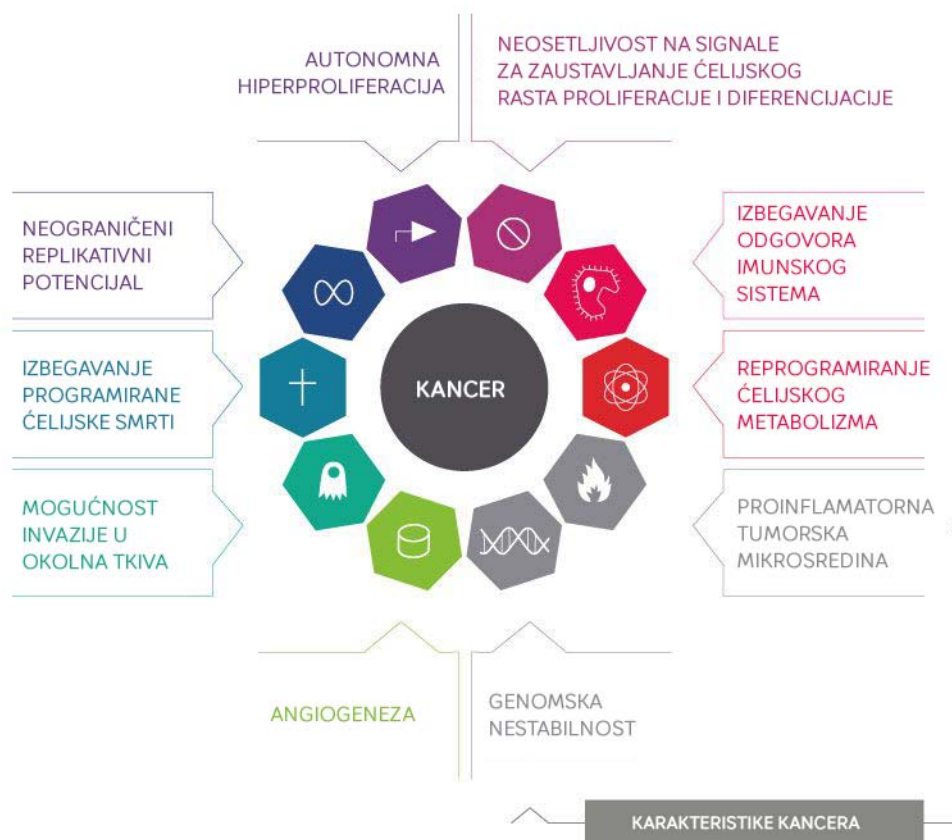
Kancer je oboljenje koje karakteriše nekontrolisana deoba ćelija uzrokovana mutacijama u ćelijskoj DNK. Akumulacijom mutacija u delovima genoma, normalna ćelija prolazi kroz proces transformacije i nastaje kancer. Iako je u normalnim okolnostima ćelijski ciklus svih ćelija višćelijskog organizma pod strogom kontrolom kojom se obezbeđuje pravilno funkcionisanje celog sistema, progenitorske ćelije kancera uspevaju da prevaziđu ove mehanizme usled genetičkih promena kojima se obezbeđuje sticanje novih svojstava: nekontrolisani rast i proliferacija (Hanahan i Weinberg, 2000).

Uzroci nastanka kancera pored genetičkih promena su i uticaji faktora životne sredine, način života i klinička istorija. Svi navedeni činioci zajednički dovode do progresije maligniteta u dugotrajnom višefaznom procesu u kome dolazi do akumulacije genskih promena i progresivne transformacije normalnih ćelija u maligne. Kancerogeneza je proces transformacije ćelija tokom koga one stiču niz novih osobina (Slika 1) (Hanahan i Weinberg, 2011):

- 1) **Autonomna hiperproliferacija** – obezbeđuje se autokrinom produkcijom faktora rasta usled prekomerne ekspresije ili mutacione aktivacije receptora za faktore rasta ili konstantne mutacione aktivacije signalnih puteva nizvodno od ovih receptora koji vode ćeliju u proliferaciju;
- 2) **Neosetljivost na signale za zaustavljanje ćelijskog rasta, proliferacije i diferencijacije** – posledica promena u regulatornim i efektornim molekulima ćelijskog ciklusa;
- 3) **Izbegavanje programirane ćelijske smrti – apoptoze** koja predstavlja prirodni mehanizam odbrane od brojnih fizioloških stresora koji mogu dovesti do onkogeneze;
- 4) **Neograničeni replikativni potencijal** – sposobnost izbegavanja faze mirovanja (engl. *senescence*) ili programirane ćelijske smrti, što je regulisano skraćivanjem telomera tokom svake deobe. Na ovaj način se stiče sposobnost neograničene replikacije tumorskih ćelija.

- 5) **Proces angiogeneze** – proces stvaranja novih krvnih sudova koji omogućavaju priliv hranljivih materija tumorskom tkivu;
- 6) **Mogućnost invazije i širenja u okolna tkiva** – sposobnost lučenja vanćelijskih proteaza koje degradiraju vanćelijski matriks i sposobnost formiranja metastaza. Invazivnost podrazumeva sposobnost širenja tumora u okolna tkiva, a formiranje metastaza podrazumeva formiranje udaljene sekundarne tumorske mase, poreklom od ćelija primarnog tumora;
- 7) **Izbegavanje odgovora imunskog sistema** – omogućava preživljavanje tumorskih ćelija uprkos imunskom odgovoru organizma;
- 8) **Sposobnost reprogramiranja ćelijskog metabolizma** – omogućava opstanak tumora u anaerobnim uslovima;

U osnovi svih ovih promena leži izražena **genomska nestabilnost** kao i **postojanje proinflamatorne mikrosredine** koja dovodi do krucijalnih promena u tumorskoj mikrosredini (regrutovanje fibroblasta, migracija imunih ćelija, remodelovanje matriksa), što pospešuje proces dalje transformacije ćelija (Hanahan i Weinberg, 2011). Genomska nestabilnost dovodi do povećanja heterogenosti unutar tumorske mase, čime se stvaraju uslovi za selektivnu klonalnu ekspanziju u zavisnosti od uticaja spoljašnje sredine (Cahill i saradnici, 1999).



Slika 1. Šematski prikaz osnovnih karakteristika kancera. Pored osam osnovnih, na šemi su predstavljene karakteristike koje leže u osnovi nastanka kancera: genomska nestabilnost i proinflamatorna tumorska mikrosredina. (Preuzeto i modificirano prema Hanahan i Weinberg, 2011).

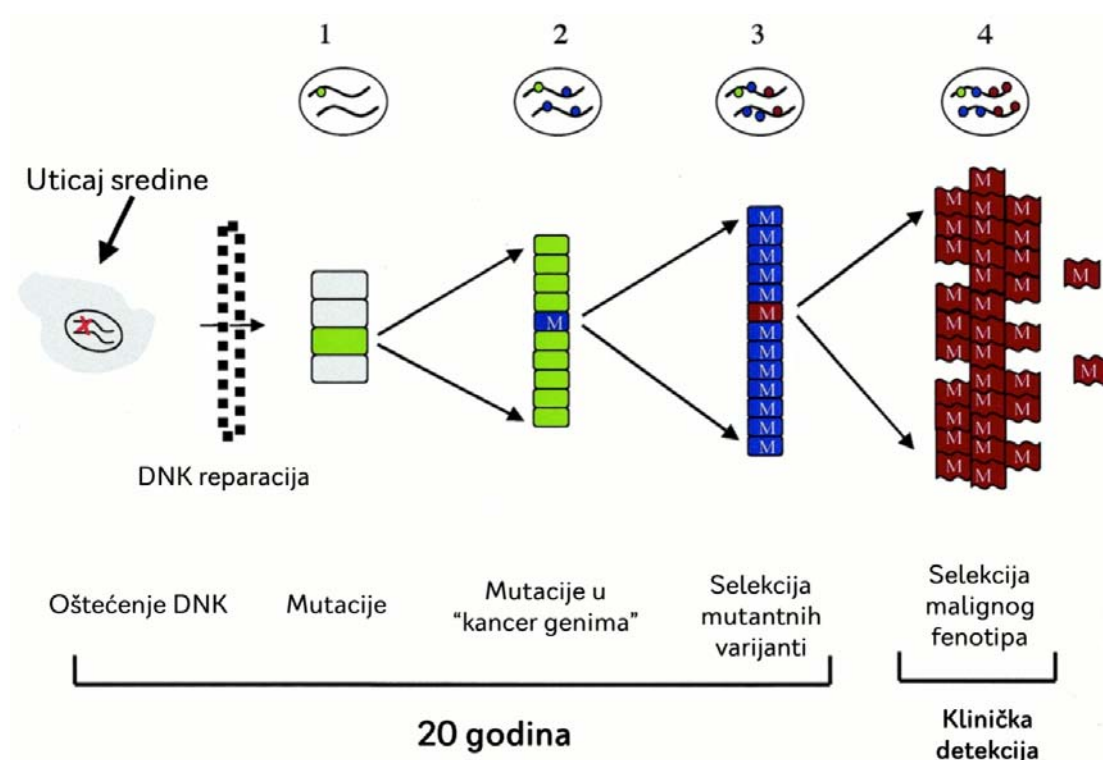
Iako se smatra da je većina tumora monoklonskog porekla odnosno da nastaju od jedne progenitorske ćelije koja je stekla sposobnost nekontrolisane, kontinuirane proliferacije (Nowell, 1976), tumori su ipak mnogo više od homogene izolovane mase proliferišućih tumorskih ćelija. Tumori su složena tkiva sastavljena od više različitih tipova ćelija koje učestvuju u međusobnim interakcijama kao i interakcijama sa okolnim tkivom. Heterogenost tumorske mase se ogleda kroz prisustvo velikog broja različitih podgrupacija ćelija među kojima postoji velika genetička raznolikost (Marusyk i Polyak, 2010). Pored heterogenosti ćelija kancera, maligni tumori se sastoje i od normalnih ćelija strome kao i vanćelijskog matriksa (Diaz-Cano, 2008). Različiti sredinski i unutrašnji faktori dovode do pojave oštećenja DNK u genomu čiji broj prevazilazi kapacitete ćelijskog sistema za popravku i nastaju mutacije. Broj mutacija u tumorskim ćelijama prevazilazi spontanu stopu mutacija i objašnjava se postojanjem “mutatorskog fenotipa” kao posledice nasumičnih promena u genomu kod prekanceroznih ćelija (Loeb, 2001). Ovaj fenotip

je posledica mutacija u genima odgovornim za očuvanje stabilnosti genoma što dovodi do povećane stope mutacija u ćeliji (tačkastih mutacija, promena u kratkim ponavljajućim sekvencama DNK (mikrosatelitske sekvence), kariotipskih promena, velikih hromozomskih rearanžmana i gubitka heterozigotnosti brojnih gena (engl. *loss of heterozygosity* - *LOH*) (Loeb i saradnici, 2003). Samo određene kombinacije ovih mutacija će pružiti selektivnu prednost tumorskim ćelijama, dok će većina novih mutantnih varijanti biti eliminisana usled selektivnog pritiska. Samim tim razvoj tumora se odvija uzastopnim ciklusima deoba, mutiranjem novih ćelijskih klonova i njihove prirodne selekcije (Slika 2). Sve navedene promene predstavljaju manifestaciju genomske nestabilnosti, jedne od osnovnih karakteristika tumorskih ćelija i glavnog mehanizma za sticanje novih osobina potrebnih za kancerogenezu (Pikor i saradnici, 2013). Postoji više tipova genomske nestabilnosti u zavisnosti od tipa genomskih promena:

- 1) **Hromozomska nestabilnost (CIN)** – karakteriše se promenama u broju i strukturi hromozoma i definiše kao povećana stopa hromozomskih promena koja dovodi do kontinuiranog rasta ćelija (Pikor i saradnici, 2013);
- 2) **Mikrosatelitska nestabilnost (MIN)** – karakteriše se promenom broja oligonukleotidnih ponovaka u mikrosatelitima (Brentnall, 1995). Smatra se da je nastanak MIN uzrokovan gubitkom funkcije sistema za popravku pogrešno sparenih baza (engl. *mismatch repair*, MMR) (Diaz, 2005);
- 3) **Nukleotidna nestabilnost (SNI)** – karakteriše se povećanom stopom nasumičnih tačkastih mutacija u genomu malignih ćelija (Watanabe i saradnici, 2001).

Pokazano je da epitelni tumori obično imaju veći stepen genomske nestabilnosti od hematoloških kancera (Pikor i saradnici, 2013), što nas dovodi do podele kancera prema tipu ćelija od kojih nastaju, odnosno prema tipu tkiva na :

1. karcinome – poreklom od epitelijalnih ćelija;
2. sarkome – nastaju od mezenhimalnih ćelija vezivnog tkiva;
3. leukemije i limfome – vode poreklo od ćelija hematopoetskog tkiva;
4. melanome – nastaju od melanocita;
5. neuroektodermalni tumori – vode poreklo od ćelija embrionalnog neuroektoderma koje daje komponente centralnog i perifernog nervnog sistema (Vogelstein i Kinzler, 2004).



Slika 2. Akumulacija mutacija tokom progresije tumora. Različiti sredinski i unutrašnji faktori dovode do pojave oštećenja DNK u genomu. Veliki broj mutacija prevazilazi kapacitete ćelijskog sistema za reparaciju. Mutacije u mutator genima tj. genima odgovornim za stabilnost genoma povećavaju stopu mutacija i omogućavaju klonalnu ekspanziju i nastanak malignog fenotipa (označeno crvenom bojom), pri čemu neke ćelije stiču i metastatski potencijal. (Preuzeto i modifikovano prema Loeb i saradnici, 2001).

1.2. GENI ODGOVORNI ZA NASTANAK KANCERA

Promene odgovorne za nastanak ćelija kancera dešavaju se u tri glavne grupe gena. Prvu grupu čine već pomenuti geni odgovorni za očuvanje stabilnosti genoma, koji regulišu stopu mutacija u ćeliji. To su geni čije alteracije predstavljaju osnov za razvoj genomske nestabilnosti. U njih spadaju geni zaduženi za regulaciju procesa pravilne rekombinacije i segregacije hromozoma tokom mitoze kao i geni odgovorni za popravku DNK oštećenja. Ovi geni za očuvanje stabilnosti genoma održavaju stepen genetičkih alteracija na minimumu pa se u slučaju njihove inaktivacije povećava genomska nestabilnost i raste stopa mutacija u svim ostalim genima. Međutim do razvoja kancera dolazi samo ukoliko se mutacije nagomilavaju u dve

specifične grupe gena tzv. protoonkogenima i tumor-supresor genima koji su direktno odgovorni za regulaciju stope ćelijske deobe i smrti (Vogelstein i Kinzler, 2004).

Protoonkogeni su evolutivno visoko konzervirani geni koji su sastavni deo genoma svake ćelije i predstavljaju fiziološke regulatore ćelijske proliferacije i diferencijacije (Lee i Muller, 2010). Zavisno od ćelijske funkcije proteinski produkti ovih gena dele se u šest grupa: transkripcione faktore, proteine koji remodeliraju hromatin, faktore rasta, receptore za faktore rasta, prenosioce signala unutar ćelije i regulatore apoptoze. Tokom kancerogeneze strukturne alteracije u protoonkogenima kao što su hromozomski rearanžmani (inverzije i translokacije), tačkaste mutacije ili genske amplifikacije dovode do transformacije ovih gena u onkogene (Croce, 2008). Onkogeni su izmenjena forma protoonkogeni koja se prekomerno eksprimira i doprinosi nekontrolisanoj deobi ćelija (Lee i Muller, 2010). Promene u samo jednom alelu protoonkogeni dovode do prekomerne ekspresije ovih gena i samim tim vode u neoplastičnu transformaciju ćelije (Croce, 2008).

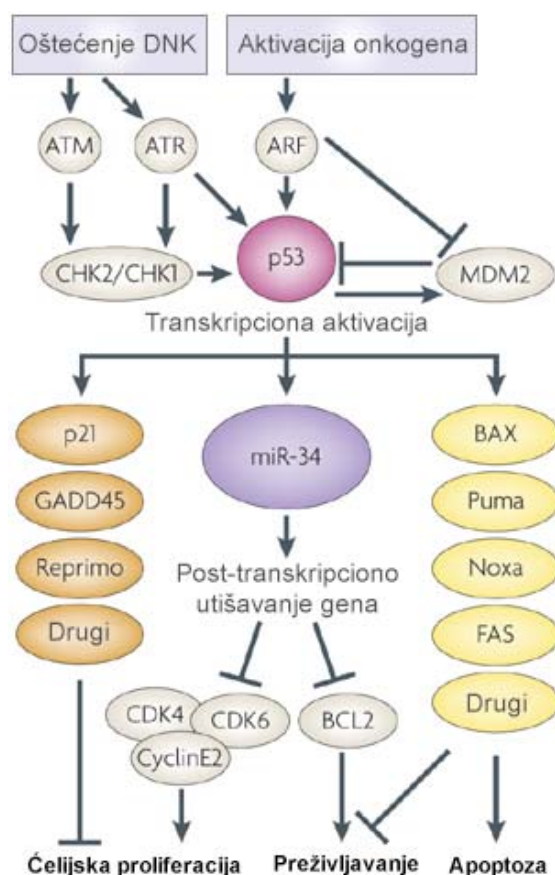
Tumor-supresori su geni odgovorni za inhibiciju ćelijskog rasta i deobe kao i promociju ćelijske smrti. Promene kao što su tačkaste mutacije, delecije ili epigenetičko utišavanje u ovim genima dovode do njihove smanjene aktivnosti ili potpunog gubitka funkcije, čime doprinose kancerogenezi (Vogelstein i Kinzler, 2004). Za razliku od onkogeni koji se smatraju dominantnim genima prema fenotipskom ispoljavanju, tumor-supresor geni imaju svojstvo recesivnih gena i po Knudson-ovoj hipotezi za njihovu inaktivaciju su potrebna dva mutaciona događaja, po jedan na oba alela (Knudson, 1971). Kod naslednih formi kancera prva mutacija pogađa jedan od alela u germinativnoj ćeliji dok se drugi mutacioni događaj javlja u somatskoj ćeliji, a kod sporadičnih kancera oba mutaciona događaja se dešavaju u genomu somatske ćelije (Yu i saradnici, 2002). Kod pojedinih tumor-supresor gena kao što su *p53* i *PTEN* dovoljna je monoalelska mutacija, delecija ili hipermetilacija za njihovu inaktivaciju i ovaj fenomen je definisan kao haploinsuficijencija. Haploinsuficijencija jednog tumor-supresor gena može biti praćena istom pojavom i kod ostalih gena u okolini tako da oni kooperativno učestvuju u kancerogenezi što se označava kao pojam kombinovane haploinsuficijencije (Payne i Kemp, 2005; Smilenov i saradnici, 2005).

Među najčešće inaktiviranim tumor-supresorima se posebno izdvajaju *p53* i *PTEN* tumor-supresori dok su neki od često izmenjenih onkogeni kod kancera *RAS* i *BRAF* onkogeni.

1.2.1. P53 I PTEN TUMOR-SUPRESORI

Tumor supresor *p53* označava se kao univerzalni „čuvar genoma“. Inaktiviran je u više od 50% humanih maligniteta. Mutacije u *p53* genu mogu biti i nasledne. Primer je Li-Fraumeni sindrom koji se javlja vrlo često u nekim porodicama. Mnogi članovi ovih porodica imaju mutacije u jednom od *p53* alela, a karakteriše ih sklonost ka osteosarkomima, adrenokortikalnim karcinomima ili kancerima mozga, često vrlo rano tokom života (Frebourg i saradnici, 1995). Gen koji kodira *p53* tumor-supresor se nalazi na 17-tom hromozomu, a protein se sastoji od 393 amino kiseline. Ovaj tumor supresor je nuklearni fosfoprotein, veličine 53-kDa koji ima pet glavnih domena: centralni DNK-vezujući domen sa visoko konzerviranim sekvencama, N-terminalni transaktivirajući domen koji je odgovoran za interakciju sa drugim regulatornim proteinima, prolinom bogat region koji takođe ima regulatornu ulogu kao i C-terminalni domen i peti domen je oligomerizacioni i neophodan je za stvaranje funkcionalnih tetramera (Morris, 2002). Protein *p53* je transkripcioni faktor koji reguliše ćelijski ciklus aktivacijom transkripcije gena koji isti zaustavljaju u G1 fazi ćelijskog ciklusa (kada je genom oštećen) i aktivira apoptozu pod određenim uslovima (Fridman i Lowe, 2003; Levine i saradnici, 2006). Neki od gena koje aktivira *p53* transkripcioni faktor su *WAF1* (kontroluje ćelijski ciklus), *MDM2* (inhibira *p53*), *GADD45* (kontroluje popravku DNK), *Bax* (kontroluje apoptozu), a oni koje inhibira su onkogeni *c-Myc* i *bcl-2* (Tada i saradnici, 2001). Stoga su najbitnije funkcije *p53* gena regulacija osnovnih ćelijskih procesa, pre svega reparacije DNK molekula, kontrolisanje ćelijskog ciklusa, proliferacije i diferencijacije. Prilikom proučavanja uloge *p53* proteina moraju se uzeti u obzir interakcije brojnih komponenti signalnih puteva u koje je on uključen (Slika 3). Ukoliko dođe do akumulacije genetskih grešaka, aktivacija *p53* gena predstavlja fiziološki odgovor na ćelijski stres, tj. mehanizam uklanjanja oštećenih ćelija sprečavanjem njihove proliferacije i uvođenjem u apoptozu, zbog čega je i poznat pod nazivom „čuvar ćelijskog genoma“ (Vogelstein i saradnici, 2000). U normalnim fiziološkim uslovima, ovaj protein je slabo zastupljen usled kratkog poluživota (20-30 minuta). Degradacija *p53* proteina je ubikvitin zavisna i regulisana povratnom

spregom preko MDM2 (engl. Murine Double Minute 2) proteina čije vezivanje blokira njegovu transkripcionu aktivnost i predstavlja signal za njegovu ubikvitinaciju i dalju proteolizu (Fuster i saradnici, 2007). Zahvaljući navedenim funkcijama p53 predstavlja prepreku u razvoju tumora, što objašnjava visok stepen njegove inaktivacije u skoro svim tipovima tumora. Najčešće promene p53 tumor-supresora su tačkaste mutacije u samom genu, gubitak kratkog kraka hromozoma 17 i amplifikacija MDM2 (Baker i saradnici, 1989), što dovodi do smanjenja njegove koncentracije u ćeliji (Haupt i saradnici, 1997). Većina promena u *p53* genu su u DNK-vezujućem domenu i to u okviru egzona 5-9. Određene mutacije ovog gena mogu da dovedu i do sticanja novih onkogenih funkcija (engl. *gain-of-function*) koje do tada wt (engl. *wild type*) protein nije imao, zbog čega efekti ovog molekula u ćeliji postaju još složeniji (Brosh i Rotter, 2009).

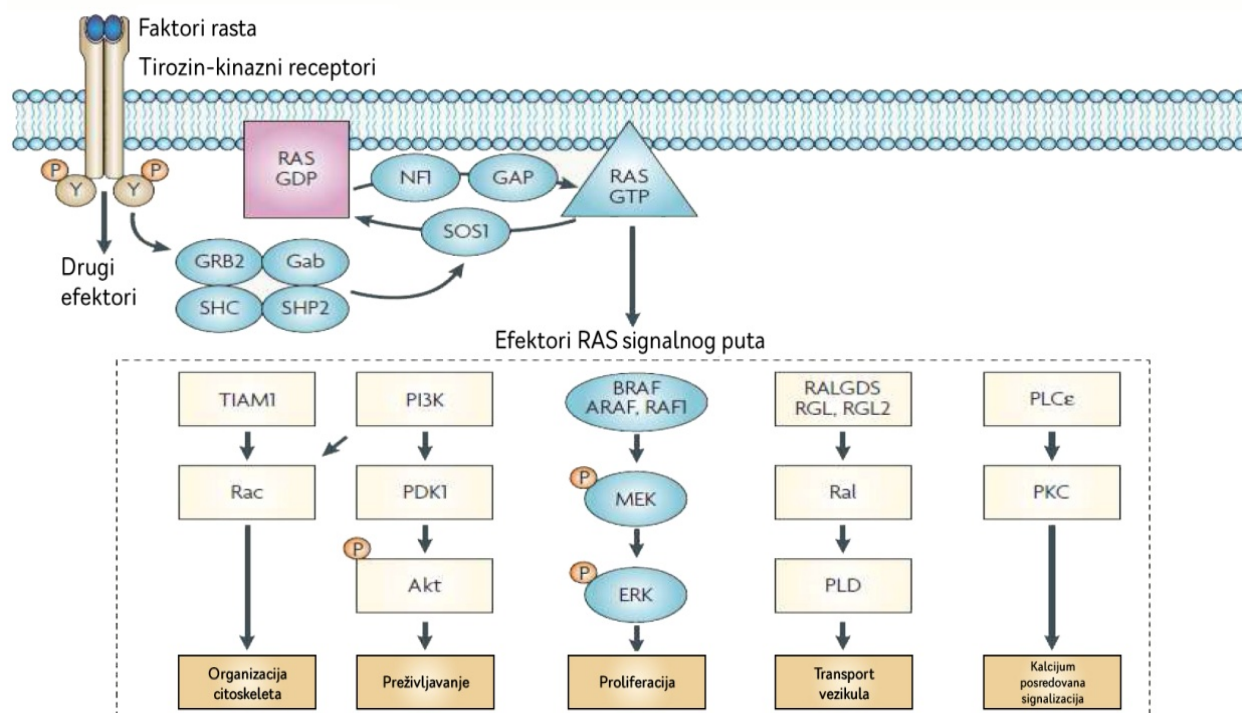


Slika 3. Mreža signalnih puteva p53 tumor supresora i ćelijski procesi koje reguliše. (Preuzeto i modifikovano prema He i saradnici, 2007).

PTEN je tumor-supresor čiji je gen lociran na hromozomu 10 (10q23), a inaktiviran je u brojnim sporadičnim tumorima. Nasledne mutacije u ovom genu uzrokuju pojavu različitih oboljenja (Cowdenov sindrom, Lhermitte-Duclos-ova bolest, retki juvenilni polipozni sindromi) koja, između ostalog, imaju i izraženu predispoziciju za pojavu višestrukih tumora upravo zbog mutacija u ovom genu. Zbog visoke učestalosti mutacije ovog gena u sporadičnim karcinomima on je odmah posle *p53* gena najčešće mutiran tumor-supresor (Waite i Eng, 2002). Visoku incidencu inaktivacije *PTEN*-a među sporadičnim kancerima imaju glioblastomi, karcinomi endometrijuma, karcinomi prostate, melanomi i karcinomi dojke (Simpson i Parsons, 2001). Aktivnost *PTEN*-a je određena njegovim tirozin-fosfataznim domenom koji pokazuje dvostruki afinitet, te funkcioniše kao lipidna i proteinska fosfataza. Glavni ciljni molekul njegovog dejstva je PIP3 (fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat), stoga je ovaj gen ključni negativni regulator PI3K/AKT/mTOR signalnog puta. *PTEN* utiče na stabilnost *p53* proteina preko AKT posredovane fosforilacije MDM2 ali i direktnom interakcijom sa samim *p53* proteinom (Blanco-Aparicio i saradnici, 2007). *PTEN* tumor-supresor učestvuje i u regulaciji procesa ćelijske adhezije i migracije preko defosforilacije fokalne adhezione kinaze (FAK) i adaptarnog proteina Shc (Yamada i Araki, 2001). U većini tumora gubitkom heterozigotnosti dolazi do eliminacije oba alela *PTEN*-a, pri čemu se potpuno gubi njegova ekspresija što je u skladu sa Knudson-ovom hipotezom. Gubitak heterozigotnosti *PTEN*-a je prisutan u velikom procentu kod glioblastoma i endometrijalnih karcinoma (Furnari i saradnici, 2007; Kolasa i saradnici, 2006). U drugim vrstama tumora promene u samo jednom alelu ovog gena bilo da se radi o mutacijama, transkripcionoj represiji, epigenetičkim ili posttranslacionim mehanizmima dovode do parcijalne inaktivacije *PTEN*-a i samim tim smanjene ekspresije ovog gena. Ovo je fenomen haploinsuficijencije. Haploinsuficijencija ovog tumor supresora pokazana je u brojnim sporadičnim tumorima kao i kod Cowdenov-og sindroma gde pojedini tumori koji se javljaju u okviru sindroma pokazuju upravo smanjenu aktivnost *PTEN*-a usled promena u samo jednom alelu (Podsypanina i saradnici, 1999; Suzuki i saradnici, 1998).

1.2.2. RAS I BRAF ONKOGENI

RAS je najčešći onkogen humanih maligniteta. Geni koji kodiraju *RAS* onkoproteine otkriveni su pre 4 decenije u transformišućim retrovirusima koji indukuju sarkome kod pacova (Harvey, 1964; Kirsten i saradnici, 1970). Sisarski homolozi ovih viralnih onkogenata (protoonkogeni) otkriveni su nakon 10 godina (Chang i saradnici, 1982). Članovi familije *RAS* gena su *KRAS*, *HRAS* i *NRAS* koji se u humanom genomu nalaze na dugom kraku 12-og, 11-og i 1-og hromozoma. Kodiraju familiju proteina slične biološke funkcije i molekulske mase oko 21kDa. Svi članovi *RAS* proteinske familije pripadaju klasi malih GTP-aza i učestvuju u prenosu signala u ćelijama. Proteini *RAS* familije se sastoje iz 2 funkcionalna domena: N terminalnog regulatornog domena i C terminalnog kinaznog domena (Jancik i saradnici, 2010). Produkti *RAS* gena se vezuju za mnogobrojne nizvodne prenosioce signala i odgovorni su za kontrolu i modulaciju *RAS*/MAPK/ERK, PI3K/AKT/mTOR i JNK signalnih puteva koji regulišu procese ćelijskog rasta, diferencijacije, migracije, angiogeneze i maligne transformacije (Slika 4) (Stites i saradnici, 2007). Mutacije u bilo kojoj od tri navedene izoforme *RAS* protoonkogenata su čest događaj u kancerogenezi i dovode do permanentne aktivacije *RAS* proteina što uzrokuje aktivnu ćelijsku signalizaciju u odsustvu spoljašnjih signala. Aktivirajuće mutacije *RAS* gena su nađene u 30% svih humanih tumora. Najčešće promene *RAS* gena su tačkaste mutacije u 12-om, 13-om i 61-om kodonu, usled čega protein gubi GTP-aznu aktivnost, što za posledicu ima produženo trajanje signalizacije i dalje "pobuđivanje" kaskadne fosforilacije nezavisno od spoljašnjih signala. Mutacije u *RAS* izoformama su specifične za određeni tip tumora pa su tako mutacije u *KRAS* genu karakteristične za tumor pankreasa, kolona i pluća ali nisu česte u tumorima bešike gde preovlađuju mutacije u *HRAS* izoformi. Visoka učestalost *NRAS* mutacija je karakteristična za hematopoetske tumore i maligne melanome gde je učestalost mutacija u *KRAS* i *HRAS* izoformama zanemarljiva (Fernandez-Medarde i Santos, 2011). Nasledne mutacije u ovom genu uzrokuju pojavu različitih oboljenja tzv. rasopatija (Neurofibromatoza tip 1, Leopard sindrom, Noonan sindrom, Costello i Legius sindromi) koja, između ostalog, imaju i izraženu predispoziciju za pojavu višestrukih tumora upravo zbog mutacija u ovom genu (Tidyman i Rauen, 2009).



Slika 4. Šematski prikaz RAS signalnih puteva. (Preuzeto i modifikovano prema Schubert i saradnici, 2007).

BRAF protoonkogen je lociran na dugom kraku hromozoma 7. Sastoji se iz 18 egzona. Produkt ovog gena je protein kinaza veličine 766 aminokiselina. BRAF protein kinaza je jedan od glavnih efektoru nizvodno od RAS-a u RAS/MAPK/ERK signalnom putu (Phillips i saradnici, 2010). BRAF pripada familiji RAF proteina koja obuhvata još dve serin/treonin protein kinaze: ARAF i RAF-1/CRAF. Strukturno kod ovih proteina se mogu razlikovati dva funkcionalna domena: N-terminalni regulatorni i C-terminalni kinazni domen. U neaktivnoj konformaciji, smatra se da RAF formira zatvorenu strukturu u kojoj regulatorni domen interaguje sa kinaznim domenom (Wan i saradnici, 2004). Ove kinaze se aktiviraju u ćeliji na GTP-zavisan način od strane RAS proteina i njihova funkcija je aktiviranje RAS/MAPK/ERK signalnog puta kojim se prenose signali koji regulišu ćelijsku diferencijaciju, proliferaciju, apoptozu i angiogenezu (Vakiani i Solit, 2011). *BRAF* gen je izmenjen tačkastim mutacijama u različitim tipovima tumora. Izmenjena forma *BRAF*-a je detektovana u oko 70% melanoma, 30-69% tiroidnih tumora, 15-30% ovarijalnih, 10-15% kolorektalnih, kao i u manjem procentu u drugim kancerima (pluća, akutne leukemije, limfomi itd.) (Cohen i saradnici, 2003; Davies i saradnici, 2002; Kumar i saradnici, 2003). Najčešća promena BRAF gena je mutacija u kodonu 600, usled čega na proteinskom

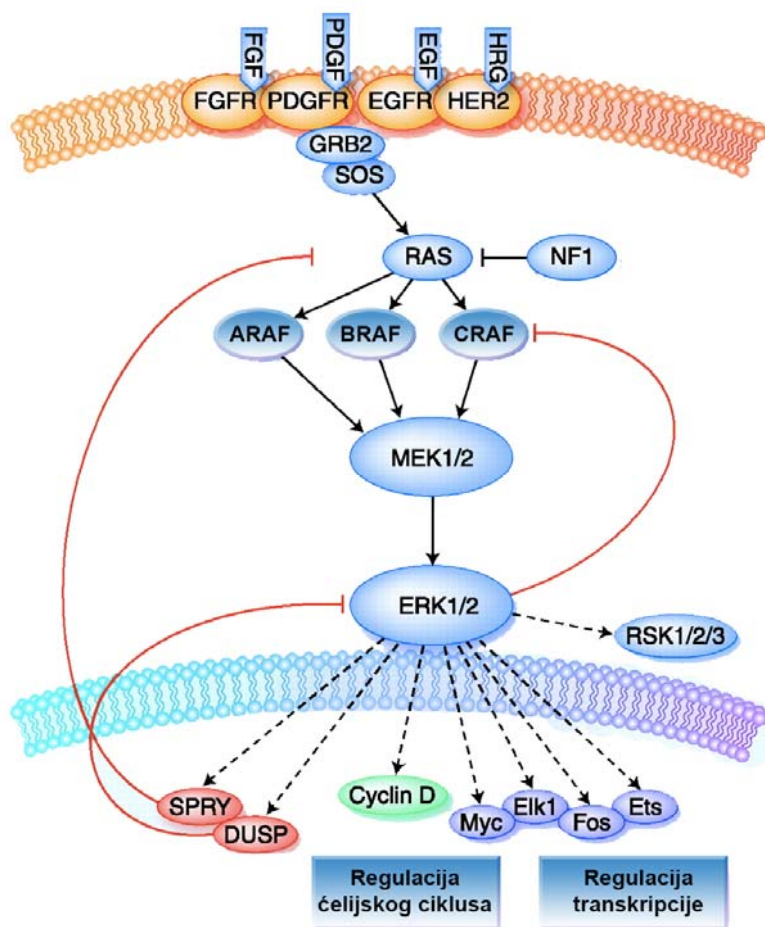
nivou dolazi do substitucije valina glutamatskom kiselinom (V600E). Ova promena čini oko 90% svih *BRAF* besmislenih (engl. *missense*) mutacija koje se javljaju u humanim malignitetima (Davies i saradnici, 2002; Kumar i saradnici, 2003). V600E mutacija dovodi do konstitutivne kinazne aktivacije BRAF-a (Wan i saradnici, 2004). U pojedinim tumorima kao što su maligni melanomi pokazano je da su mutacije *RAS* i *BRAF* gena međusobno isključive najverovatnije zbog toga što promene u ovim genima aktiviraju zajednički set nizvodnih efektorskih molekula koji utiču na transformaciju ćelije (Fernandez-Medarde i Santos, 2011; Vakiani i Solit, 2011).

1.3. RAS/MAPK/ERK I PI3K/AKT/mTOR SIGNALNI PUTEVI

Kao što je već naznačeno, pomenuti onkogeni i tumor-supresori predstavljaju komponente RAS/MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR signalnih puteva ćelije koji kontrolišu ćelijski ciklus, apoptozu, integritet genoma, morfogenezu, proliferaciju, diferencijaciju i metabolizam ćelije. Upravo zbog navedenih uloga u glavnim ćelijskim procesima promene u ovim signalnim putevima karakterišu nastanak mnogih maligniteta (Mendoza i saradnici, 2011).

RAS/MAPK/ERK signalni put reguliše procese ćelijske deobe, preživljavanja i apoptoze. Spoljašnji signali kao što su citokini, faktori rasta i mitogeni vezujući se za odgovarajuće receptore dovode do konformacione promene RAS proteina koji prelazi iz neaktivnog GDP u aktivno GTP stanje čime se omogućava njegova interakcija sa RAF proteinom (McCubrey i saradnici, 2007). Kao što je već pomenuto RAF protein je serin/treonin kinaza koja fosforiliše i aktivira mitogen-aktiviranu protein kinazu 1 (MEK1). Sva tri člana familije RAF proteina (ARAF, BRAF i CRAF) aktiviraju MEK1, ali sa različitim biohemijskim potencijalom. Najveći biohemijski potencijal poseduje BRAF koji za aktivaciju, za razliku od ARAF-a i CRAF-a, ne zahteva pored RAS-a i dodatnu fosforilaciju na poziciji tirozina od strane SRC-a (Mason i saradnici, 1999). Zbog svog biohemijskog potencijala pretpostavlja se da je BRAF glavni aktivator nizvodnog MEK-a i primarni cilj onkogenog RAS-a (Marais i saradnici, 1997). MEK1 je tirozin i serin/treonin kinaza, čiji je prvenstveni cilj molekul kinaza regulisana ekstraćelijskim signalima (ERK) (Alessi i saradnici, 1994). Aktivirani ERK se prebacuje u jedro i dalje fosforiliše i aktivira brojne transkripcione faktore (Elk-1, c-Myc, c-Jun) koji se vezuju za promotore brojnih gena, uključujući gene za

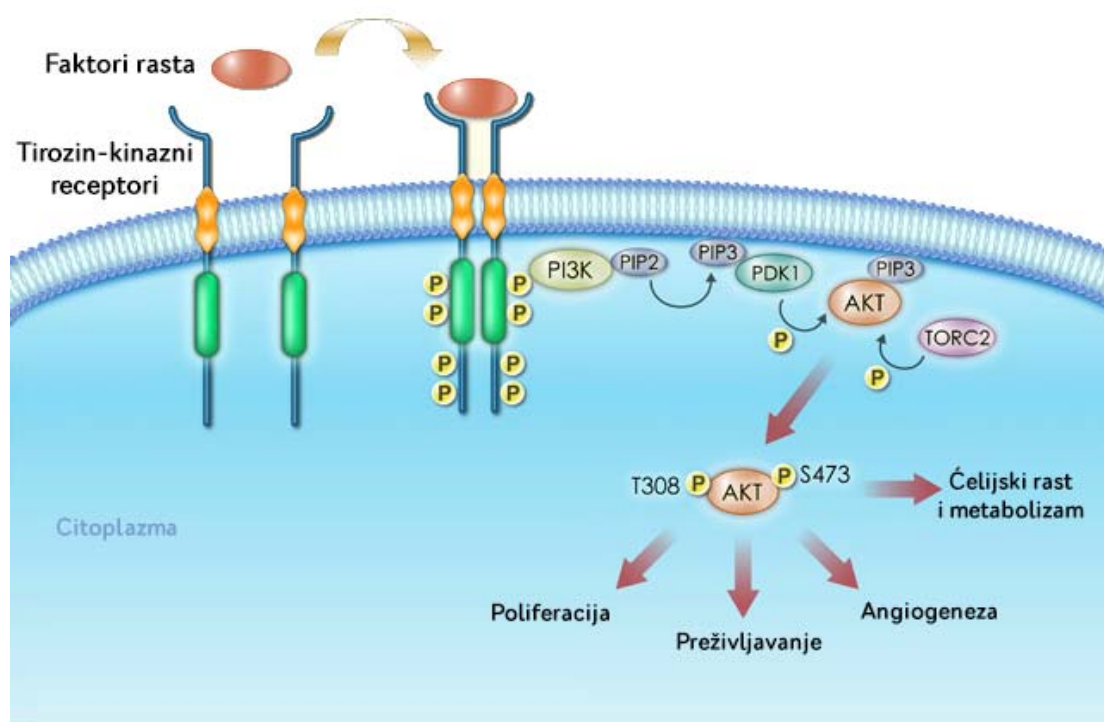
faktore rasta i citokine koji su veoma značajni u promovisanju rasta ćelije (Slika 5) (Steelman i saradnici, 2011). RAS/MAPK/ERK signalni put reguliše i apoptozu post-translacionom fosforilacijom regulatornih molekula apoptoze kao što su Bad, kaspaza 9 i Bcl-2 (McCubrey i saradnici, 2007). Mutacije ili prekomerna ekspresija receptora kao što su RET ili receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR) takodje dovode do aktivacije RAS/MAPK/ERK signalnog puta (Steelman i saradnici, 2004).



Slika 5. RAS/MAPK/ERK signalni put. Nakon vezivanja faktora rasta za tirozin-kinazne receptore, aktivira se RAS/MAPK/ERK signalni put koji dovodi do fosforilacije odgovarajućih ciljnih molekula u jedru, što pokreće ćelijsku deobu i proliferaciju (Preuzeto i modifikovano prema Pratilas i Solit, 2010).

PI3K/AKT/mTOR signalni put ima važnu ulogu u proliferaciji, preživljavanju i rezistenciji na apoptozu. Fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI3K) i njen ciljni molekul AKT važni su nishodni efektori tirozin-kinaznih receptora. Vezivanjem faktora rasta

za receptore sa tirozin-kinaznom aktivnošću, aktivira se enzim fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI3K) koji zatim fosforiliše membranski lipid fosfatidilinozitol 3,4-bifosfat (PIP2) i prevodi ga u fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat (PIP3). PIP3 funkcioniše kao sekundarni ćelijski glasnik i dovodi do vezivanja fosfatidilinozitol zavisne kinaze 1 (PDK1) i AKT kinaze za membranu. PDK1 fosforiliše i aktivira AKT. AKT kinaza ili protein kinaza B (PKB/AKT) je serin/treonin kinaza koja se sastoji iz tri homologa člana: PKBalfa (AKT1), PKBbeta (AKT2), i PKBgama (AKT3). Aktivirani AKT se prebacuje u citoplazmu i jedro, gde fosforiliše i aktivira brojne ciljane molekule uključene u regulaciju ćelijskih procesa preživljavanja i proliferacije (Slika 6) (Fresno Vara i saradnici, 2004). AKT posreduje i u inhibiciji aktivacije proapoptotskih proteina kao što su kaspaza 3 i 9 čime dovodi do rezistencije na apoptozu što je važan faktor u kancerogenezi (Zhou i saradnici, 2009).



Slika 6. PI3K/AKT/mTOR signalni put. Tirozin-kinazni receptor aktivira PI3K kompleks koji transformiše PIP2 u PIP3. PIP3 je odgovoran za vezivanje PDK1 i AKT za membranu gde PDK1 fosforiliše i aktivira AKT. Aktivirani AKT nishodno moduliše brojne ciljane molekule uključene u regulaciju različitih ćelijskih procesa. (Preuzeto i modifikovano prema Garcia-Echeverria, 2010).

Važan efektor u PI3K/AKT/mTOR signalnom putu je i mTOR protein (engl. *Mammalian Target of Rapamycin*) koji ima centralnu ulogu u ćelijskom preživljavanju i proliferaciji tako što vrši modulaciju ćelijskog odgovora na mitotičke (mitogene) stimuluse i različite nutritijente. Protein mTOR je serin/treonin kinaza molekulske mase 289 kDa koja pripada porodici fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI3K) proteina. Sastavni je deo dva proteinska kompleksa: mTOR kompleksa 1 (mTORC1) i mTOR kompleksa 2 (mTORC2). Ova dva proteinska kompleksa pozitivno regulišu ćelijski rast i diferencijaciju promovisući anaboličke procese u ćeliji kao što su biosinteza proteina, lipida i organela, a negativno regulišu kataboličke procese kao što je autofagija (Guertin i Sabatini, 2007). Proteinski kompleks 1 (mTORC1) se sastoji iz serin/treonin kinaze mTOR, regulatornih proteina RAPTOR (engl. *Regulatory-associated Protein of mTOR*) i mLST8 (engl. *Mammalian Lethal With Sec13 Protein* 8). Ovaj kompleks fosforiliše ribozomalnu S6 kinazu koja utiče na translaciju proteina koji promovišu ćelijski rast i deobu. Drugi proteinski kompleks mTOR proteina je mTORC2 koji se takođe sastoji iz serin/treonin kinaze mTOR i regulatornih proteina RICTOR (engl. *Rapamycin-insensitive Companion of mTOR*) mLST8 i mSIN1 (engl. *Mammalian Stress-activated Protein Kinase Interacting Protein*). Proteinski kompleks mTORC2 fosforiliše kinaze AKT i SGK (engl. *Serum Glucocorticoid-induced Kinase*) i učestvuje u regulaciji citoskeletne organizacije, ćelijskog preživljavanja i lipidnog metabolizma (Mendoza i saradnici, 2011).

Promene u regulaciji PI3K/AKT/mTOR signalnog puta moguće su na više nivoa. Prekomerna aktivacija ovog signalnog puta se dešava zbog amplifikacija i mutacija u *PI3K* i *AKT* genima (Hennessy i saradnici, 2005). Kao što je već pomenuto *PTEN* tumor-supresor je često mutiran ili deletiran kod različitih tipova kancera, a on predstavlja ključni negativni regulator PI3K/AKT/mTOR signalnog puta. Ovaj tumor-supresor uklanja 3' fosfat sa PIP3 i tako inhibira signalnu kaskadu nishodno od PI3K (Blanco-Aparicio i saradnici, 2007).

1.4. KANCER ŠTITASTE ŽLEZDE

1.4.1. EPIDEMIOLOGIJA KANCERA ŠTITASTE ŽLEZDE

Kancer je, pored infektivnih i kardiovaskularnih oboljenja, najveći zdravstveni problem savremenog doba. U Evropi je u 2012. godini dijagnostikovano 3,45 miliona novih slučajeva kancera, od toga je 1,75 miliona slučajeva završilo smrtnim ishodom. Najčešći tipovi tumora su kolorektalni kancer kao i kancer dojke, prostate i pluća (Ferlay i saradnici, 2013). Kancer štitaste žlezde čini samo 2% tumora u svetu ali je najčešći tip kancera endokrinog sistema (Sipos i Mazzaferri, 2010). Dugogodišnja epidemiološka istraživanja pokazala su da je ukupna incidenca i mortalitet od kancera štitaste žlezde u porastu (Pellegriti i saradnici, 2013). Uzrok ovog povećanja je predmet debate među naučnicima. Pojedini tvrde da nema povećanja stvarne incidence ovog tumora, već da je u pitanju napredak medicine i dijagnostika malih asimptomatičnih štitastih karcinoma koji su u prošlosti često bili neprimećeni (Davies i Welch, 2006). Drugi smatraju da je povećanje učestalosti ovog tumora realno, i rezultat je promena u načinu života, odnosno interakcije genetičke predispozicije i varijabilnosti sa promenom životne sredine (Kent i saradnici, 2007). Razni faktori kao što su zagađivači sredine, prekomerna težina, deficijencija joda kao i povećano zračenje organizma u dijagnostičke svrhe razlozi su sve veće učestalosti ovog kancera u svetu (Pellegriti i saradnici, 2013). Povećana radijacija se pokazala kao najveći uzročnik povećane učestalosti kancera štitaste žlezde pre svega kod dece. Prvih dvadeset godina nakon černobilske katastrofe na prostorima južne Belorusije i severne Ukrajine zabeležen je nagli porast učestalosti karcinoma štitaste žlezde kod dece ali i odraslih u manjoj meri. Razlog je jonizujuće zračenje koje deluje na DNK, uzrokujući dvostruke prekide u ovom molekulu i samim tim dovodi do povećane genomske nestabilnosti kao osnove nastanka tumora (Williams, 2009). Smatra se da je efekat zračenja veći kod dece zbog povećane deobe ćelija tokom razvoja štitaste žlezde u odnosu na odrasle (Saad i saradnici, 2006). Kancer štitaste žlezde je češći kod žena nego kod muškaraca. U poslednje tri decenije učestalost ovog kancera povećana je tri puta kod žena u odnosu na muškarce (Enewold i saradnici, 2009).

1.4.2. KLASIFIKACIJA KANCERA ŠTITASTE ŽLEZDE

Kancer štitaste žlezde pripada epitelijalnim kancerima tj. karcinomima. Na osnovu histopatoloških karakteristika kanceri štitaste žlezde se mogu podeliti na četiri osnovna tipa (Grande i saradnici, 2012; Taccaliti i saradnici, 2012):

- 1) **Papilarni karcinom** (lat. *carcinoma papillare*) je najčešći oblik raka štitaste žlezde. Nastaje promenama u folikularnim ćelijama štitaste žlezde. To su epitelijalne ćelije štitnjače odgovorne za lučenje hormona tiroksina (T4) i trijodtironina (T3). Javlja se najčešće kod mladih u drugoj i trećoj deceniji života, redak je u srednjim godinama. Češći je kod žena. Ispoljava se bezbolnim čvorom koji sporo raste. Čvor manji od 2 cm ima odličnu prognozu. Metastaze najčešće daje u limfne žlezde vrata, ređe u pluća, mozak i kosti. Vezuje radioaktivni jod, što se koristi za postavljanje dijagnoze i za lečenje.
- 2) **Folikularni karcinom** (lat. *carcinoma foliculare*) se za razliku od papilarnog najčešće javlja kod starijih. Češći je kod žena. Postoje različite varijante ovog karcinoma koje pokazuju različitu invazivnost, ali u celini on ima relativno dobru prognozu. Manji tumori imaju bolju prognozu. Folikularni karcinom najčešće daje metastaze u kosti, pluća i mozak. Metastaze vezuju radioaktivni jod, što je važno za dijagnozu i terapiju. Ovaj karcinom može da stvara hormon štitaste žlezde i da dovede do tireotoksikoze.
- 3) **Anaplastični karcinom** (lat. *carcinoma anaplasticum*) se obično javlja posle pedesete godine podjednako kod muškaraca i žena. Izuzetno je invazivan, pa ima lošu prognozu. Nekada se preživljavanje meri mesecima, retko preko godinu dana. Ovaj tumor ne vezuje radioaktivni jod i rezistentan je na hemioterapiju. Tumor brzo raste i prodire u dušnik, jednjak, ždrelo i vrat.
- 4) **Medularni karcinom** (lat. *carcinoma medullare*) se javlja kod starijih (u šestoj i sedmoj deceniji), nešto češće kod žena. Može biti nasledan i sporadičan. Familijarno oboljenje se klinički ispoljava u 3 različita sindroma: multipla endokrina neoplazija 2A (MEN2A), multipla endokrina neoplazija 2B (MEN2B) i familijarni ne MEN medularni karcinom štitaste žlezde (FMCT). Medularni karcinom štitaste žlezde ima lošiju prognozu od papilarnog i folikularnog, ali bolju od anaplastičnog karcinoma. Nastaje

promenama u parafolikularnim C ćelijama koje luče hormon kalcitonin, koji se koristi za postavljanje dijagnoze, kao tumor marker. Zbog mogućeg taloženja kalcijuma u tumoru kao i metastazama ovaj tumor može da se uoči na rendgenskom snimku.

Po stepenu diferencijacije tumori koji nastaju od folikularnih ćelija (95% tumora štitaste žlezde) dele se na diferencirane (DTC), slabo diferencirane (PDTC) i anaplastične karcinome štitaste žlezde (ATC). U diferencirane tumore štitaste žlezde ubrajaju se papilarni i folikularni karcinomi. Ovi tumori imaju odličnu prognozu, jer ćelije zadržavaju svojstva ćelija štitaste žlezde da absorbuju jod, tako da dobro odgovaraju na terapiju radioaktivnim jodom za razliku od anaplastičnog karcinoma. U slabo diferencirane tumore spadaju invazivnije forme papilarnog i folikularnog karcinoma koji lošije odgovaraju na terapiju u odnosu na manje invazivne forme ovog kancera (Patel i Shaha, 2006). Anaplastični karcinom štitaste žlezde je redak oblik tumora, i ubraja se u dediferenciranu formu folikularnog kancera štitaste žlezde. Izrazito je invazivan i ne reaguje na terapiju radioaktivnim jodom kao ni na hemioterapiju (Grande i saradnici, 2012).

1.4.3. GENETIČKA OSNOVA KANCERA ŠTITASTE ŽLEZDE

Promene u PI3K/AKT/mTOR i RAS/MAPK/ERK signalnim putevima karakterišu nastanak kancera štitaste žlezde i komponente ovih puteva su izmenjene u svim tipovima ovog kancera (Slika 7) (Liu i saradnici, 2008).

RAS gen je najčešće izmenjen gen u karcinomima štitaste žlezde. Ovaj gen, iako glavna komponenta RAS/MAPK/ERK signalnog puta, učestvuje i u regulaciji PI3K/AKT/mTOR signalne kaskade. Na katalitičkoj subjedinici (p110) PI3K kinaze nalazi se RAS vezujuće mesto gde se nakon vezivanja RAS proteina aktivira PI3K/AKT/mTOR kaskada. Na ovaj način RAS predstavlja sponu između dva pomenuta signalna puta (Xing, 2010). Sve tri izoforme *RAS* gena (*KRAS*, *HRAS*, *NRAS*) su izmenjene u benignim i malignim karcinomima štitaste žlezde. Imajući u vidu jednaku učestalost ovih izmena pretpostavlja se da je promena *RAS* gena rani događaj u kancerogenezi štitaste žlezde (Lemoine i saradnici, 1989; Namba i saradnici, 1990). Promene u *RAS* genima se češće javljaju kod folikularnog i anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde, a ređe kod papilarne forme ovog karcinoma (Meinkoth, 2004; Suarez i saradnici, 1990; Vasko i saradnici, 2003). *NRAS* je

najčešće izmenjena izoforma i to mutacijom u kodonu 61, uglavnom kod invazivnijih oblika folikularnog karcinoma uključujući i anaplastični karcinom štitaste žlezde što sugeriše da *NRAS* ima ulogu u progresiji pomenutih tipova kancera štitaste žlezde i povezan je sa agresivnijom kliničkom slikom (Basolo i saradnici, 2000; Garcia-Rostan i saradnici, 2003; Motoi i saradnici, 2000). Nishodno od RAS proteina nalaze se signalni efektori koji predstavljaju komponente PI3K/AKT/mTOR i RAS/MAPK/ERK kaskade (Menges i McCance, 2008). BRAF protein kinaza je jedan od glavnih efektor a nizvodno od RAS-a u RAS/MAPK/ERK signalnom putu (Phillips i saradnici, 2010).

BRAF je najčešće izmenjena komponenta RAS/MAPK/ERK signalnog puta i to kod papilarne forme karcinoma štitaste žlezde, dok promene ovog gena nisu uočene u folikularnom i medularnom tipu ovog kancera. Mutacija u kodonu 600 (V600E) koja rezultuje preteranom kinaznom aktivnošću BRAF proteina je najčešća promena *BRAF* gena i uočena je u oko 45% papilarnih karcinoma štitaste žlezde i oko 25% anaplastičnih karcinoma štitaste žlezde (Xing, 2005). Ova promena je pokazatelj lošije kliničke slike i smanjene osetljivosti na radioterapiju kod papilarnih karcinoma štitaste žlezde (Li i saradnici, 2012).

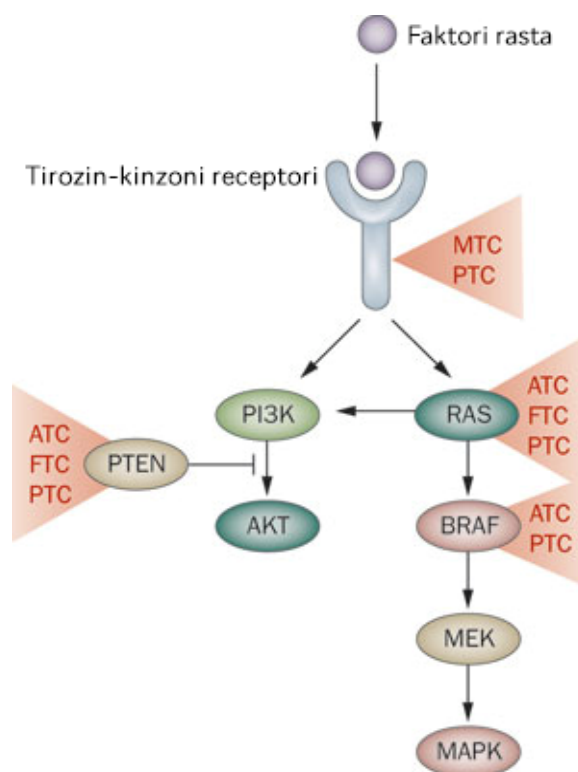
PI3K efektor je često izmenjena komponenta PI3K/AKT/mTOR signalne kaskade u tumorima štitaste žlezde. Preterana aktivnost PI3K kinaze zbog promene u katalitičkoj subjedinici ovog proteina usled amplifikacije *PIK3CA* gena uočena je kod 16% papilarnih karcinoma, 30% folikularnih karcinoma i 50% slučajeva sa anaplastičnim karcinomom štitaste žlezde sugerišući povećanu učestalost ovih promena kod agresivnijih histoloških tipova ovog kancera (Hou i saradnici, 2007; Santarpia i saradnici, 2008; Wu i saradnici, 2005).

AKT je takođe kao komponenta PI3K/AKT/mTOR signalne kaskade, često aktiviran kod kancera štitaste žlezde i to sa većom učestalošću kod folikularnih i slabo diferenciranih u odnosu na papilarne karcinome (Bruni i saradnici, 2000; Ringel i saradnici, 2001). Pokazano je da se visoki nivoi fosforilisanog AKT proteina češće javljaju kod agresivnijih karcinoma štitaste žlezde što ukazuje na ulogu ove kinaze u invaziji kancera (Vasko i saradnici, 2004).

RET/PTC rearanžmani nastaju zbog rekombinacije na hromozomu 10 koja zahvata *RET* gen, što ovaj gen stavlja pod uticaj drugih promotora i samim tim dolazi do njegove preterane ekspresije. Kao posledica ovog rearanžmana dolazi do hiperekspresije RET tirozin-kinaznog receptora usled čega se aktiviraju

RAS/MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR signalni putevi (Xing, 2010). RET/PTC rearanžmani su česti kod papilarnih formi karcinoma štitaste žlezde. Kod oko 30% ovih karcinoma nađene su pomenute promene, a izrazito velika učestalost RET/PTC rearanžmana uočena je kod dece sa karcinomima štitaste žlezde nakon Černobilske katastrofe što upućuje na uticaj jonizujućeg zračenja na DNK rearanžmane (Klugbauer i saradnici, 1998). Mutacije *RET* gena karakteristika su medularnog karcinoma štitaste žlezde. Somatske mutacije ovog protoonkogeno uočene su u visokom procentu sporadičnih medularnih karcinoma štitaste žlezde, a promene ovog gena su karakteristika i familijarnih sindroma medularnog karcinoma (Moura i saradnici, 2009).

Promene u *PTEN* i *p53* tumor-supresor genima su karakteristične za agresivnije, slabo diferencirane i dediferencirane forme karcinoma štitaste žlezde. Somatske mutacije *PTEN* gena su retke dok je gubitak heterozigotnosti kod ovog gena uočen u 20-60% karcinoma štitaste žlezde i to uglavnom kod invazivnijih tipova ovog karcinoma (Halachmi i saradnici, 1998). Ranije studije su pokazale nisku ekspresiju PTEN-a i u citoplazmi i u nukleusu karcinoma štitaste žlezde (Weng i saradnici, 2001). Mutacije *p53* gena su uočene uglavnom kod slabo diferenciranih i anaplastičnih karcinoma štitaste žlezde i smatra se da doprinose dediferencijaciji i genezi agresivnih formi ovih karcinoma, stoga su verovatno kasni događaj u evoluciji kancera štitaste žlezde (Legakis i Syrigos, 2011).



Slika 7. Promene u PI3K/AKT/mTOR i RAS/MAPK/ERK signalnim putevima kod određenih tipova kancera štitaste žlezde. PTC – Papilarni karcinom; FTC – Folikularni karcinom; ATC – Anaplastični karcinom štitaste žlezde. (Preuzeto i modificirano prema Carlomagno i Santoro, 2011).

1.5. ANAPLASTIČNI KARCINOM ŠTITASTE ŽLEZDE

Anaplastični karcinom štitaste žlezde je najređi ali i najinvazivniji karcinom štitaste žlezde. To je jedan od najmalignijih tumora u humanoj medicini zbog velike agresivnosti i male mogućnosti za terapiju. Samo do 10% bolesnika preživi do 2 godine posle dijagnoze. Može nastati *de novo* ali češće nastaje iz prethodno postojećeg dobro diferenciranog folikularnog ili papilarnog karcinoma štitaste žlezde. Izrazito je invazivan, prođire u okolne strukture i metastazira u limfne čvorove i udaljene organe kao što su pluća i kosti. U većini slučajeva ovog karcinoma vitalni organi vrata su tako agresivno zahvaćeni da su inoperabilni u vreme kada se dijagnoza postavi. Najveća učestalost ovog kancera je kod starijih osoba i jednako se javlja kod muškaraca i žena (Giuffrida i Gharib, 2000; Kitamura i saradnici, 1999).

Promene u PI3K/AKT/mTOR i RAS/MAPK/ERK signalnim putevima su karakteristika nastanka anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde i slične su promenama u papilarnom ili folikularnom karcinomu štitaste žlezde, zavisno od kog tipa

karcinoma je nastao (Quiros i saradnici, 2005; Wang i saradnici, 2007). Čelije anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde gube karakteristiku normalnih ćelija da vezuju radioaktivni jod i zbog toga radioterapija u slučaju ovog karcinoma nije moguća za razliku od papilarnog i folikularnog karcinoma. Pretpostavlja se da su razlog tome dodatne mutacije u *p53* i *PIK3CA* genu koje su retke u folikularnoj i papilarnoj formi karcinoma (Nucera i saradnici, 2011). Najčešće izmenjen gen u anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde je *p53* sa učestalošću od 53%. Za njim slede promene u sledećim genima: β -katenin (38%), *BRAF* (26%), *RAS* (22%) i *PIK3CA* (17%). Zbog jednake učestalosti promena u *RAS* genu u benignim i malignim neoplazmama štitaste žlezde pretpostavlja se da su promene ovog gena rani događaj u kancerogenezi za razliku od promena u *p53* genu koje se smatraju kasnim događajem odgovornim za dediferencijaciju kancera štitaste žlezde, upravo zbog velike učestalosti u anaplastičnim karcinomima za razliku od ostalih tipova ovog kancera (Smallridge i Copland, 2010).

1.6. TERAPIJA KANCERA ŠTITASTE ŽLEZDE

Diferencirani tumori štitaste žlezde kao što su papilarni i folikularni karcinomi dobro odgovaraju na radioterapiju i ako se otkriju na vreme mogućnost izlečenja je 90%. Lečenje je trostruko: hirurško lečenje, terapija radiojodom i zračenjem kao i medikamentozno lečenje tiroksinom. Hirurški se odstranjuje tumorsko tkivo a zatim se primenjuje radioaktivni jod da se uništi ostatak tkiva ili tumora koji nije odstranjen hirurški. Primenom velikih doza tiroksina postiže se supresija tireostimulirajućeg hormona (TSH) čime se sprečava stimulacija rasta ćelija diferenciranih tumora štitaste žlezde. Savremeno lečenje tumora štitaste žlezde karakterišu tačna preoperativna dijagnoza, adekvatna precizna operacija i rutinska primena dopunske efikasne terapije (Sawka i saradnici, 2009). Radioterapija kod medularnih i anaplastičnih karcinoma nije moguća. Medularni tumori se leče hirurškim odstranjivanjem i medikamentima, ako se otkriju na vreme terapija je uspešna jer ovaj tip tumora nije invazivan kao anaplastični karcinom štitaste žlezde (Sippel i saradnici, 2008). Hemioterapija nije efikasna kada su u pitanju karcinomi štitaste žlezde. Ovi karcinomi su urođeno rezistentni na citostatike. Hemioterapija se ne primenjuje kod diferenciranih tipova tumora štitaste žlezde, osim u slučaju uznapredovalih metastatskih tumora kod kojih je radioterapija bila neuspešna. Kod slabo diferenciranih i anaplastičnih karcinoma hemioterapija je često jedino moguće lečenje s obzirom da su ovi tumori štitaste

žlezde izrazito invazivni, rezistentni na radioterapiju i u trenutku otkrivanja često inoperabilni (Higgins i saradnici, 2009; Nagaiah i saradnici, 2011).

Anaplastični karcinom je, kao što je već pomenuto, najređi oblik kancera štitaste žlezde ali je najinvazivniji, sa velikom smrtnošću pacijenata u roku od godinu dana (Kitamura i saradnici, 1999). Najčešće korišćeni citostatici u terapiji tumora generalno pa tako i u terapiji anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde su doksorubicin (DOX), paklitaksel (PTX) i cisplatin (CpT) (Nagaiah i saradnici, 2011).

Doksorubicin je osnovni lek iz grupe antraciklinskih antibiotika. Deluje citotoksično na nekoliko načina. Vezujući se direktno za DNK inhibira sintezu i DNK i RNK, a takođe inhibira topoizomerazu II, enzim čija je aktivnost posebno povišena kod proliferišućih ćelija. Mehanizam citotoksičnog dejstva doksorubicina je stabilizacija kompleksa topoizomerase II nakon prekidanja DNK lanca radi replikacije, čime se sprečava odvijanje dvostrukog heliksa, zaustavlja proces replikacije i nastaju dvostruki prekidi DNK lanca (Thorn i saradnici, 2011).

Paklitaksel je antimitotski agens koji se vezuje za mikrotubule deobnog vretena i sprečava njihovu depolimerizaciju, što ometa normalno odvijanje ćelijske deobe (Kavallaris i saradnici, 1997). Ciljni molekul za paklitaksel je β tubulin, pri čemu taksan-vezujuće mesto postoji samo na polimerizovanim mikrotubulama. Svoj citotoksični efekat paklitaksel ostvaruje vezivanjem za mikrotubule deobnog vretena i sprečavanjem njihove depolimerizacije, što izaziva zaustavljanje ćelije u G2/M fazi ćelijskog ciklusa (Derry i saradnici, 1995). Ovo dovodi do pokretanja JNK/SAPK signalnog puta. JNK fosforiliše i inhibira anti-apoptotski protein Bcl-2, što predstavlja signal za pokretanje apoptoze (Wang i saradnici, 1998).

Cisplatina je član grupe antitumorskih lekova koji sadrže platinu. Ovi platinski kompleksi se vezuju za DNK, i za razliku od doksorubicina ne uzrokuju odmah dvostruke prekide DNK. Cisplatina se veže za DNK, uzrokujući unakrsno G-G povezivanje jednog lanca ovog molekula, što dovodi do formiranja DNK adukta i krajnji rezultat je apoptoza (programirana ćelijska smrt) (Diggle i saradnici, 2005; He i saradnici, 2011).

Doksorubicin sam kao i u kombinaciji sa cisplatinom nije dao zadovoljavajuće rezultate u lečenju anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde (Nagaiah i saradnici, 2011). U studijama rađenim na pacijentima obolelim od anaplastičnog karcinoma najbolje se pokazala terapija paklitakselom gdje je 53% pacijenata pokazalo delimičan odgovor na ovu terapiju dok ostatak nije reagovao (Ain i saradnici, 2000).

1.7. MEHANIZAM REZISTENCIJE KANCERA ŠTITASTE ŽLEZDE

Glavni uzrok neuspeha hemioterapije u lečenju kancera je pojava rezistencije. Rezistencija na veći broj strukturno i funkcionalno različitih hemioterapeutika se definiše kao višestruka (engl. *multi-drug rezistencija*, *MDR*). MDR može biti prisutna pre primene hemioterapije (urođena ili engl. *intrinsic* rezistencija) ili se može razviti u toku hemioterapije (stečena ili *de novo* rezistencija). MDR fenotip može nastati usled smanjene akumulacije terapeutika u ćeliji, modifikacije detoksifikacionog sistema, promene u ciljnim molekulima, brze popravke oštećenja DNK, kao i izbegavanja apoptoze (Longley i Johnston, 2005). Jedan od glavnih mehanizama koji dovodi do smanjene akumulacije terapeutika je povećano izbacivanje iz ćelije pomoću membranskih transportera P-glikoproteina (P-gp/ABCB1/MDR1) i BCRP (engl. *Breast Cancer Resistance Protein*, *ABCG2*) proteina (Gottesman i saradnici, 2002; Mimeault i saradnici, 2008).

P-gp pripada familiji ATP vezujućih transportera (engl. *ATP Binding Cassette*, *ABC*). ABC transporteri su transmembranski proteini koji koriste energiju vezivanja i hidrolize adenozin trifosfata (ATP) za izvršavanje specifičnih bioloških procesa, među kojima je translokacija raznih supstrata kroz membrane. Oni transportuju širok opseg supstrata kroz ćelijske membrane i membrane organela uključujući metaboličke produkte, lipide, sterole i lekove. Ovi proteini se klasifikuju kao ABC transporteri na bazi njihove sekvence i organizacije njihovih ATP-vezujućih domena. Gen koji kodira P-gp je *mdr1*, nalazi se na hromozomu 7 i ima 29 egzona. U normalnim uslovima P-gp je prisutan u različitim tkivima: u bubrezima, pankreasu, placenti, materici, jetri, tankom i debelom crevu, kao i endotelijalnim ćelijama kapilara testisa i krvno-moždane barijere. P-gp je eksprimiran na površini ćelije i njegova glavna uloga je zaštita vitalnih organa i fetusa od delovanja ksenobiotika (Fung i Gottesman, 2009). Karakteristika ovog proteina je široka supstratna specifičnost. Njegovi supstrati imaju različite hemijske strukture i širok spektar bioloških aktivnosti i to su: antihistaminici, blokatori kalcijumovih kanala, antikancer agensi i antibiotici. Zbog toga većina citostatika jesu supstrati za P-gp: antraciklini, taksani, *vinca* alkaloidi, epipodofilotoksini. Upravo iz tog razloga ekspresija P-gp-a određuje stepen rezistencije na ove antikancer agense (Fung i Gottesman, 2009).

BCRP pripada takođe familiji ATP vezujućih transportera. Gen koji kodira ovaj protein je *ABCG2* i nalazi se na dugom kraku hromozoma 4. U normalnim uslovima BCRP je prisutan u različitim tkivima: u jetri, debelom crevu, placenti, endokrinom pankreasu, adrenalnom korteksu, štitastoj i paraštitastoj žlezdi (Doyle i Ross, 2003). Slično kao i P-gp ima ulogu u zaštiti fetusa od delovanja različitih lekova (Jonker i saradnici, 2000). Povećana ekspresija ovog proteina u tumorima određuje stepen rezistencije na većinu inhibitora topoizomerase I ili II, kao što su topotekan, irinotekan, i doksorubicin (Doyle i Ross, 2003).

Anaplastični karcinom kao i ostali tipovi kancera štitaste žlezde su urođeno rezistentni na hemioterapeutike. Brojna klinička istraživanja su pokazala delimično pozitivan odgovor kancera štitaste žlezde na klasične hemioterapeutike, ali kod jako malog broja pacijenata i retko kod anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde (Haigh, 2000; Hanna i saradnici, 1999). Mehanizam rezistencije ovog kancera nije poznat. Jedan od mogućih uzroka neuspeha hemioterapije može biti prekomerna ekspresija transportnih pumpi. U određenom procentu pacijenata sa anaplastičnim karcinomom štitaste žlezde pokazana je povećana ekspresija P-gp proteina (Satake i saradnici, 1997). Međutim, ne postoje podaci o ekspresiji BCRP pumpi kod pacijenata sa anaplastičnim karcinomom štitaste žlezde. Drugi mogući uzrok neuspeha hemioterapije kod anaplastičnog kancera štitaste žlezde je velika učestalost mutacija u *p53* tumor supresoru. Ovaj gen je izmenjen u čak 53% anaplastičnih karcinoma (Smallridge i Copland, 2010). Kao što je već rečeno mutacije u *p53* genu najčešće dovode do nastanka nefunkcionalnog proteina i ćelija više nije u mogućnosti da zaustavi ćelijski ciklus, reparira oštećenja, niti da uđe u apoptozu. Ovakav sled događaja dovodi do pojave kancera, ali i do nastanka hemiorezistencije kod već postojećih kancer ćelija (Bredel, 2001). Rezistenciji takođe doprinosi uloga wt *p53* tumor-supresora u inhibiciji transkripcije *mdr1* gena, direktnom interakcijom sa specifičnim vezujućim elementom u okviru promotora ovog gena. Stoga izmenjeni *p53* aktivira ekspresiju *mdr1* gena kao posledica gubitka inhibitorne funkcije, a prema nekim istraživanjima i zbog direktne interakcije sa EST-1 transkripcionim faktorom za koji postoji vezujuće mesto u *mdr1* promotoru (Nicoletti i saradnici, 2001). Još jedan mogući uzrok rezistencije kancera štitaste žlezde, pre svega anaplastičnog tipa ovog kancera je prekomerna aktivacija PI3K/AKT/mTOR i RAS/MAPK/ERK signalnih puteva. Poznato je da su promene u ovim putevima karakteristika nastanka kancera štitaste žlezde. Ovi signalni putevi igraju ključnu ulogu u regulaciji ćelijskog

preživljavanja, rasta ćelije i progresiji ćelijskog ciklusa i često su prekomerno aktivirani u malignim tumorima, dovodeći do smanjene senzitivnosti tumora na klasične hemioterapeutike paklitaksel i doksorubicin (Britten, 2013; Burris, 2013; Clark i saradnici, 2002).

1.8. STRATEGIJE ZA PREVAZILAŽENJE REZISTENCIJE KANCERA ŠTITASTE ŽLEZDE

Strategije koje su usmerene ka efikasnijoj borbi protiv maligniteta, bez neželjenih efekata u odnosu na normalne ćelije i tkiva su najvećim delom ograničene činjenicom da većina maligniteta ne poseduje ciljne molekule i gene koji su istovremeno tumor specifični i vitalni samo za funkciju ćelija tumora. Jedan od mogućih pristupa za prevazilaženje problema rezistencije na klasične hemioterapeutike je primena farmakoloških inhibitora PI3K/AKT/mTOR i RAS/MAPK/ERK signalnih puteva posebno za one vrste kancera gde je prisutna povećana ekspresija ovih signalnih puteva kao što je kancer štitaste žlezde. Pokazano je da primena inhibitora komponenti PI3K/AKT/mTOR i RAS/MAPK/ERK signalnih kaskada u kombinaciji sa klasičnim hemioterapeuticima značajno povećava njihovu efikasnost u tretmanu tumorskih ćelija (Hu i saradnici, 2002; MacKeigan i saradnici, 2000). U ova jedinjenja spadaju mali molekuli ili antitela koji deluju na pomenute puteve kao što su inhibitori EGFR-a (cetuksimab, gefitinib), erbB2 (trastuzumab, lapatinib), mTOR-a (sirolimus, temsirolimus), jedinjenja koja deluju na tumorsku angiogenezu kao što su inhibitori VEGFR-a (bavacizumab, sunitinib) kao i jedinjenja koja deluju na neke druge kinaze npr. fosfo-AKT inhibitor zatim inhibitori RAS, PI3K i BRAF kinaze.

Pokazano je da neki kinazni inhibitori, uglavnom inhibitori tirozin kinaza (TKI) mogu da inhibiraju i ABC transportere, što dovodi do hemiosenzitizacije. U zavisnosti od primenjene koncentracije neka od TKI jedinjenja se ponašaju i kao supstrati i kao inhibitori odgovarajućeg transportera. Primenjeni u kombinaciji sa drugim citostaticima, TKI često pri višim koncentracijama mogu kompetitivno inhibirati odgovarajuće transportere (Hegedus i saradnici, 2009). Tako su brojne *in vitro* studije na različitim MDR ćelijskim linijama pokazale da kombinovani tretman nekih TKI sa standardnim hemioterapeuticima značajno revertuju MDR fenotip (Tiwari i saradnici, 2009). S obzirom na mogućnosti inhibitora komponenti

PI3K/AKT/mTOR i RAS/MAPK/ERK signalnih puteva da revertuju MDR fenotip i dovedu do hemiosenzitizacije kancera na klasične hemioterapeutike, njihova primena bi mogla biti efikasna i u terapiji kancera štitaste žlezde.

1.8.1. AKT INHIBITOR - GSK690693

GSK690693 je pan-AKT inhibitor, odnosno inhibitor AKT1, AKT2 i AKT3 kinaza. Prvobitna istraživanja su pokazala snažnu antiproliferativnu aktivnost na nekoliko humanih tumorskih ćelijskih linija sugerišući ulogu ove kinaze u rastu i preživljavanju tumorskih ćelija. Pokazano je da ovo jedinjenje sprečava rast i izaziva apoptozu kod nekoliko ćelijskih linija akutne limfoblastne leukemije (Altomare i saradnici, 2010). Tretman tumorskih ćelija sa GSK690693 inhibira AKT i dovodi do brojnih promena u nishodnim signalnim putevima. Inhibicija AKT-a dovodi do smanjene aktivnosti c-Myc-a posredstvom više mehanizama. Jedarni fosfoprotein c-Myc svoju ulogu ostvaruje kao transkripcioni faktor učestvujući u regulaciji ćelijske proliferacije, diferencijacije i apoptoze. Ekspimiran je u skoro svim ćelijama embrionalnog i adultnog tkiva koje se dele i njegova ekspresija je u korelaciji sa ćelijskom proliferacijom. Protein c-Myc je veoma ekspimiran u različitim humanim neoplazmama (Dang, 1999). Pored smanjenja aktivnosti c-Myc-a inhibicija AKT proteina zaustavlja ćelijski ciklus preko nekoliko nezavisnih mehanizama. Jedan od njih je aktivacija inhibitora ćelijskog ciklusa CDKN1A i CDKN1B koji su negativno regulisani AKT posredovanom fosforilacijom. Takođe, inhibicija AKT kinaze aktivira Rb protein koji je odgovoran za regulaciju ćelijskog ciklusa tako što sprečava prelaz ćelijskog ciklusa iz G1 u S fazu (Xu i saradnici, 2012). Bez obzira što su prvobitna istraživanja pokazala apoptotski efekat GSK690693 na nekim tumorskim ćelijskim linijama, ipak je njegov osnovni mehanizam delovanja anti-proliferativni upravo posredstvom smanjenja aktivnosti c-Myc transkripcionog faktora i povećanja aktivnosti Rb proteina (Altomare i saradnici, 2010).

1.8.2. RAS INHIBITOR - TIPIFARNIB

Tipifarnib je kompetitivni inhibitor unutarćelijskog enzima farnezil-transferaze, koji katalizuje prenos farnezil grupe na brojne supstrate uključujući RAS protein. Farnezil-transferaza katalizuje prenos farnezil grupe na ciljnu peptidnu sekvencu „CAAX” koja se nalazi na C-terminalnom kraju RAS proteina (Thomas i Elhamri, 2007). Tipifarnib remeti aktivnost ovog proteina tako što sprečava vezivanje

farnezil grupe, koji omogućava njegovo kretanje iz citoplazme i vezivanje za plazma membranu (Karp i Lancet, 2008). Tipifarnib je prva farnezil-transferaza koja je testirana u kliničkim istraživanjima i nije se pokazala štetnom za ljude (Kurzrock i saradnici, 2004).

Pored inhibicije farnezil-transferaze tipifarnib inhibira i aktivnost P-gp-a (Medeiros i saradnici, 2007). Brojna istraživanja su pokazala antiproliferativni, antiangiogeni i proapoptotski efekat tipifarniba *in vitro* i *in vivo*. Takođe, tipifarnib je dao značajne rezultate u tretmanu akutne mijeloidne leukemije i mijelodisplastičnog sindroma (Lancet i saradnici, 2007).

1.8.3 BRAF INHIBITOR - DABRAFENIB

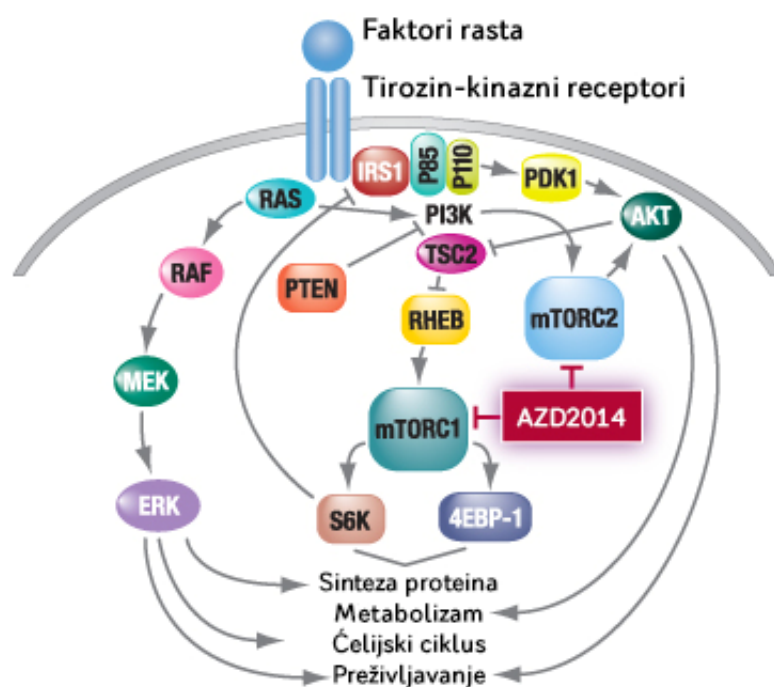
Dabrafenib je ATP kompetitivni inhibitor BRAF kinaze. BRAF protein kinaza je jedan od glavnih efektorâ nizvodno od RAS-a u RAS/MAPK/ERK signalnom putu (Phillips i saradnici, 2010). Aktivirajuće mutacije *BRAF* onkogene su opisane u brojnim malignitetima. Dabrafenib je selektivni inhibitor (V600E) mutantne forme BRAF kinaze (Kainthla i saradnici, 2014). Ovaj inhibitor je pokazao antitumorsku aktivnost u malignitetima sa izmenjenim BRAF proteinom kao što su melanomi, kolorektalni karcinomi, papilarni karcinomi štitaste žlezde i karcinomi ovarijuma (Falchook i saradnici, 2012).

1.8.4 PI3K INHIBITOR - VORTMANIN

Vortmanin je potentni metabolit gljiva, koji selektivno inhibira PI3K kinazu (Arcaro i Wymann, 1993). Ovaj inhibitor se vezuje za p110 katalitičku subjedinicu PI3K kinaze i izaziva ireverzibilnu inhibiciju ovog enzima (Powis i saradnici, 1994). Inhibicijom PI3K enzima suprimira se fosforilacija AKT kinaze (Ng i saradnici, 2000) i usled toga dolazi do brojnih promena u nishodnim signalnim putevima kao što je smanjenje aktivnosti c-Myc-a i indukcija apoptoze (McNamara i Degterev, 2011). Već je pokazan antitumorski potencijal ovog inhibitora na ksenograftima tumora pankreasa (Ng i saradnici, 2000).

1.8.5 mTOR INHIBITOR - AZD2014

AZD2014 je dvostuki inhibitor mTOR kinaze. Blokira aktivaciju oba kompleksa mTOR proteina, mTOR kompleksa 1 (mTORC1) i mTOR kompleksa 2 (mTORC2) (Huo i saradnici, 2014). Protein mTOR igra jednu od centralnih uloga u ćelijskom rastu. Faktori rasta delujući na tirozin-kinazne receptore i receptore kuplovane sa G-proteinom aktiviraju nekoliko signalnih puteva među kojima su najznačajniji PI3K/AKT/mTOR i RAS/MAPK/ERK putevi. Oba navedena puta stimulišu mTORC1 prethodno inhibirajući TSC1-TSC2 kompleks koji je negativni regulator mTORC1 (Slika 8).



Slika 8. Šematski prikaz mTOR aktivirajućih i efektornih molekula koji imaju ulogu u sintezi proteina, preživljavanju, ćelijskom ciklusu i metabolizmu. Na slici je prikazan AZD2014 koji blokira aktivaciju oba kompleksa mTOR proteina. (Preuzeto i modificovano sa internet stranice <http://www.xcovery.com/mtor>).

Glavni cilj delovanja mTOR-a su komponente translacione mašinerije čijom se aktivacijom započinje translacija proteina kao što je 40S ribozomalni protein S6 kinaza (S6K1). Aktivirani mTOR povećava aktivnost inicijalnog faktora translacije EIF4E koji direktno povećava translaciju c-Myc-a (Guertin i Sabatini, 2007). Protein mTOR je ključni molekul u regulaciji autofagije, sprečavajući inicijaciju ovog tipa

ćelijske smrti (Yang i Guan, 2007). Pokazano je da inhibitori mTOR kinaze imaju antiproliferativno dejstvo na tumorske ćelije kao i inhibitorni efekat na angiogenezu. Inhibicija mTOR kinaze dovodi i do indukcije autofagije što može dovesti do boljeg odgovora pacijenata sa malignitetima na citotoksičnu terapiju (Kim i saradnici, 2008). AZD2014 se pokazao kao dobar terapeutik u lečenju kolorektalnog kancera. Pokazana je inhibicija proliferacije ćelija kolorektalnog kancera u *in vitro* kao i *in vivo* uslovima i predložena su klinička istraživanja ovog leka za terapiju pomenutog kancera (Huo i saradnici, 2014).

2. CILJEVI

Prvi cilj ove studije je da se ispita uloga ključnih komponenti PI3K/AKT/mTOR i RAS/MAPK/ERK signalnih puteva u patogenezi anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde (ATC) kod pacijenata obolelih od ovog tipa karcinoma. Radi realizacije ovog cilja postavljeni su sledeći zadaci:

1. Analiza promena u *p53* tumor-supresor genu, kao i kod *RAS* (*KRAS*, *HRAS*, *NRAS*) i *BRAF* onkogeni u tumorskim uzorcima pacijenata obolelih od ATC prikupljenim na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije;
2. Imunohistohemijska analiza PTEN, pAKT, pERK proteina kao i P-gp i BCRP pumpi u tumorskim uzorcima pacijenata sa ATC;
3. Ispitati povezanost kod dobijenih promena u ispitivanim genima i proteinima.

Drugi cilj ove studije je analiza inhibicije komponenti PI3K/AKT/mTOR i RAS/MAPK/ERK signalnih puteva kod humanih ATC ćelijskih linija radi utvrđivanja njihovog doprinosa rezistenciji na hemioterapiju, kao i ispitivanje uloge P-gp i BCRP pumpi u rezistenciji kod ATC. Za realizaciju ovog cilja postavljeni su sledeći zadaci:

1. Uporediti citotoksični efekat klasičnih hemioterapeutika i inhibitora komponenti PI3K/AKT/mTOR i RAS/MAPK/ERK signalnih puteva između dediferenciranih anaplastičnih i slabo diferenciranih ćelija karcinoma štitaste žlezde;
2. Ispitati citotoksični efekat kombinacija pomenutih inhibitora sa klasičnim hemioterapeuticima radi utvrđivanja njihovog potencijala za senzitivizaciju ATC;
3. Uspostaviti humanu ATC ćelijsku liniju sa povišenom ekspresijom P-gp i BCRP pumpi i utvrditi njen stepen rezistencije na klasičnu hemioterapiju;
4. Ispitati citotoksični efekat najuspešnijeg inhibitora signalne transdukcije kod ATC ćelijasa povišenom ekspresijom P-gp i BCRP pumpi i utvrditi njegovu efikasnost u senzitivizaciji ovih ćelija na klasičnu hemioterapiju;
5. Uporediti agresivnost i invazivnost parentalne i novouspostavljene ATC ćelijske linije;
6. Ispitati uticaj najuspešnijeg inhibitora signalne transdukcije na invazivnost ATC ćelijskih linija, samostalno i u kombinaciji sa klasičnom hemioterapijom.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. UZORCI TKIVA

Kao eksperimentalni materijal u ovoj doktorskoj disertaciji korišćeni su uzorci genomske dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) izolovane iz parafinskih uzoraka malignog tkiva pacijenata obolelih od anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde. Uzorci tumorskog tkiva za potrebe izrade ove doktorske disertacije prikupljeni su od 12 pacijenata kojima je prvi put dijagnostikovano i hirurškim putem odstranjen anaplastični karcinom štitaste žlezde. Zbog izuzetno niske učestalosti anaplastičnog karcinoma, treba uzeti u obzir da je ovako mali uzorak prikupljen u rasponu od 20 godina. Sve pacijente je operisao profesor dr Radan Dzodić na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije. Uzorci su sakupljeni i analizirani nakon dobijanja dozvole Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije i pisane saglasnosti pacijenata, a u skladu sa etičkim standardima Helsinške deklaracije donete 1964. godine. Histopatološka klasifikacija svih 12 uzoraka tumora je izvršena po kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization, WHO*) iz 2007. godine (Louis i saradnici, 2007).

3.1.1. IZOLACIJA DNK IZ TUMORSKOG TKIVA

3.1.1.1. Izolacija genomske DNK iz parafinskih preseka tumorskog tkiva

Genomska DNK je izolovana iz parafinskih preseka tumorskog tkiva 12 pacijenata kao i iz 5 uzoraka normalnog tkiva štitaste žlezde korišćenjem kompleta proizvođača KAPA (KAPA Express Extract DNA Extraction Kit). DNK izolovana iz normalnog tkiva je objedinjena i korišćena u daljim eksperimentima kao kontrolni uzorak. Procedura izolacije se sastoji iz sledećih koraka:

1. Staviti tkivne preseke ($\leq 80 \mu\text{m}$) u 1,5 mL tubicu.

2. Dodati 10 μL pufera za ekstrakciju DNK iz parafina, nakon toga dodati 2 μL enzima za ekstrakciju i dodati dejonizovanu vodu do ukupnog volumena od 100 μL .
3. Inkubirati smešu 10 minuta na 75°C u prethodno zagrejanom termobloku. Nakon inkubacije smešu promešati i ponovo inkubirati 5 minuta na 95°C da bi se inaktivirao enzim za ekstrakciju DNK.
4. Centrifugirati smešu i prebaciti vodeni rastvor u novu tubicu od 0.5 mL.
5. Izolovanu DNK čuvati na -20°C .

3.1.1.2. Provera kvaliteta DNK

Očuvanost i kvalitet izolovane DNK je proverena elektroforezom uzoraka na 0,8% agaroznom gelu. Agarozni gel se pravi rastvaranjem 0,8 grama agaroze u 100 mL 1xTBE pufera, pH 8,2 (0,09 M Tris-borat, 0,02 M EDTA), zagrevanjem u mikrotalasnoj pećnici do rastvaranja. U agarozni rastvor, ohlađen do 50°C , dodaje se finalno 0,4 $\mu\text{g/mL}$ etidijum bromida, a zatim se gel izliva u kalup za elektroforezu i ostavi da polimeriše. Uzorak DNK se priprema tako što se 5 μL rastvora DNK pomeša sa 1 μL boje (0,4% bromfenol plavo u 50% glicerolu) i zatim se nanosi na polimerizovan agarozni gel. Elektroforeza se vrši u 1x TBE puferu pri naponu od 100 V. Nakon elektroforeze DNK sa vezanim etidijum bromidom se očitava na Gel Doc sistemu (Gel Doc 1000, Bio Rad, SAD). Intaktna DNK daje jasne oštre trake, dok degradirani molekuli formiraju razmaz duž gela.

3.1.2. ANALIZA MUTACIONOG STATUSA *p53*, *RAS* (*KRAS*, *HRAS*, *NRAS*) i *BRAF* GENA

3.1.2.1. PCR SSCP metoda

Da bi se odredio mutacioni status pet najčešće mutiranih egzona *p53* gena (egzoni 5-9) tumorska DNK svih 12 pacijenata je prvo umnožena PCR metodom, a zatim analizirana primenom SSCP metode (engl. *Single Strand Conformation Polymorphism*). Paralelno sa tumorskim uzorcima, uporedo je analiziran normalan uzorak štitaste žlezde. Amplimeri i uslovi PCR reakcija korišćeni u eksperimentu su prikazani u Tabeli 1. Po završenoj amplifikaciji, PCR produkti su analizirani na

prisustvo mutacija. SSCP metoda se zasniva na detekciji mutacija na osnovu drugačije pokretljivosti različitih konformacija denaturisane jednolančane DNK tokom elektroforeze na poliakrilamidnom (PAA) gelu, a koje su posledica razlika u primarnoj strukturi DNK, tj. baznog sastava. Prethodno denaturisani DNK molekuli putuju različitom brzinom kroz PAA gel ukoliko se razlikuju u primarnoj strukturi, tj. ukoliko su prisutne mutacije. Zahvaljujući različitoj pokretljivosti lanaca iz istog uzorka koji se razlikuju po baznom sastavu dolazi do njihovog razdvajanja u poliakrilamidnom gelu, što se uspešno uočava bojenjem gela. Primenom ove metode moguće je uočiti razlike na nivou pojedinačnih nukleotida. Metoda je izvedena po proceduri opisanoj u radu (Orita i saradnici, 1989) i sastoji se iz pripreme uzoraka, elektroforeze na poliakrilamidnom gelu i bojenja gela srebrom. Uzorci, prethodno umnoženi PCR reakcijom, su pripremljeni tako što im je dodata boja bromfenol-plavo/ksilen-cijanolo (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) pomešana sa formamidom u odnosu 1:4 (7.5 μ L uzorka i 10 μ L boje) i potom su termički obrađeni 5 minuta na 95°C i stavljeni na led. Na ovaj način se vrši hemijska i termička denaturacija i sprečava renaturacija dvolančanih DNK molekula pre njihovog nanošenja na gel. Direktno sa leda uzorci su nanošeni na prethodno pripremljeni nedenaturišući poliakrilamidni gel i to pod voltažom (80 V) kako bi se sprečila renaturacija uzoraka. Koncentracije gelova u rasponu od 8-12% sa ili bez glicerola (5-10%) zavisile su od egzona koji je analiziran. Elektroforeza nanetih uzoraka je vršena na 150 V u trajanju od najmanje 5h (SE 600, Vertical Slab Gel Unit, Hoefer Scientific Instruments, SAD). Nakon toga uzorci su vizualizovani bojenjem srebro-nitratom. U proceduri bojenja uzorci na gelu su najpre fiksirani u etanolu (EtOH, C₂H₅OH) u trajanju 5–10 minuta uz mešanje, a potom u 10% azotnoj kiselini (HNO₃) u trajanju od 3 minuta. Nakon dvostrukog ispiranja u dejonizovanoj vodi uzorci su bojani 20–30 minuta srebrom-nitratom (AgNO₃) i ponovo ispirani dejonizovanom vodom. Na kraju je boja razvijana rastvorom natrijum-karbonata (Na₂CO₃) i formaldehida. Reakcija je prekinuta 10% sirćetnom kiselinom (CH₃COOH). Vizuelnom uporednom analizom prisustva tj. odsustva traka između tumorskih uzoraka i kontrole određeno je koji su egzoni *p53* gena mutirani i kod kojih pacijenata. Tumorski uzorci, u kojima su detektovane mutacije PCR-SSCP metodom u egzonima *p53* gena, podvrgnuti su proceduri DNK sekvenciranja.

Tabela 1. Sekvence amplimera i amplifikacioni profili za umnožavanje egzona *p53* gena

Amplimeri	Dužina (bp)	Sekvence amplimera	PCR profil
E5S ^a	269	5'-TGTTCACTTGTGCCCTGACT-3'	95°C (60s) 60°C (60s) 35 ciklusa
E5A ^b		5'-CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG-3'	
E6S	181	5'-GCCTCTGATTCTCTCACTGAT-3'	95°C (60s) 60°C (60s) 72°C (30s) 35 ciklusa
E6A		5'-TTAACCCCTCTCTCCAGAGA-3'	
E7S	171	5'-ACTGGCCTCATCTTGGGCCT-3'	95°C (60s) 60°C (60s) 35 ciklusa
E7A		5'-TGTGCAGGGTGGCAAGTGGC-3'	
E8S	229	5'-TAAATGGGACAGGTAGGACC-3'	95°C (60s) 60°C (60s) 35 ciklusa
E8A		5'-TCCACCGCTTCTTGTCCTGC-3'	
E9S	210	5'-ACTAAGCGAGGTAAGCAAGC-3'	95°C (60s) 60°C (60s) 35 ciklusa
E9A		5'-CTGGAACTTTCCACTTGAT-3'	

^a S, uzvodni amplimer (engl. *sense*); ^b A, nizvodni amplimer (engl. *antisense*).

3.1.2.2. DNK sekvenciranje

Cilj ovog postupka je bio da se potvrde i identifikuju mutacije u *p53* genu kao i da se analizira mutacioni status *KRAS*, *HRAS*, *NRAS* i *BRAF* gena u tumorskim uzorcima anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde. Mutirani egzoni *p53* gena, identifikovani PCR SSCP metodom ponovo su umnoženi primenom para prajmera i uslova reakcije specifičnim za date egzone koji su predstavljeni u Tabeli 1. Egzoni *KRAS*, *HRAS*, *NRAS* i *BRAF* gena su amplifikovani iz genomske DNK, PCR metodom, primenom para prajmera i uslova reakcije specifičnim za pomenute gene (Tabela 2). Dobijeni fragmenti su prečišćeni korišćenjem DNK ekstrakcionog paketa

(DNA extraction kit, Fermentas, Litvanija) prema proceduri proizvođača, zasnovanoj na primeni silikatnog praha koji ima sposobnost vezivanja DNK pri visokim koncentracijama soli, odnosno njenog oslobađanja pri niskim koncentracijama. Kvalitet prečišćenih fragmenta je proveren na 2% agaroznom gelu, nanošenjem na gel 3 μL uzorka smešanog sa 1 μL boje uporedo sa 2,5 μL DNK markera (Fermentas, Litvanija). U odnosu na intenzitet traka i sadržaj DNK markera denzitometrijski se određuju koncentracije prečišćenih uzoraka. Dobijeni PCR proizvodi su istaloženi. Ukratko, PCR proizvodima su dodati EDTA (25 mM finalno) i EtOH (70-75% finalno). Smeša je inkubirana 15 minuta na sobnoj temperaturi, a potom centrifugirana 30-45 minuta na 6000 rpm i temperaturi od 4 °C. Odleven je supernatant i dodata nova količina 70% EtOH i smeša ponovo centrifugirana ali ovog puta 25 minuta na 5000 rpm na istoj temperaturi od 4 °C. Supernatant je ponovo odleven, a dobijeni talog je osušen na 90 °C. Fragmentima u talogu je dodato 15 μL Hi-dye formamida (Applied Biosystems, SAD) kako bi se efikasno denaturisali na 95 °C. 10 μL amplikona rastvorenih u formamidu je potom podvrgnuta automatskoj elektroforezi i očitavanju sekvence na aparatu ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, SAD). Prečišćeni fragmenti su sekvencirani u oba smera (5' i 3') i to modifikacijom metode po Sanger-u (engl. *Dye-terminator Sequencing*). Ova modifikacija se zasniva na primeni fluorescentno obeleženih didezoksinukleotida (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP; jedan tip ddNTP-jedna fluorescentna boja) koji se u jedinstvenoj reakciji sinteze DNK ugrađuju u rastući lanac i prekidaju sintezu. Dobijeni fragmenti, dužine različite za po jednu bazu, se razdvajaju automatskom elektroforezom a tip inkorporiranog ddNTP tj. sekvenca se očitava prema talasnoj dužini emitovanog fluorescentnog signala nakon pobuđivanja laserom u automatskom sekvenceru. Sama procedura sekvenciranja je obuhvatala:

1. dve nezavisne PCR reakcije sekvenciranja (engl. *Cycle Sequencing PCR*), svaka sa po jednim amplimerom (5' i 3') za sekvenciranje u oba smera;
2. precipitaciju dobijenih amplikona;
3. denaturaciju dobijenih amplikona;
4. automatsku elektroforezu.

Na kraju su sekvence analizirane i upoređenje sa wt sekvencom *p53* gena korišćenjem BLAST programa u NCBI GenBank bazi podataka.

Tabela2. Sekvence amplimera i amplifikacioni profili za umnožavanje egzona *KRAS*, *HRAS*, *NRAS* i *BRAF* gena

<i>RAS</i> gen	Egzon	Sekvenca prajmera ¹	PCR uslovi	PCR mešavina u finalnom volumenu od 25μl
<i>K RAS</i>	<i>egzon-2</i>	(a)ATGACTGAATATAAACTTGT (b)CTCTATTGTTGGATCATATT		
<i>K RAS</i>	<i>egzon-3</i>	(a)AAGTAGTAATTGATGGAGAA (b)AGAAAGCCCTCCCCAGTCCT		
<i>H RAS</i>	<i>egzon-1</i>	(a)ATGACGGAACATAAGCTGGT (b)CGCCAGGCTCACCTCTATA	5' na 95°C; 35ciklusa: 1' na 95°C, 1' na 56°C 1' na 65°C; 7' na 65°C	MgCl ₂ 1,5mM dNTP 2 mM prajmeri 0,6 μM Taq 1 U/r
<i>H RAS</i>	<i>egzon-2</i>	(a)AGGTGGTCATTGATGGGGAG (b)AGGAAGCCCTCCCCGGTGCG		
<i>N RAS</i>	<i>egzon-2</i>	(a)CAGGTTCTTGCTGGTGTGAA (b)CTCTATGGTGGGATCATATT		
<i>NRAS</i>	<i>egzon-3</i>	(a)GGTGAAACCTGTTTGTTGGA (b)ATACACAGAGGAAGCCTTCG		
<i>BRAF</i> gen	<i>egzon-15</i>	(a)CTCTTCATAATGCTTGCTCTGAAGG (b)TAGTAACTCAGCAGCATCTCAGG	5' na 95°C; 40 ciklusa: 10'' na 95°C, 30'' na 58°C, 30'' na 72°C; 10' na 72°C	MgCl ₂ 2 mM dNTP 2 mM prajmeri 0,16μM Taq 1 U/reakciji

¹Prajmer (a) – 5' prajmer; prajmer (b) – 3' prajmer korišćen u PCR reakciji

3.1.3. IMUNOHISTOHEMIJSKA ANALIZA PTEN, pAKT, pERK, P-gp i BCRP PROTEINA

Nivo proteinske ekspresije PTEN, P-gp, BCRP kao i fosforilisane forme AKT (pAKT) i ERK (pERK) u tumorskim uzorcima anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde utvrđen je imunohistohemijskom metodom. Procedura se sastoji iz više faza:

1. Deparafinizacija

Parafinski preseci prethodno fiksirani na pločicama za mikroskopiju se stavljaju u kivete sa ksilolom i drže u ksilolu 2 puta po 5 minuta. Zatim se prebacuju u kivete u koje je prethodno sipan alkohol (100%). Nakon 5 minuta u apsolutnom alkoholu pločice su sukcesivno prebacivane u niža razblaženja alkohola (96% i 75%) po 5 minuta svuda. Na kraju su potapane na kratko u destilovanu vodu.

2. Demaskiranje antigena

Pločice su stavljane u čiste kivete sa citratnim puferom pH 6, koji služi za demaskiranje antigena. Kivete su inkubirane 20 minuta u mikrotalasnoj pećnici na 750 W. Nakon toga, pločice su ohlađene na sobnoj temperaturi, a zatim potapane u 3% rastvor vodonik peroksida na 10 minuta. Pločice su potom isprane u destilovanoj vodi i držane u TBS (engl. *Tris Buffered Saline*) puferu 10 minuta (Tris-Cl, NaCl, pH 7,6). Tako pripremljeni preseci su bili spremni za nalivanje antitela.

3. Nalivanje antitela

Prema protokolu proizvođača određena razblaženja PTEN, pAKT, pERK, P-gp i BCRP antitela su nalivana na pločice: PTEN antitelo (Invitrogen, SAD) u odnosu 1:50, pAKT (Novocastra, Nemačka), P-gp (Abcam, Velika Britanija) i BCRP (Abcam, Velika Britanija) u odnosu 1:40 i pERK (Cell Signaling, SAD) u odnosu 1:100. Sva antitela su razblažena u TBS puferu. Nakon nalivanja antitela na pločice, inkubacija je trajala 35 minuta, a zatim su pločice ispirane u TBS-u 2 puta po 20 minuta.

4. Nalivanje detekcionog sistema za vizuelizaciju

Inkubacija sekundarnim antitelom je trajala 30 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim su pločice ispirane TBS puferom dva puta po 3 minuta. Preseci su potom inkubirani u HRP (engl. *horseradish peroxidase*) polimeru 30 minuta na sobnoj temperaturi, pa ispirani dva puta TBS puferom. Nakon ispiranja sipano je 2mL DAB+hromogeni supstrat na svaku pločicu na 5 minuta, a zatim je ispiranje vršeno prvo destilovanom, pa običnom vodom. Svi preparati su na kraju kontrastirani hematoksilinom 3 minuta i isprani vodom. Na kraju procedure pločice su sukcesivno prebacivane u kivete sa rastućom koncentracijom alkohola (70%, 96%, 100%). Dodat je ksilol i pločice su montirane za analizu.

Svi preparati su analizirani nezavisno na svetlosnom mikroskopu Leica DM2500 (Nemačka) od strane dva patologa dr Zorke Milovanović i dr Jelene Stojić.

Imunoreaktivnost PTEN, pAKT i pERK antitela je određena semikvantitativnom metodom koja se zasniva na proizvodu (H), procenta ćelija sa obojenom citoplazmom/jedrom (P) i intenziteta bojenja (I); $H = P * I$. Granične vrednosti na osnovu kojih je određeno da li je ekspresija određenog proteina visoka ili ne, razlikovale su se za različita antitela. Metode računanja su preuzete iz prethodnih publikacija, kako je navedeno dalje u tekstu.

U slučaju PTEN proteina, procenat ćelija sa obojenom citoplazmom/jedrom P je predstavljen na skali od 1 do 3 (0, nema imunoreaktivnosti; 1, 1–10% ćelija obojeno; 2, 11–50% ćelija obojeno; 3, 51–100% ćelija obojeno). Intenzitet bojenja (I) je takođe predstavljen na skali od 1 do 3 (0, nema imunoreaktivnosti; 1, smanjen intenzitet bojenja u odnosu na normalne ćelije; 2, intenzitet bojenja kao kod normalnih ćelija; 3, povećan intenzitet bojenja u odnosu na normalne ćelije). Vrednost dobijena množenjem je upoređivana sa graničnom vrednošću za PTEN po prethodno opisanoj proceduri (Shoman i saradnici, 2005). Na osnovu toga H proizvod manji ili jednak 4 predstavlja nisku ekspresiju a veći od 4 visoku ekspresiju PTEN proteina. Kao pozitivna kontrola za PTEN ekspresiju korišćen je duktalni epitel dojke.

Imunoreaktivnost pAKT proteina je određena na osnovu H proizvoda koji je dobijen množenjem procenta ćelija sa obojenom citoplazmom/jedrom i intenziteta bojenja I (1; slab intenzitet bojenja, 2; umeren intenzitet bojenja, 3; jak intenzitet bojenja u odnosu na normalne ćelije), dajući maksimalan rezultat od 300 ($3 * 100\%$). H proizvod veći od 50 predstavlja visoku ekspresiju pAKT proteina. Kao pozitivna kontrola za proteinsku ekspresiju fosfo-AKT-a korišćen je parafinski preparat ljudske kože (Esteva i saradnici, 2010).

Imunoreaktivnost pERK proteina je predstavljena proizvodom prosečnog intenziteta bojenja citoplazme (na skali od 0 do 3 kao kod pAKT proteina) i procenta ćelija koje pokazuju određeni intenzitet bojenja (0 nijedna; 0,1 manje od jedne desetine ćelija, 0,5 manje od polovine, i 1 više od polovine obojenih ćelija). H proizvod veći od 1 je smatran povišenom ekspresijom pERK proteina (Handra-Luca i saradnici, 2003). Kao pozitivna kontrola za pERK ekspresiju korišćen je duktalni epitel dojke.

U slučaju P-gp i BCRP proteina, granične vrednosti su utvrđene samo na osnovu procenta obojenih ćelija. Procenat ćelija sa obojenom membranom je bodovan od 0 do 3 i to na sledeći način; 0 = 0%, 1 = <10%, 2 = 11-50%, i 3 = >50% pozitivnih ćelija. Uzorci sa rezultatom 2 ili 3 smatrani su pozitivnim ili visoko eksprimirajućim (Pakos i Ioannidis, 2003; Zurita i saradnici, 2003). Kao pozitivna kontrola za BCRP protein korišćen je parafinski preparat humane placentе, a za P-gp protein tkivo bubrega.

H proizvod i granične vrednosti za svaki analizirani protein su predstavljeni u Tabeli 3.

Tabela 3. Metode za određivanje imunoreaktivnosti proteina

Proteini	Skala procenta ćelija (P)	Skala intenziteta bojenja (I)	Maksimalna vrednost proizvoda (H=P*I)	Granična vrednost
PTEN	0;nema imunoreaktivnosti 1; 1–10% ćelija obojeno 2; 11–50% ćelija obojeno 3; 51–100% ćelija obojeno	0;nema imunoreaktivnosti 1; smanjen intenzitet bojenja u odnosu na normalne ćelije 2; intenzitet bojenja kao kod normalnih ćelija 3; povećan intenzitet bojenja u odnosu na normalne ćelije	Hmax=3*3=9	H>4; povišena ekspresija
pAKT	Procenat obojenih ćelija se množi sa intenzitetom	0;nema imunoreaktivnosti 1; smanjen intenzitet bojenja u odnosu na normalne ćelije 2; intenzitet bojenja kao kod normalnih ćelija 3; povećan intenzitet bojenja u odnosu na normalne ćelije	Hmax=100*3=300	H>50; povišena ekspresija
pERK	0;nema imunoreaktivnosti 0,1; 1–10% ćelija obojeno 0,5; 11–50% ćelija obojeno 1; 51–100% ćelija obojeno	0;nema imunoreaktivnosti 1; smanjen intenzitet bojenja u odnosu na normalne ćelije 2; intenzitet bojenja kao kod normalnih ćelija 3; povećan intenzitet bojenja u odnosu na normalne ćelije	Hmax=1*3=3	H>1; povišena ekspresija
P-gp	0;nema imunoreaktivnosti 1; 1–10% ćelija obojeno 2; 11–50% ćelija obojeno 3; 51–100% ćelija obojeno		granične vrednosti su utvrđene samo na osnovu procenta obojenih ćelija	P≥2; povišena ekspresija
BCRP	0;nema imunoreaktivnosti 1; 1–10% ćelija obojeno 2; 11–50% ćelija obojeno 3; 51–100% ćelija obojeno		granične vrednosti su utvrđene samo na osnovu procenta obojenih ćelija	P≥2; povišena ekspresija

3.2. *IN VITRO* EKSPERIMENTALNE PROCEDURE

3.2.1. TERAPEUTICI

U eksperimentima su korišćene sledeći terapeutici: paklitaksel (PTX) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), doksorubicin (DOX) (EBEWE Arzneimittel GmbH, Beč, Austrija), cisplatina (CPT) (Pfizer (Perth) Pty Ltd, Australija) zatim GSK690693 (AKT inhibitor), tipifarnib (RAS inhibitor), AZD2014 (mTOR inhibitor), dabrafenib (BRAF inhibitor) i vortmanin (PI3K inhibitor) koji su dobijeni na poklon od SelleckChem, SAD. GSK690693, tipifarnib, AZD2014, dabrafenib i vortmanin su rastvoreni u dimetil-sulfoksidu (DMSO) i 10 mM alikvoti su čuvani na -20°C. PTX je rastvoren u 100% etanolu i 1 mM alikvoti su čuvani na -20°C. DOX je rastvoren u dejonizovanoj vodi i njihovi 1 mM rastvori su čuvani na -20°C. CPT je rastvoren u sterilnoj vodi i čuvana na sobnoj temperaturi u koncentraciji od 1mM. Pre tretmana, svi terapeutici su rastvarane u sterilnoj vodi.

3.2.2. ĆELIJSKE LINIJE

U istraživanju su korišćene tri humane ćelijske linije karcinoma štitaste žlezde (oznaka: SW1736, FRO i 8505C). FRO je humana ćelijska linija slabo diferenciranog karcinoma štitaste žlezde, a 8505C je humana ćelijska linija anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde, koje su dobijene na poklon od profesora Alfreda Fuska sa Instituta za endokrinologiju i eksperimentalnu onkologiju, Nacionalni centar za istraživanja, Napulj, Italija. SW1736 ćelijska linija je humana linija anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde dobijena na poklon od Odeljenja za imunologiju, Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Beograd, Srbija.

FRO i 8505C ćelije su kultivisane u DMEM medijumu uz dodatak 10% FBS, 2 mM L-glutamina i smeše antibiotika 5000 U/mL penicilina i 5 mg/mL streptomicina. SW1736 ćelije su kultivisane u RPMI-1640 medijumu uz dodatak 10% FBS-a, 2 mM L glutamina i smeše antibiotika 10 000 U/mL penicilina, 10 mg/mL streptomicina, i antimikotika 25 µg/mL amfotericina B. Kulture ovih ćelija su održavane u inkubatoru (Sanyo Instruments, Japan) na temperaturi 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Pasaža ćelija je vršena po dostizanju 80-90% konfluentnosti u

flaskovima površine 25 cm² i 75 cm² (Nalgene Nunc, Danska) pomoću 0,25% tripsin/EDTA rastvora. Broj ćelija je određivan na invertnom mikroskopu (Olympus, Nemačka). Ćelije su potom zasejavane u odgovarajućoj gustini u svež medijum za dalje eksperimente ili za dalje umnožavanje i održavanje u kulturi (10 000 ćelija/cm² za FRO, 20 000 ćelija/cm² za 8505C i 20 000 ćelija/cm² za SW1736 ćelije).

3.2.3. SORTIRANJE 8505C ĆELIJSKE LINIJE SA NISKOM AKUMULACIJOM RODAMINA

Ćelijska linija Rho- je dobijena sortiranjem parentalne 8505C ćelijske linije na smanjenu akumulaciju rodamina 123 (Rho123), supstrata za P-gp pumpu. Akumulacija fluorescentnog Rho123 je analizirana metodom protočne citofluorimetrije. Ovako određen intenzitet fluorescence Rho123 u vijabilnim ćelijama je srazmeran njihovoj akumulaciji (Zheng i saradnici, 2009).

8505C ćelije su kultivisane u flaskovima površine 75 cm² i nakon postizanja 80-90% konfluentnosti, ćelije su tripsinizirane i resuspendovane u tubice sa 1 mL medijuma. Zatim su ćelije tretirane sa 5 µM Rho123. Tretman je trajao 30 minuta u inkubatoru na temperaturi 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Na kraju perioda predviđenog za akumulaciju Rho123, ćelije su nataložene centrifugiranjem 5 minuta na 1800 rpm (Centrifuge 5804 Eppendorf, Nemačka). Zatim su isprane hladnim 1xPBS-om i ponovo centrifugirane 5 minuta na 1800 rpm. Ćelije spremne za analizu su resuspendovane u PBS-u i potom sortirane na protočnom citofluorimetru (BD FACSAria III, Becton Dickinson, Velika Britanija) u novu tubicu sa kompletnim DMEM medijumom. Narandžasta fluorescenca Rho 123 je merena na kanalu za fluorescencu 2 (FLH-2) pri talasnoj dužini 530 nm. Za analizu uzorka prikupljeno je 6 000 000 pojedinačnih događaja (vijabilnih ćelija). Kao kontrola korišćene su neobojene ćelije (ćelije koje nisu inkubirane u medijumu sa Rho 123). Sortirano je 100 000 ćelija sa smanjenom akumulacijom Rho123. Ćelije su nakon sortiranja zasejavane u svež DMEM medijum za dalje eksperimente ili za dalje umnožavanje i održavanje u kulturi.

3.2.4. ODREĐIVANJE BROJA ČELIJA

Bojenjem ćelija tripan-plavim (engl. *trypan blue*) dobija se uvid u njihovu brojnost i kvalitet. Princip bojenja se zasniva na činjenici da TB ne prodire u unutrašnjost živih ćelija koje imaju intaktnu ćelijsku membranu, te one ostaju neobojene (pod mikroskopom svetle beličaste ćelije). Na taj način, vijabilne ćelije se mogu razlikovati od mrtvih ćelija. Brojanje ćelija je vršeno mikroskopski na hemocitometru. Za postavljanje eksperimenata brojanja odnos razblaženja 0,4% TB rastvora u 1x PBS, 1x PBS i ćelija u medijumu je bio 5:3:2. U periodu od 5 minuta je omogućeno prodiranje TB u mrtve ćelije. Zatim je po 10 µL obojene ćelijske suspenzije ubrizgano u obe izbrazdane komorice hemocitometra. Ćelije su brojane u obe komorice hemocitometra, u po 5 pet polja. Ukupan broj živih ćelija je određivan po sledećem obrascu: ukupan broj ćelija/mL = prosečan broj ćelija po kvadrantu komorice $\times$ razblaženje ćelija $\times 10^4$, gde je 10^4 faktor komorice.

3.2.5. MTT TEST VIJABILNOSTI

Pojedinačni efekat PTX, DOX, CPT, AKT inhibitora (GSK690693), RAS inhibitora (Tipifarnib), mTOR inhibitora (AZD2014), BRAF inhibitora (dabrafenib) i PI3K inhibitora (vortmanin), kao i efekat kombinacije citostatika (PTX, DOX) sa inhibitorima na rast ćelijskih linija karcinoma štitaste žlezde ispitivan je primenom MTT testa. MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijum bromid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) test se zasniva na sposobnosti vijabilnih ćelija da na membrani funkcionalnih mitohondrija redukuju tetrazolijumovu so u formazan (Berridge i saradnici, 2005).

1. Na kraju perioda predviđenog za tretman ćelija u mikrotitar pločama sa 96 bunarića, po 100 µL MTT rastvora (2 mg/mL) je dodato u svaki bunarić.
2. Naredna 4h, omogućeno je stvaranje formazana u vijabilnim ćelijama u inkubatoru na temperaturi 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂.
3. Zatim je medijum odliven i kristali formazana rastvoreni u DMSO, 10 minuta na sobnoj temperaturi.
4. Apsorbanca je određena pomoću ELISA čitača (LKB 5060-006 Micro Plate Reader, Austrija), na talasnoj dužini 540 nm, sa korekcijom na 630 nm.

5. Na osnovu dobijene apsorbance je određen procenat inhibicije ćelijskog rasta (IC) prema sledećoj formuli:

$$IC (\%) = 1 - (A_{\text{tretirani uzorak}} / A_{\text{netretirana kontrola}}) \times 100$$

Koncentracija citostatika koja dovodi do 50% inhibicije rasta ćelijske linije se definiše kao IC₅₀ vrednost. IC₅₀ vrednost se izračunava pomoću linearne regresije u *Excel* programu. Testovi citotoksičnosti su rađeni u triplicatu i najmanje dva puta ponovljeni. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost triplikata ± standardna greška.

3.2.5.1. Jednokratni tretman i istovremene kombinacije

Za ispitivanje jednokratnog efekta terapeutika (PTX, DOX, CPt, GSK690693, tipifarnib, AZD2014, dabrafenib i vortmanin) na inhibiciju ćelijskog rasta, ćelije su zasejavane 24h pre tretmana. Nakon adaptacije ćelija, tretman drogama je trajao 72h. Opseg koncentracija korišćenih u tretmanima je varirao za različite terapeutike (PTX (10–1000 nM), DOX (10–1000 nM), Cpt (2,5–50 μM), GSK690693 (1–25 μM), tipifarnib (0,05–1 μM), AZD2014 (10–250 nM) dabrafenib (0,1–5 μM) i vortmanin (2,5–50 μM)). Za potrebe testova vijabilnosti ćelije su zasejavane u mikrotitar ploče sa 96 bunarića (Nunc, Nalgene, Danska). Gustina FRO ćelija je bila 2000 po bunariću u 100 μL medijuma, a gustina SW1736 ćelija 1000 po bunariću u 100 μL medijuma. Kao kontrola su korišćene istovremeno zasejane netretirane ćelije. U ovako osmišljenom eksperimentalnom modelu, pored pojedinačnih efekata terapeutika, ispitan je i istovremeni kombinovani efekat PTX-a i DOX-a sa sledećim drogama: GSK690693, tipifarnibom, AZD2014, dabrafenibom i vortmaninom u trajanju od 72h na SW1736 i FRO ćelijskim linijama. U istovremenim tretmanima korišćene su 3 koncentracije sledećih terapeutika: GSK690693 (1; 2,5 i 5 μM), tipifarnib (0,25; 0,5 i 1 μM), AZD2014 (0,025; 0,05 i 1 μM), dabrafenib (0,01; 0,05 i 0,1 μM) i vortmanin (2,5; 5 i 10 μM) u kombinaciji sa PTX (0,01–0,05 μM) ili DOX (0,025–0,5 μM).

Za ispitivanje jednokratnog efekta droga PTX i AZD2014 na inhibiciju ćelijskog rasta 8505C i Rho- ćelija korišćen je opseg koncentracija PTX (5–1000 nM) i AZD2014 (10–500 nM). Gustina ćelija je bila 2000 ćelija po bunariću u 100 μL medijuma. Kao kontrola su korišćene istovremeno zasejane netretirane ćelije. Ispitan je i istovremeni kombinovani efekat PTX-a sa AZD2014 u trajanju od 72h.

3.2.6. ANALIZA EFEKATA DOBIJENIH KOMBINOVANJEM TERAPEUTIKA

Analiza efekata droga u kombinaciji je izvršena na osnovu podataka o procentu inhibicije ćelijskog rasta u MTT testu. Priroda međudejstva (sinergizam, antagonizam ili aditivni efekat) dve droge je određena primenom CalcuSyn softvera. Ovaj program koristi metod kombinacionog indeksa (Chou i Talalay, 1984), koji se zasniva na jednačini srednjeg efekta više droga. Ovaj metod uzima u obzir efekat svake supstance pojedinačno, efekat dve supstance u kombinaciji, kao i njihovog doza–efekat linearnog grafikona. Ova analiza zahteva da se raspolaže vrednostima inhibicije za po najmanje tri doze svake supstance pojedinačno. CalcuSyn program pruža mogućnost prikaza rezultata međudejstva dve supstance klasičnim izobologramom ili tabelarno sa vrednostima kombinacionog indeksa (CI). Raspodela vrednosti kombinacionog indeksa, koje opisuju prirodu međudejstva: sinergizam ($CI < 0,9$), antagonizam ($CI > 1,1$) i aditivni efekat ($CI = 0,9-1,1$), preuzeta je iz prethodno objavljenog rada (Peters i saradnici, 2000). CI vrednosti prikazane u ovom radu su reprezentativni rezultati najmanje dve izvedene analize.

3.2.7. IMUNOCITOHEMIJSKA ANALIZA PTEN, pAKT, pERK, P-gp i BCRP PROTEINA

Ekspresija PTEN, BCRP i P-gp proteina kao i fosforilisane forme AKT (pAKT) i ERK (pERK) proteina u ćelijskim linijama (SW1736, FRO, 8505C) određena je imunocitohemijski. Procedura se sastoji iz više faza:

1. Sve ćelijske linije su umnožene, prebrojane i zasejane u komore na adhezivnoj pločici (engl. *Chamber Slide*). Zasejano je po 40 000 ćelija od svake linije u zasebne komore na pločici i komore su ostavljene u inkubatoru na 37°C. Nakon 24h odliven je medijum i ćelije su fiksirane sa 4%-tnim rastvorom paraformaldehida (PFA). Komore su odlepljene sa adhezivne pločice i tako pripremljena pločica je prebačena u komoru sa TBS puferom i držana 7 minuta na sobnoj temperaturi.
2. Demaskiranje antigena

Pločice su držane u vodenom kupatilu 20 minuta na 65 °C u odgovarajućem puferu prema protokolu proizvođača za određeno antitelo (PTEN, pAKT pERK, BCRP, P-gp).

3. Ostali koraci su isti kao kod imunohistohemijske analize ekspresije PTEN, pAKT, pERK, BCRP i P-gp proteina opisane u odeljku 3.1.3.

Svi preparati su analizirani nezavisno na svetlosnom mikroskopu Leica DM2500 (Nemačka) od strane dva patologa, dr Zorke Milovanović i dr Jelene Stojić. Imunoreaktivnost PTEN, pERK, pAKT, P-gp i BCRP proteina je određena semikvantitativnom metodom opisanom u odeljku 3.1.3.

3.2.8. ANALIZA AKUMULACIJE RODAMINA I EKSPRESIJE P-gp I BCRP PUMPI KOD 8505C I Rho- ĆELIJA

Nivo akumulacije rodamina i ekspresije P-gp-a u parentalnim 8505C kao i rezistentnim Rho- ćelijama analiziran je metodom protočne citofluorimetrije. Priprema ćelija za analizu akumulacije rodamina je ista kao i njihova priprema za sortiranje opisana u odeljku 3.2.3.

U slučaju ekspresije P-gp i BCRP membranskih pumpi, ćelije su tripsinizirane, ispirane u hladnom PBS-u i direktno bojene FITC-konjugovanim P-gp ili BCRP antitelom (BD Biosciences, Velika Britanija) u zapreminskom odnosu prema PBS-u 1:10, 30 minuta na ledu u mraku. Izotipska kontrola IgG2bκ (Abcam, Velika Britanija) je korišćena kako bi se diskriminisala nespecifična fluorescenca. Pre analize, ćelije su fiksirane u 4% paraformaldehidu. Uzorci su čuvani na ledu u mraku do očitavanja na protočnom citofluorimetru FACSCalibur (Becton Dickinson, Velika Britanija). Fluorescenca FITC-konjugovanog anti-P-gp i anti-BCRP je određena na FLH-1 kanalu na talasnoj dužini 530 nm. Za analizu u svakom uzorku je prikupljeno 10 000 pojedinačnih događaja (vijabilnih ćelija), a dobijeni rezultati su analizirani softverskim paketom CellQuest Pro Software (Becton Dickinson, Velika Britanija).

3.2.9. IZOLACIJA PROTEINA IZ ĆELIJA I WESTERN BLOT ANALIZA pAKT i pERK PROTEINA

3.2.9.1. Izolacija proteina

8505C i Rho- ćelije su kultivisane u pločama sa 6 bunarića i nakon postizanja 80-90% konfluentnosti odličen je medijum i ćelije su isprane sa PBS rastvorom. U svaki bunarić je sipano 100 μ L SDS-DTT pufera u koji je dodat proteazni inhibitor u koncentraciji 1 μ L/mL. Nakon 5 minuta ćelije su odlepljene i prebačene u tubicu od 0,5 mL koja se nalazila na ledu. Nakon toga su ćelije stavljene u sonifikator (Vibra Cell, Sonics i Materials Inc., SAD) na 5 minuta da se eliminiše DNK. Zatim su tubice prebačene u termalni blok prethodno zagrejan na 95°C. Nakon 2 minuta na 95°C, tubice su centrifugirane 5 minuta na maksimalnoj brzini. Supernatant u kome se nalaze proteini je prebačen u nove tubice od 0,5 mL i zamrznut na -80°C.

Koncentracija ukupnih proteina određena je metodom po Bradfordu pomoću komercijalno nabavljenog kompleta (Bio-Rad Protein Assay Komplet II, Bio-Rad Laboratories, SAD), tzv. mikrometodom, po uputstvu proizvođača. U 150 μ L dejonizovane vode dodato je 10 μ L uzorka i 40 μ L koncentrovane boje i nakon 30 minuta očitana je apsorbanca na 595 nm na "ELISA" čitaču (Bio-Rad Laboratories, SAD). Koncentracija uzoraka određena je iz standardne krive dobijene upotrebom poznatih koncentracija albumina goveđeg seruma (engl. *Bovine Serum Albumin* – BSA; Sigma Aldrich, Nemačka).

3.2.9.2. Western blot analiza

Western blot metoda je korišćena za određivanje količine pAKT i pERK proteina u 8505C i Rho- ćelijama i sastojala se iz više koraka.

3.2.9.2.1. Elektroforeza proteina

Elektroforetsko razdvajanje proteina prema molekulskoj težini vršeno je na SDS denaturišućim poliakrilamidnim gelovima (SDS-PAGE). Korišćena je mini aparatura za elektroforezu (Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories, SAD). Gel za razdvajanje je pored akrilamid/bisakrilamida (Sigma Aldrich, Nemačka) u odnosu 29:1, čija je finalna koncentracija u smesi iznosila 10%, sadržavao i 0,375 M Tris pH 8,8 i 0,1% SDS. Gel za koncentrisanje bio je sledećeg sastava: 5% akrilamid/bisakrilamid (29:1); 0,125 M Tris pH 6,8 i 0,1% SDS. Za

polimerizaciju je korišćeno 60 μ L 10% amonijum persulfata i 5 μ L TEMED-a na 10 mL smese, za oba gela.

Količina proteina koja je nanošena na gel je optimizovana eksperimentalno za svaki protein pomoću krivih sa sukcesivnim razblaženjima proteina, a sa koncentracijama primarnog antitela preporučenim od strane proizvođača. Kao optimalna količina proteina uzeta je ona koja se nalazi u linearnom opsegu krive u zavisnosti od intenziteta signala i količine nanetih proteina. Za analizu ekspresije pERK i pAKT proteina nanošeno je 30 μ g proteina po bunariću. Kao pufer za nalivanje korišćen je 2 x Laemmli pufer (31,25 mM Tris pH 6,8; 10% glicerol; 1% SDS; 5% 2-merkaptotanol; 0,025% bromfenol plavo) dodat uzorku u odnosu 1:1. Uzorci su pre nalivanja dodatno denaturisani kuvanjem 5 minuta na 95°C. Kao standard za molekulsku težinu korišćen je obojeni "Rainbow" marker širokog opsega (GE Healthcare, SAD). Elektroforeza je vršena u puferu za elektroforezu standardnog sastava (192 mM glicin; 25 mM Tris pH 8,3; 0.1% SDS) pod konstantnim naponom od 150 V na sobnoj temperaturi.

3.2.9.2.2. Prenos proteina sa SDS-poliakrilmidnog gela na PVDF membranu i imunološka detekcija imobilizovanih proteina

Prenos (transfer) proteina sa poliakrilmidnog gela na PVDF membranu je vršen korišćenjem sistema za transfer (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories, SAD). Nakon završene elektroforeze gel za razdvajanje je pažljivo uklonjen sa staklene ploče i prenet u posudu sa puferom za transfer (20% metanol; 192 mM glicin; 25 mM Tris pH 8,3), gde je ostavljen narednih 30 minuta (ekvilibracija gela). PVDF (Immobilon P, Millipore, SAD) je prvo aktivirana u metanolu a zatim isprana u destilovanoj vodi 5 minuta. Nakon toga je prebačena u posudu sa puferom za transfer gde je ekvilibrisana narednih 20 minuta. Pomoćne komponente (filter papir, *Watman* papir, sunderi) su takođe pripremljene potapanjem u pufer za transfer 20 minuta. Nakon slaganja svih komponenti u kasetu za transfer i ulaganja u tank sa puferom, elektrotransfer proteina je vršen tokom 70 minuta, pod konstantnim naponom od 120 V na sobnoj temperaturi. Po završenom transferu membrane su sušene na sobnoj temperaturi (120 minuta, po preporuci proizvođača). Vizuelizacija proteinskih traka je vršena nakon aktivacije suvih membrana (kratko potapanje u metanol), potapanjem u Ponceau S boju (1% Ponceau S boja; 5% glacijalna sirćetna kiselina; destilovana voda). Gelovi su bojeni bojom (0,25%

Coomassie Brilliant Blue R250; 10% glacijalna sirćetna kiselina; 45% metanol; destilovana voda), u cilju dobijanja vizuelne potvrde uspešnosti transfera. Membrane su zatim odbojene ispiranjem u destilovanoj vodi.

3.2.9.2.3. Imunološka detekcija imobilizovanih proteina

Ova detekcija je rađena na membranama koje su blokirane u rastvoru obranog mleka (5%) u Tris-boratom puferu sa dodatkom Tween-20 deterdženta (TBS-T: 20 mM Tris-HCl pH 7,6; 137 mM natrijum hlorid; 0,05% Tween 20). Blokiranje membrane je trajalo oko 60 minuta na sobnoj temperaturi, a rađeno je u cilju smanjivanja intenziteta nespecifičnog vezivanja antitela. Nakon blokiranja membrane su ispirane u TBS-T puferu 15 minuta, koji je zatim odliven i zamenjen rastvorom za blokiranje u koji su dodata primarna antitela. Korišćena su sledeća primarna antitela: mišje monoklonsko pERK antitelo i mišje monoklonsko tERK (total ERK) antitelo (Santa Cruz, SAD; razblaženje 1:1000 za oba antitela); zečje poliklonsko pAKT i zečje poliklonsko tAKT (total AKT) (Santa Cruz, SAD; razblaženje 1:1000 za oba antitela). Nakon inkubiranja sa primarnim antitelom membrane su ispirane 3 puta po 10 minuta u TBS-T puferu (da bi se uklonila primarna antitela koja se nisu specifično vezala), i potom dalje inkubirane 60 minuta na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim antitelima: poliklonsko anti-zečje antitelo IgG HRP (DAKO; razblaženje 1:1000) i poliklonsko anti-mišje antitelo IgG HRP (Dako; razblaženje 1:1000). Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelom, membrane su ispirane 3 puta po 10 minuta u TBST-u, a zatim izložene dejstvu luminola (komercijalni komplet za hemiluminescenciju RNP 2106 Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences, Velika Britanija). Membrana je inkubirana u substratu 1 minut, ocedena i izložena autoradiografskom filmu osetljivom na plavu svetlost u trajanju od 1 do 5 minuta. Filmovi su razvijeni odmah po završetku ekspozicije membrane i skenirani radi dalje analize.

3.2.9.2.4. Semikvantitativna analiza imunoblotova

Intenzitet dobijenih signala kvantifikovan je denzitometrijski, korišćenjem kompjuterskog programa za analizu signala (ImageQuant 5.0). Vrednosti dobijene za ciljne proteine su normalizovane u odnosu na odgovarajući aktin, kao kontrolu za nanetu količinu totalnih proteina. Tako dobijene relativne vrednosti su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje.

3.2.10. ZARASTANJE POVREDE

Metodom zarastanja povrede (**engl. *Wound Healing***) se ispituje sposobnost ćelija kancera da migriraju kao i sposobnost određenih terapeutika da inhibiraju migraciju ovih ćelija. Ovaj eksperiment je rađen na 8505C ćelijskoj liniji kao i subliniji Rho-, dobijenoj sortiranjem 8505C ćelijske linije na smanjenu akumulaciju Rho123 (opisano u odeljku 3.2.3.). Procedura se sastoji iz više faza:

1. Obe ćelijske linije su umnožene, prebrojane i zasejane u adhezivne ploče sa 24 bunarića. Po bunariću je sejano 200 000 ćelija što je dovoljno da ćelije oforme konfluentan monosloj nakon 24h. Ćelije su kultivisane u 500 μ L DMEM medijuma po bunariću.
2. Nakon 24h u inkubatoru na 37°C ćelije su tretirane sa odgovarajućim supstancama radi provere njihovog uticaja na migraciju ćelija. U svakom bunariću zagreban je monosloj ćelija srednjim nastavkom pod pravim uglom pri čemu se vodilo računa da svi bunarići budu jednako zagrebani u obliku krsta. U svakom bunariću je promenjen medijum da bi se odstranile odlepljene ćelije. Ćelije su tretirane sa PTX, AZD2014 kao i kombinacijom ove dve supstance. Ćelije su tretiranje koncentracijama droga nižim od IC50 vrednosti kombinacije dobijene prethodno odrađenim MTT testom, kao i pojedinačnim vrednostima droga iz kombinacije. Odmah nakon tretmana slikan je svaki bunarić na svetlosnom mikroskopu na 2 puta uvećanju tako da procep u obliku krsta bude centralno pozicioniran na slici. Ćelije su vraćene u inkubator i nakon 24h od tretmana slikan je svaki bunarić. Rezultati su analizirani u programu ImageJ. Merena je površina krsta kako u kontroli tako i u tretmanima na 24h. Tretmani koji su pokazali najveću inhibiciju migracije ispitivani su u daljim eksperimentima ispitivanja invazivnih karakteristika kancer ćelija.

3.2.11. DEGRADACIJA ŽELATINA

Merenjem stepena degradacije želatina utvrđuje se sposobnost ćelija da degradiraju vanćelijski matriks. Kao model koristi se želatin od svinjske kože koji je

konjugovan sa fluorescentno zelenom bojom (engl. *Gelatin From Pig Skin, Oregon green 488 conjugate*), proizvođača Life Technologies, SAD. Ovaj želatin je supstrat za matriksne metaloproteinaze 2 i 9. Cilj eksperimenta je bio da se utvrdi sposobnost 8505C ćelijske linije i njene Rho- sublinije da degradiraju vanćelijski matriks. Postupak se sastoji iz više faza:

1. Pokrovna stakla su sterilisana 3h na 180°C i postavljena u bunariće na pločama sa 6 mesta.
2. Želatin je prethodno zagrejan 10 minuta na 37°C i rastvoren u PBS puferu u odnosu 1:5. Ovako pripremljeni želatin (1mg/μL finalno) je sipan na svako pokrovno staklo, a potom je dodato 50 μL 0,5% gluteraldehida, koji služi sa umrežavanje želatina i stvaranje njegove nerastvorljive varijante.
3. Pokrovna stakla se okrenu tako da želatin bude sa donje strane i ploča sa 6 bunarića se inkubira 15 minuta na 4°C, a zatim se pločice prebace u novu ploču sa 6 bunarića tako da želatin bude sa gornje strane pokrovnog stakla. Želatin se ispere 3 puta PBS puferom i pokrovna stakla su tada spremna za eksperiment
4. Prethodno umnožene ćelijske linije 8505C i Rho- su prebrojane i zasejavano je 40 000 ćelija od svake linije na pokrovna stakla. Ćelije su držane 3h u inkubatoru na 37°C. Nakon toga je dodato po 1mL DMEM medijuma u bunariće.
5. Nakon 24h u inkubatoru na 37°C odliven je medijum i ćelije su fiksirane sa 4% rastvorom PFA. Zatim je dodat 0,1% rastvor Triton X u PBS puferu. Nakon 10 minuta na pločice je sipan ActinRedTM555 (Life Technologies, SAD) prema protokolu proizvođača. Pokrovno staklo se fiksira na pločicu u Hoechst+glicerol rastvoru. ActinRedTM555 služi za vizuelizaciju aktina a Hoechst za vizuelizaciju ćelijskih jedara. Pločice su slikane na 40 puta uveličanju na *Zeiss Axiovert* fluorescentnom mikroskopu (Carl Zeiss Foundation, Nemačka) korišćenjem softvera, AxioVision 4.8.
6. Rezultati su analizirani u programu ImageJ. Meren je broj ćelija koje su degradirale želatin kao i obim degradirane oblasti u želatinu. Računat je odnos obima degradirane oblasti u odnosu na obim ćelija što predstavlja stepen degradacije pojedinačne ćelije. Analizirano je najmanje 100 ćelija po eksperimentu.

3.2.12. TEST INVAZIVNOSTI

Metastatski potencijal tumorske ćelije ogleda se, između ostalog, i u njenoj sposobnosti da se kreće ka izvoru hemijskog ili fizičkog stimulusa (migracija) i da tom prilikom enzimatski razgradi prepreke u vidu proteina vanćelijskog matriksa ili bazalne membrane (invazija). Sposobnost invazije ćelija utvrđena je ispitivanjem migracije ćelija kroz poroznu membranu obloženu matrigelom. U tu svrhu se koristi komercijalno dostupan Matrigel® – smeša vanćelijskih proteina koje sekretuju *Engelbret-Holm-Svarm* (EHS) ćelije mišjeg sarkoma. Za procenu invazije 8505C i Rho- ćelija *in vitro* korišćene su komorice čije je dno u vidu membrane, prečnika 6,4 mm i dijametra pora 8 µm (BD Labware, Bedford, MA, SAD). Komore su stavljane u ploče za kultivaciju ćelija sa 24 bunarića. Za potrebe invazionog esaja, gornja površina membrana ovih komorica bila je obložena tankim slojem Matrigel-a (500 ng/mL finalno po membrani) kome je dozvoljeno da polimeriše 24h na 37°C. U bunariće je prvo sipan medijum (za pozitivne kontrole i tretmane se sipa medijum sa 10% FBS seruma, za negativnu kontrolu se sipa medijum bez FBS seruma), a zatim postave komorice sa pripremljenim matrigelom. U same komorice direktno na sloj matrigela se sipa 200 000 ćelija po liniji u medijumu bez FBS seruma. Pored uporedne analize invazije 8505C i Rho- ćelija analiziran je i uticaj određenih tretmana na inhibiciju invazije. Uvek se pored tretmana postavljaju pozitivna i negativna kontrola. Pozitivna kontrola su ćelije resuspendovane u medijumu bez FBS koje se kreću ka hemoatraktantima (medijum sa FBS). Ovako pripremljen eksperiment se drži u inkubatoru 24h i nakon toga se analizira. Ćelije sa gornje strane membrane koje nisu migrirale se odstrane skreperom, membrana se iseče i fiksira na pločicu u Hoechst+glicerol rastvoru. Hoescht je boja koja služi za vizuelizaciju jedara na fluorescentnom mikroskopu. Svako polje sa ćelijama na membrani se slika 10 puta na 10 puta uvećanju na *Zeiss Axiowert* fluorescentnom mikroskopu (Carl Zeiss Foundation, Nemačka) korišćenjem softvera, AxioVision 4.8. Slike dobijene na fluorescentnom mikroskopu se analiziraju u ImageJ programu. Broj ćelija u svakom bunariću se normalizuje u odnosu na broj ćelija u pozitivnoj kontroli sto ukazuje na stepen invazije ćelija. Eksperiment se smatra uspešnim ukoliko u negativnoj kontroli ima manje od 15% migriranih ćelija u odnosu na 100% migriranih ćelija u pozitivnoj kontroli. Eksperiment je ponavljen tri puta za svaku ćelijsku liniju.

3.2.13. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA

Rezultati dobijeni u eksperimentima su dalje analizirani korišćenjem programa STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., SAD) i Graphpad Prism 6.01 (GraphPad Software, SAD). Setovi podataka koji su testiranjem pokazali normalnu distribuciju, analizirani su parametarskom statističkom analizom. T-test je korišćen za određivanje statistički značajne razlike između svake dve grupe podataka, uključujući i kontrolne grupe. Moguća povezanost između uočenih promena između samih gena, testirana je *Fisher exact* testom. Uočene razlike su smatrane statistički značajnim ukoliko je stepen verovatnoće bio $p \leq 0.05$.

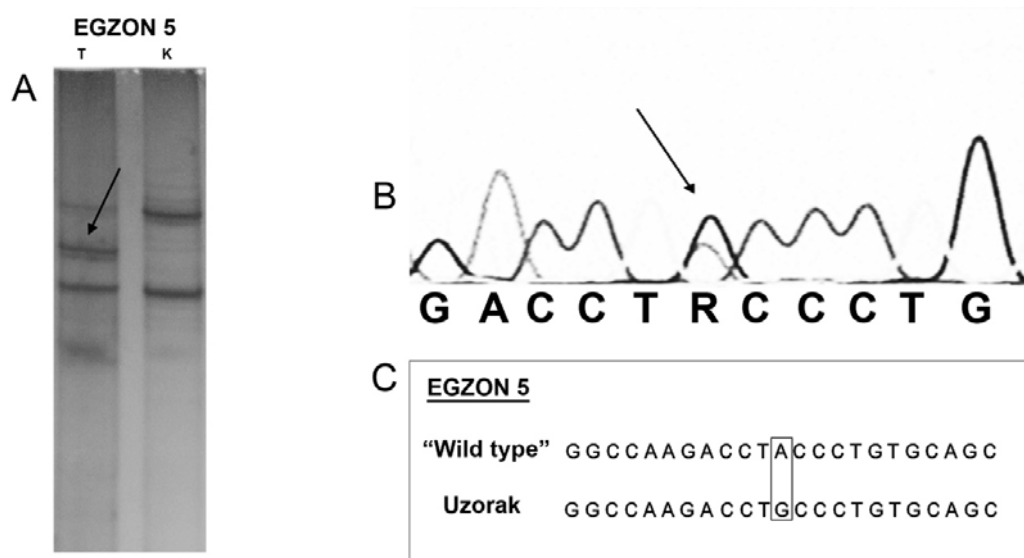
4. REZULTATI

4.1. STUDIJE NA UZORCIMA TKIVA ANAPLASTIČNOG KARCINOMA ŠTITASTE ŽLEZDE

Na uzorcima anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde dobijenim od pacijenata izvršene su analize mutacionog statusa tumor-supresor gena *p53* i onkogeni *RAS* (*KRAS*, *HRAS* i *NRAS*) i *BRAF*. Pored toga, imunohistohemijskom analizom ispitivana je zastupljenost pAKT, pERK, PTEN, P-gp i BCRP proteina.

4.1.1. ANALIZA PROMENA U *p53* TUMOR SUPRESOR GENU

U analizi promena u *p53* tumor supresor genu najpre je ispitivano prisustvo mutacija u pet najčešće mutiranih egzona ovog gena (egzoni 5 – 9) PCR-SSCP metodom kod tumorskih uzoraka svih 12 pacijenata (Slika 9). Ovom tehnikom su otkrivene aberacije u 5 uzoraka. Da bi se uočene mutacije potvrdile i identifikovale uzorci su sekvencirani.



Slika 9. PCR-SSCP i sekvenciona analiza egzona 5, *p53* gena. **A)** PCR-SSCP analiza egzona 5 *p53* gena kod tumorskog (T) u odnosu na kontrolni uzorak (K); strelica pokazuje postojanje mutiranog jednolančanog konformera u tumorskom uzorku. **B)** Segment elektroferograma i očitana sekvenca dobijeni sekvenciranjem mutiranog egzona 5 *p53* gena *antisense* amplimerom sa odgovarajućom komplementarnom *sense* sekvencom; strelica pokazuje mutacionu promenu. **C)** Uporedna analiza očitane sekvence tumorskog uzorka i wt sekvence egzona 5 *p53* gena i identifikacija mutacije G→T (uokvireno) u kodonu 141.

DNK sekvenciranje je potvrdilo prisustvo mutacija u 5 od 12 uzoraka. Pozicije svih 5 mutacija (broj egzona i tačan broj kodona u kome se nalaze), vrste njihovih nukleotidnih promena kao i pretpostavljeni efekat koji mogu da imaju na proteinsku strukturu i funkciju su prikazani u Tabeli 4. Od 5 identifikovanih mutanata jedan uzorak nosi *silent* mutaciju u kodonu 213, egzona 6, koja je redak prirodni polimorfizam. Ostatak identifikovanih mutacija dovodi do promena u aminokiselinskoj sekvenci p53 proteina. Tri od preostale 4 mutacije su mutacije sa izmenjenim smislom, a 1 je delecija 17 nukleotida. Posmatrano zbirno po egzonima, u egzonu 5 su detektovane ukupno 3 mutacije, a u egzonu 6 i egzonu 8 po jedna.

Tabela 4. Prikaz mutacija detektovanih i identifikovanih u *p53* tumor-supresor genu

Broj pacijenta	Egzon	Broj kodona	Nukleotidna promena	Efekat na nivou proteina
2	egzon 5	141	TGC→TAC	Cys→Tyr
3	egzon 5	141	Del 12409-12426 ^a	promena okvira čitanja
4	egzon 5	154	GGC→GTC	Gly→Val
8	egzon 8	286	GAA→AAA ^a	Glu→Lys
16	egzon 6	213	CGA→CGG	prirodni polimorfizam

^aMutacija nije prijavljena u anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde (<http://p53.bii.a-star.edu.sg>)

4.1.2. ANALIZA PROMENA U *RAS* I *BRAF* ONKOGENIMA

DNK sekvenciranje *RAS* (*KRAS*, *HRAS*, *NRAS*) onkogeni pokazalo je mutacije samo u *NRAS* izoformi. Pozicije svih 9 mutacija (broj egzona i tačan broj kodona u kome se nalaze), vrste njihovih nukleotidnih promena kao i pretpostavljeni efekat koji mogu da imaju na proteinsku strukturu i funkciju su prikazani u Tabeli 5. Mutacije u *NRAS* genu u svih 9 uzoraka su detektovane u kodonu 50 egzona 2. Ovo je prvi put da su ove mutacije detektovane u karcinomu štitaste žlezde. *BRAF* gen je analiziran na prisustvo mutacije V600E u egzonu 15 (kodon 600, zamena amino-

kiseline valin glutaminskom kiselinom) i detektovana je mutacija samo kod pacijenta broj 1.

Tabela 5. Prikaz mutacija identifikovanih u *NRAS* onkogenu

Broj pacijenta	Egzon	Broj kodona	Nukleotidna promena	Efekat na nivou proteina
1,2,3,8	egzon2	50	ACC→ATC ^a	Thr →Ile
5,6,7,9,10	egzon 2	50	ACC→ATG ^a	Thr→Met

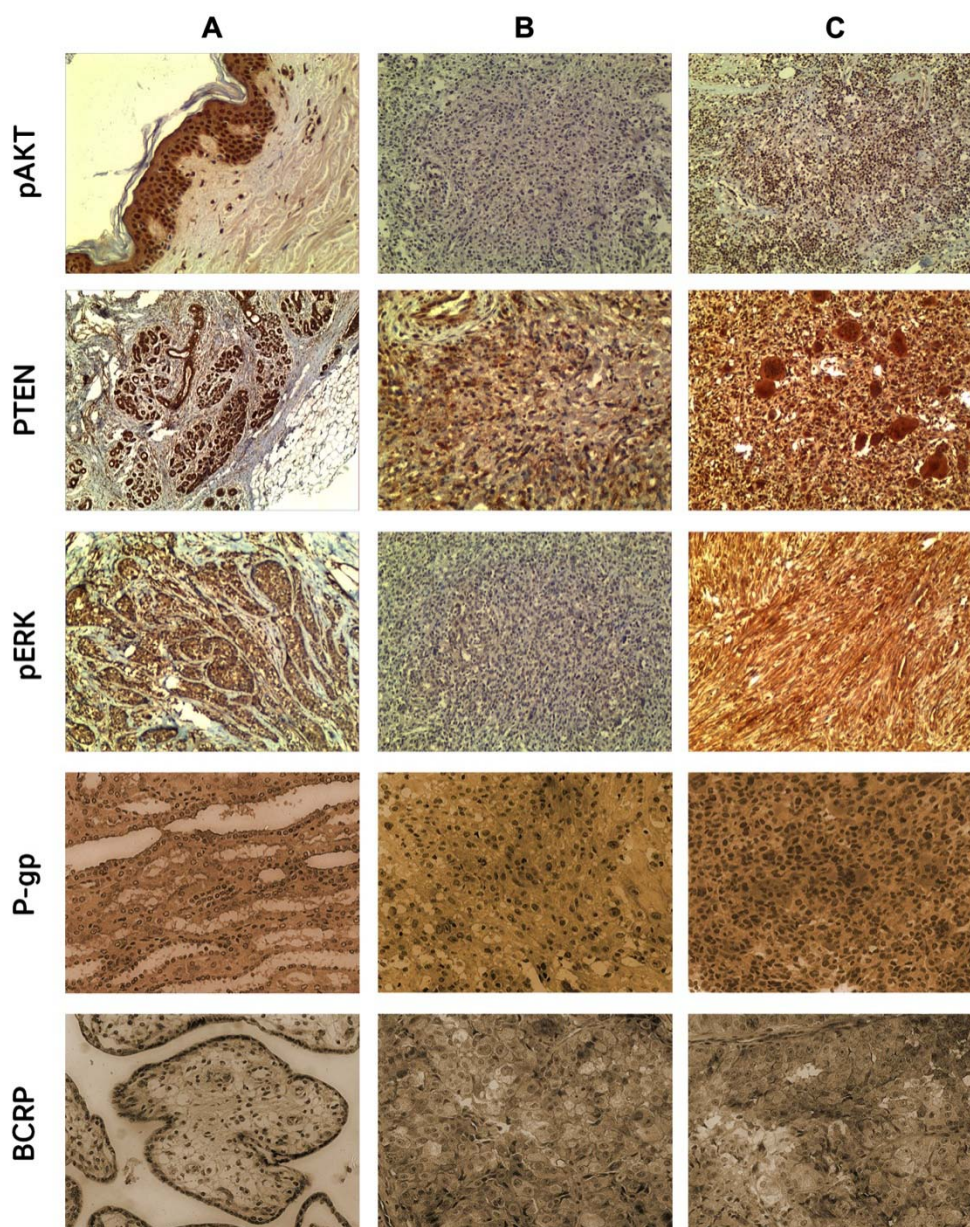
^aMutacija nije prijavljena u anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde

4.1.3. IMUNOHISTOHEMIJSKA ANALIZA PTEN, pAKT, pERK, P-gp I BCRP PROTEINA

Imunohistohemijska analiza PTEN, pAKT i pERK proteina kao i P-gp i BCRP pumpi pokazala je značajne promene u ekspresiji ovih proteina u svim pacijentima (Slika 10). U 41,6% pacijenata (5/12) identifikovana je smanjena ekspresija PTEN tumor-supresor proteina. Povećana ekspresija fosfo-AKT (pAKT) proteina uočena je kod 41,6% pacijenata (5/12) a pojačana ekspresija fosfo-ERK (pERK) proteina kod 50% pacijenata (6/12). Pojačana ekspresija P-gp pumpe je pokazana kod 66,7% pacijenata (8/12) a pojačana ekspresija BCRP pumpe kod 33,4% pacijenta (4/12). Sve analizirane i uočene promene ovih proteina predstavljene su u Tabeli 6.

Tabela 6. Imunofenotip pacijenata sa anaplastičnim karcinomom štitaste žlezde

Broj pacijenta	PTEN ekspresija		pERK ekspresija		pAKT ekspresija		PGP ekspresija		BCRP ekspresija	
	Niska	Visoka	Niska	Visoka	Niska	Visoka	Niska	Visoka	Niska	Visoka
1	✓		✓			✓	✓		✓	
2		✓		✓	✓			✓		✓
3	✓		✓		✓			✓		✓
4		✓		✓		✓		✓	✓	
5		✓	✓		✓			✓	✓	
6	✓		✓		✓		✓		✓	
7	✓		✓		✓			✓	✓	
8		✓		✓		✓		✓		✓
9		✓		✓	✓		✓		✓	
10		✓		✓	✓			✓		✓
11	✓			✓		✓		✓	✓	
12		✓	✓			✓	✓		✓	



Slika 10. Imunohistohemijska analiza pAKT, PTEN, pERK, P-gp i BCRP proteina na uzorcima anoplastičnog karcinoma štitaste žlezde. Reprezentativni primeri: **A)** Kontrole za odgovarajuća antitela: pAKT epidermis (20× objektiv), PTEN tkivo dojke (10× objektiv), pERK tkivo dojke (10× objektiv), P-gp tkivo bubrega (10× objektiv), BCRP placenta (10× objektiv); **B)** niska nuklearna imunoreaktivnost pAKT-a (10× objektiv), niska citoplazmatična imunoreaktivnost PTEN-a (10× objektiv), niska citoplazmatična imunoreaktivnost pERK-a (10× objektiv), niska membranska imunoreaktivnost P-gp –a (10× objektiv) i niska membranska imunoreaktivnost BCRP –a (10× objektiv); **C)** visoka nuklearna imunoreaktivnost pAKT-a (10× objektiv), visoka citoplazmatična imunoreaktivnost PTEN-a (10× objektiv), visoka citoplazmatična imunoreaktivnost pERK-a (10× objektiv), visoka membranska imunoreaktivnost P-gp –a (10× objektiv) i visoka membranska imunoreaktivnost BCRP –a (10× objektiv).

4.1.4. ANALIZA POVEZANOSTI *NRAS*, *p53*, PTEN, pAKT, pERK, P-gp I BCRP PROMENA

Analiza povezanosti svih ispitivanih promena u *NRAS* i *p53* genima i promena u ekspresiji PTEN, pAKT, pERK, P-gp i BCRP proteina u uzorcima pacijenata sa anaplastičnim karcinomom štitaste žlezde pokazala je statistički značajnu povezanost između promena u *NRAS* genu i pAKT proteinu, kao i između promena u PTEN i pERK proteinskoj ekspresiji. Analiza povezanosti promena između ostalih ispitivanih gena i proteina nije pokazala statističku značajnost.

4.1.4.1. Analiza povezanosti promena u *NRAS* genu i pAKT proteinu

Promene u *NRAS* genu i pAKT proteinskoj ekspresiji pokazale su da od 12 analiziranih pacijenata njih 3 nije imalo aberantan *NRAS* gen, ali je kod istih tih pacijenata pokazana povećana ekspresija pAKT proteina. Statistička analiza promena u *NRAS* genu i pAKT proteinu pokazala je da je učestalost aktivacije *NRAS* gena značajno manja kod tumorskih uzoraka sa povećanom ekspresijom pAKT proteina ($p=0,04$; Tabela 7).

Tabela 7. Povezanost promena u *NRAS* genu i pAKT proteinskoj ekspresiji

Varijable	Aktivacija <i>NRAS</i> gena		
	DA	NE	
	BP ^a (%)	BP (%)	p vrednost
pAKT ekspresija			
Visoka	2 (40.0)	3 (60.0)	0.04^b
Niska	7 (100.)	0 (0.0)	

^a BP, broj pacijenata po grupi; ^b statistički značajna korelacija, $p \leq 0,05$

4.1.4.2. Analiza povezanosti promena u PTEN i pERK proteinskoj ekspresiji

Statistička analiza promena u PTEN i pERK proteinskoj ekspresiji je pokazala da je učestalost povećane ekspresije PTEN proteina značajno veća kod tumorskih uzoraka sa povećanom ekspresijom pERK proteina ($p=0,004$; Tabela 8).

Tabela 8. Povezanost promena u PTEN i pERK proteinskoj ekspresiji
pERK ekspresija

	Visoka	Niska	
Varijable	BP ^a (%)	BP (%)	p vrednost
PTEN ekspresija			
Visoka	5 (83.3)	1 (16.7)	0.04^b
Niska	1 (16.7)	5 (83.3)	

^a BP, broj pacijenata po grupi; ^b statistički značajna korelacija, $p \leq 0,05$.

4.2 IN VITRO STUDIJE

In vitro studije su izvedene na humanim ćelijskim linijama karcinoma štitaste žlezde. Sastojale su se iz ispitivanja promena na istim genima i proteinima kao i kod uzoraka pacijenata, analize inhibicije komponenti PI3K/AKT/mTOR i RAS/MAPK/ERK signalnih puteva radi utvrđivanja njihovog doprinosa u rezistenciji na hemioterapiju, kao i ispitivanja uloge transportnih pumpi u rezistenciji kod ATC.

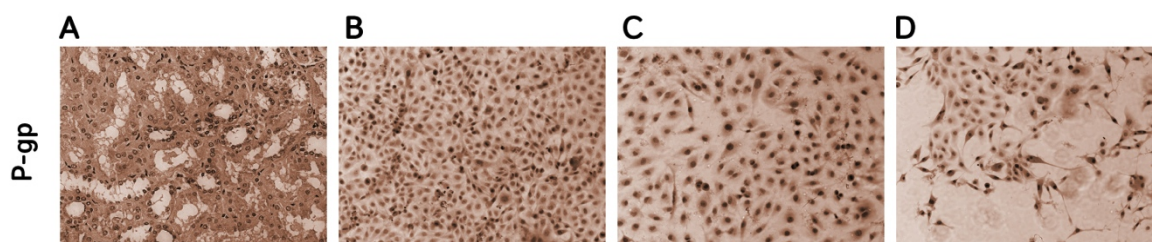
4.2.1. IMUNOCITOHEMIJSKA ANALIZA PTEN, pAKT, pERK I P-gp PROTEINA

Imunocitohemijska analiza PTEN, pAKT i pERK proteina na ćelijskim linijama FRO i SW1736 pokazala je smanjenu ekspresiju pAKT proteina kao i povećanu ekspresiju PTEN proteina. Uočeno je povećanje pERK-a kod obe linije. Status *BRAF*, *RAS* i *p53* gena kod ove dve ćelijske linije je opisan u internet bazi podataka (*The Roche Cancer Genome Database*). FRO i SW1736 ćelijske linije su okarakterisane kao linije sa inaktivnim *p53* genom (engl. *p53 null*). Ni u jednom od najčešće ispitivanih egzona *p53* gena nije uočena mutacija ali je ekspresija *p53* toliko niska da se ovaj gen vodi kao inaktivan u ovim ćelijskim linijama. U *RAS* genima nema mutacija kod obe ćelijske linije ali je pokazano prisustvo aktivirajuće mutacije V600E u egzonu 15 *BRAF* gena (kodon 600, zamena amino-kiseline valin glutaminskom kiselinom). Što se tiče 8505C ćelijske linije imunocitohemijska analiza je pokazala smanjenu ekspresiju PTEN-a, a povećanu ekspresiju pAKT i pERK proteina. Status *BRAF*, *RAS* i *p53* gena kod ove ćelijske linije takođe je opisan u internet bazi podataka (*The Roche Cancer Genome Database*). U *RAS* genima nema mutacija, dok je *BRAF* gen mutiran u kodonu 600 (V600E). Tumor-supresor *p53* je mutiran u kodonu 248, egzona 7 (CG→GC transverzija). Imunocitohemijska analiza je pokazala nisku ekspresiju P-gp pumpi kod sve tri analizirane ćelijske linije (Slika 11). Sve promene analizirane na ćelijskim linijama su sumirane u Tabeli 9.

Tabela 9. Imunofenotip i promene u *p53*, *RAS* i *BRAF* genima u ćelijskim linijama

Ćelijska linija	PTEN ekspresija		pERK ekspresija		pAKT ekspresija		P-gp ekspresija		<i>p53</i> mutacije	<i>RAS</i> mutacije	<i>BRAF</i> mutacije
	Niska	Visoka	Niska	Visoka	Niska	Visoka	Niska	Visoka			
FRO		✓		✓	✓		✓		- Inaktivan	^a	^b
SW1736		✓		✓	✓		✓		- Inaktivan	-	+
8505C	✓		✓			✓	✓		+	-	+

^a odsustvo mutacije; ^b prisustvo mutacije



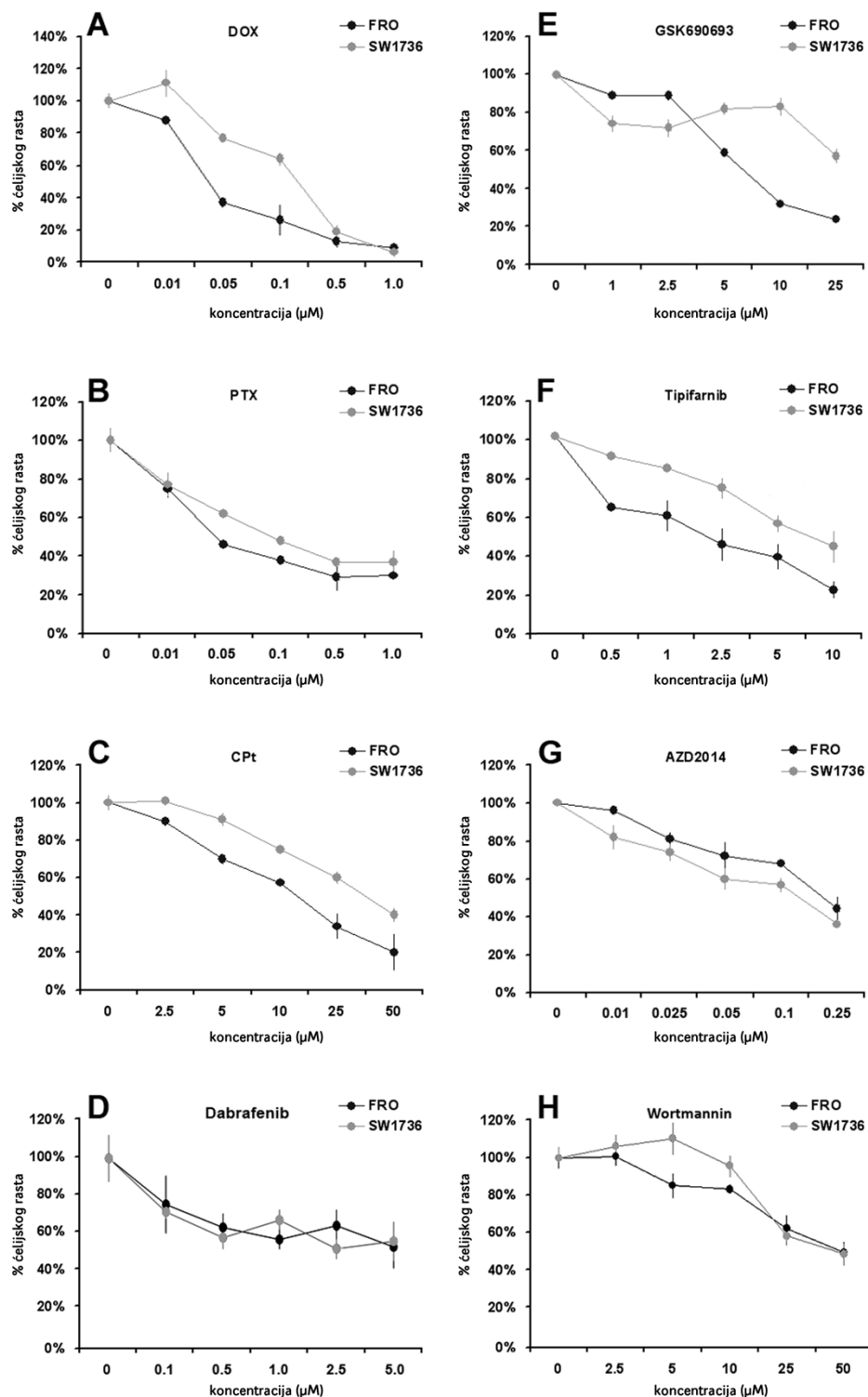
Slika 11. Imunocitohemijska analiza P-gp proteina na FRO, SW1736 i 8505C ćelijama. Reprezentativni primeri: **A)** Kontrola za P-gp antitelo, tkivo bubrega (10× objektiv); **B)** Niska membranska imunoreaktivnost P-gp proteina kod FRO ćelijske linije (10× objektiv); **C)** Niska membranska imunoreaktivnost P-gp proteina kod SW1736 ćelijske linije (10× objektiv); **D)** Niska membranska imunoreaktivnost P-gp proteina kod 8505C ćelijske linije (10× objektiv).

4.2.2. ISPITIVANJE EFEKTA KLASIČNIH HEMIOTERAPEUTIKA I INHIBITORA RAS/MAPK/ERK I PI3K/AKT/mTOR SIGNALNIH PUTEVA NA ĆELIJSKIM LINIJAMA KARCINOMA ŠTITASTE ŽLEZDE

Citotoksično dejstvo citostatika (PTX, DOX, Cpt) kao i signalnih inhibitora (pan-AKT inhibitor – GSK690693, RAS inhibitor – Tipifarnib, dvostruki mTOR inhibitor – AZD2014, BRAFV600E inhibitor – dabrafenib i PI3K inhibitor – vortmanin) na slabodiferenciranoj FRO i anaplastičnoj SW1736 ćelijskoj liniji karcinoma štitaste žlezde je ispitivano pomoću MTT eseja. Ovim testom je analiziran efekat rastućih koncentracija navedenih agenasa na inhibiciju rasta ćelijskih linija nakon 72h tretmana. Sve supstance, osim dabrafenib-a i AZD2014 su pokazale dozno zavisno dejstvo, u opsegu primenjenih koncentracija, na obe ćelijske linije. Rezultati su predstavljeni na Slici 12. Na osnovu dobijenih podataka o dozno zavisnoj inhibiciji rasta ćelijskih kultura računale su IC₅₀ vrednosti. IC₅₀ vrednosti za DOX iznose 0,04 μM za FRO i 0,347 μM za SW1736 ćelijsku liniju (Slika 12A). Paklitaksel je pokazao najveći potencijal za inhibiciju ćelijskog rasta sa sličnim inhibitornim efektom na obe ćelijske linije (Slika 12B). IC₅₀ vrednosti za PTX iznose 0,044 μM za FRO i 0,093 μM za SW1736 ćelijsku liniju (Slika 12B). IC₅₀ vrednosti za Cpt iznose 15 μM za FRO i 38 μM za SW1736 ćelijsku liniju (Slika 12C). Dabrafenib je pokazao sličan efekat što se tiče inhibicije ćelijskog rasta u obe ispitivane ćelijske linije (Slika 12D). Dabrafenib je svoj maksimalni inhibitorni potencijal postigao na 0,5 μM (40% inhibicije). Povećanjem doza do 5 μM ovaj efekat se nije menjao. IC₅₀ vrednosti za GSK690693 su 7,5 μM za FRO i 25 μM za SW1736 (Slika 12E), a IC₅₀ vrednosti za

FRO i SW1736 ćelije za Tipifarnib su redom 2 i 8 μM (Slika 12F). Iako su niže doze vortmanina pokazale bolji efekat na FRO ćelijskoj liniji, IC50 vrednosti su iste za obe ispitivane linije i iznose 30 μM (Slika 12H).

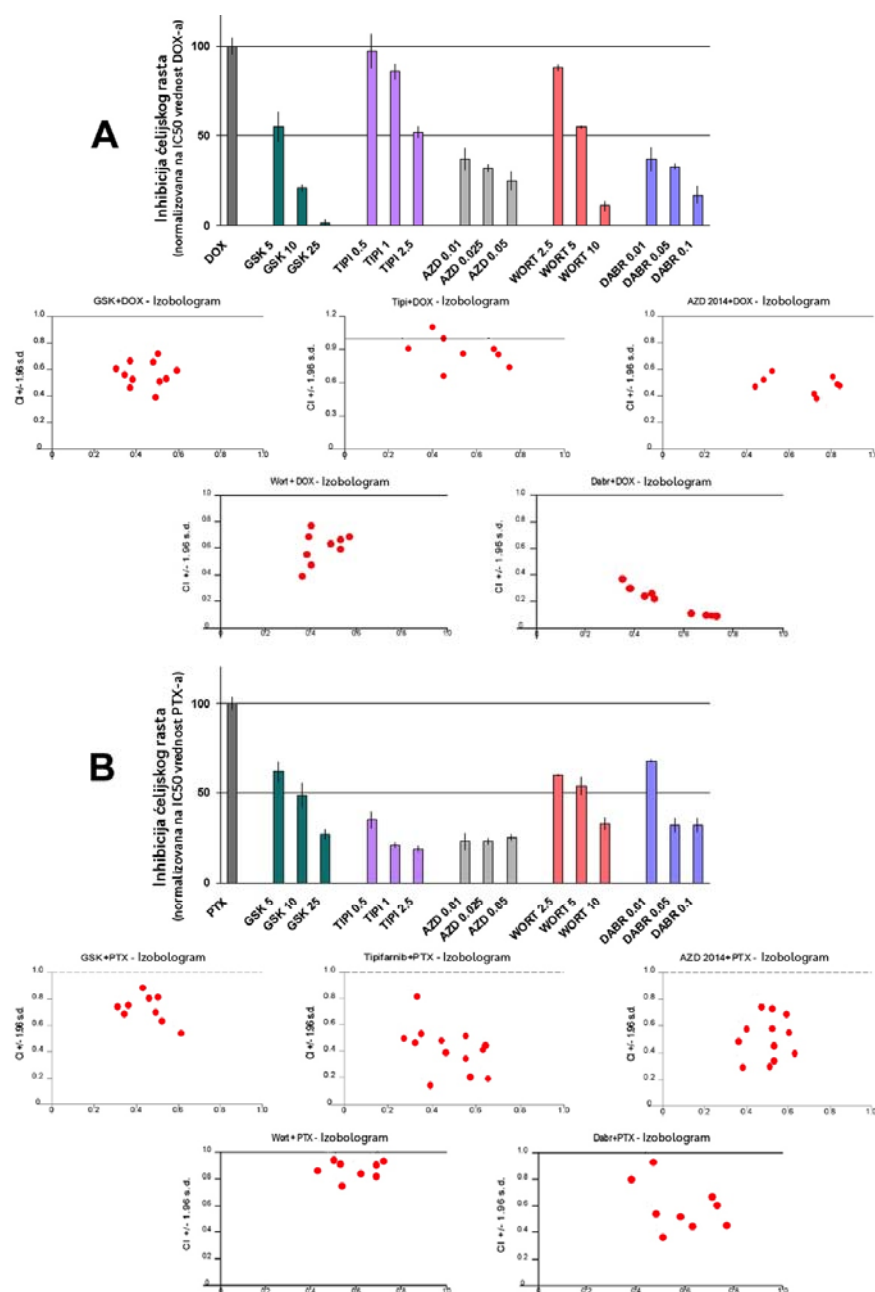
U odnosu na inhibitore signalnih puteva AZD2014 je pokazao najveći potencijal za inhibiciju ćelijskog rasta u ispitivanim ćelijskim linijama. IC50 vrednosti su 0,2125 μM za FRO i 0,15 μM za SW1736 ćelijsku liniju (Slika 12G). Efekat ovog inhibitora se uočava već pri nanomolarnim koncentracijama, i za razliku od ostalih agenasa nije pokazao dozno zavisno dejstvo.



Slika 12. Efikasnost različitih terapeutika na ćelijskim linijama karcinoma štitaste žlezde. Inhibicija rasta FRO i SW1736 ćelija pod dejstvom DOX-a **A**), PTX-a **B**), CPT-a **C**), dabrafeniba **D**), GSK690693 **E**), tipifarniba **F**), AZD2014 **G**), i vortmanina **H**). Srednje vrednosti su dobijene iz pet nezavisnih eksperimenata (n=5).

4.2.3. KOMBINOVANI TRETMANI INHIBITORA SIGNALNIH PUTEVA SA KLASIČNIM HEMIOTERAPEUTICIMA

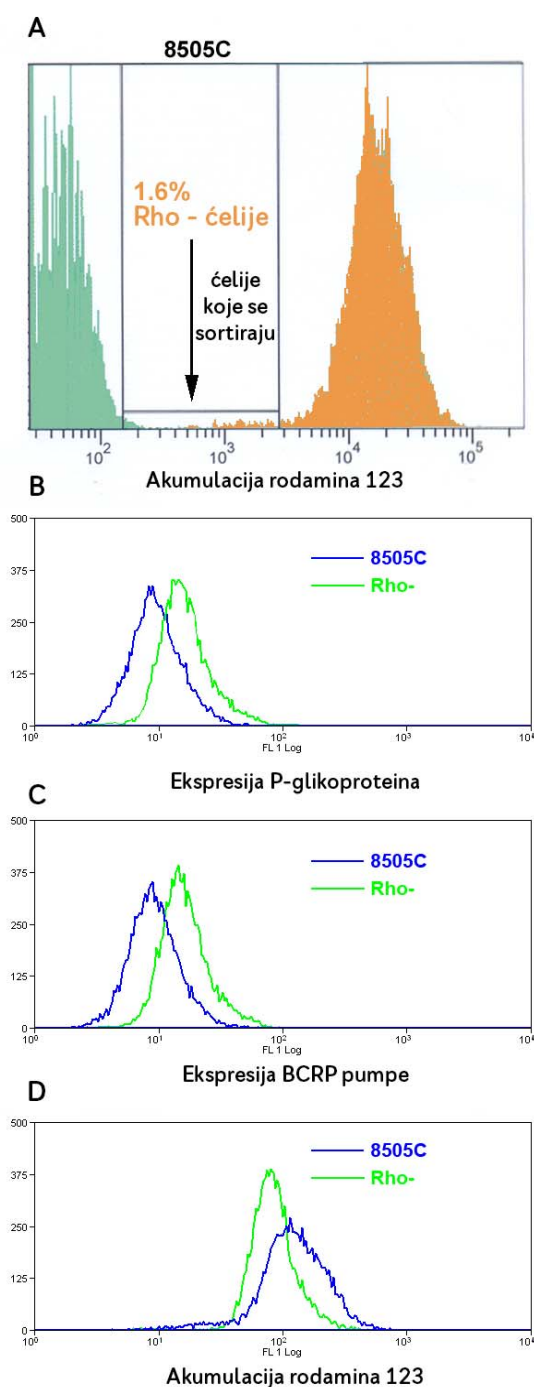
Efekat istovremenog tretmana inhibitora RAS/MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR signalnih puteva sa PTX-om i DOX-om na SW1736 ćelijskoj liniji utvrđen je MTT testom. SW1736 ćelije su tretirane 72h sledećim inhibitorima: GSK690693 (1; 2,5 i 5 μ M), tipifarnib (0,25; 0,5 i 1 μ M), AZD2014 (0,025; 0,05 i 1 μ M), dabrafenib (0,01; 0,05 i 0,1 μ M), vortmanin (2,5; 5 i 10 μ M) u kombinaciji sa PTX-om (0,01–0,05 μ M) ili DOX-om (0,025–0,5 μ M). Priroda uzajamnog dejstva inhibitora sa klasičnim hemioterapeuticima utvrđena je pomoću kombinacionog indeksa (CI) koji se dobija složenim proračunima efekta testiranih supstanci. Dobijeni rezultati ukazuju na aditivni ($CI \sim 1$) ili sinergistički efekat ($CI < 1$) pri svim testiranim kombinacijama supstanci, odnosno da inhibitori signalnih puteva povećavaju efikasnost citotoksičnih agenasa (DOX, PTX) na SW1736 ćelijskoj liniji. Tretman sa pan-AKT inhibitorom – GSK690693 se pokazao efikasnijim u kombinaciji sa DOX-om (Slika 13A). RAS inhibitor – tipifarnib je bio efikasniji u kombinaciji sa PTX-om (Slika 13B), dok je samo najveća primenjena koncentracija ovog inhibitora (1 μ M) povećala senzitivnost ćelija na DOX. PI3K inhibitor – vortmanin je imao sličan efekat kao i pan-AKT inhibitor na senzitivizaciju SW1736 ćelija na DOX i PTX (Slika 13A,B). Najefikasnijim se pokazao tretman dvostrukim mTOR inhibitorom – AZD2014. AZD2014 nije pokazao dozno zavisno povećanje efikasnosti DOX-a i PTX-a (Slika 13A,B). Dabrafenib takođe nije pokazao dozno zavisno dejstvo ali je njegova efikasnost u senzitivizaciji SW1736 ćelija bila manja u odnosu na AZD2014 (Slika 13A,B). Svi dobijeni rezultati su prikazani na histogramima i izobologramima (Slika 13A,B).



Slika 13. Efekti istovremenih kombinacija inhibitora RAS/MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR signalnih puteva sa PTX-om i DOX-om kod SW1736 ćelija. Specifični inhibitori (GSK690693, tipifarnib, AZD2014, vortmanin i dabrafenib) povećavaju senzitivnost SW1736 ćelija na PTX i DOX, odnosno smanjuju IC50 vrednosti za **A**) DOX i **B**) PTX. IC50 vrednosti kombinacija su normalizovane prema IC50 vrednostima DOX-a ili PTX-a i predstavljene na histogramima (**A**, **B**). Priroda međudejstva specifičnih inhibitora sa PTX-om ili DOX-om predstavljena je odgovarajućim izobologramima (**A**, **B**). Koncentracije GSK690693, tipifarnib-a, AZD2014, vortmanina i dabrafeniba su predstavljene u mikromolima (μM). Efekat kombinacije terapeutika je određen MTT testom. Srednje vrednosti su dobijene iz četiri ili više eksperimenata ($n \geq 4$). Interakcija između inhibitora (GSK690693, tipifarnib, AZD2014, vortmanin i dabrafenib) i citostatika (PTX, DOX) je određena primenom CalcuSyn softvera. Vrednosti $CI < 1$ ukazuju na sinergistički efekat; AZD, AZD2014; GSK, GSK690693; DABR, dabrafenib; DOX, doksorubicin; PTX, paklitaksel; TIPI, tipifarnib; WORT, vortmanin.

4.2.4. ANALIZA EKSPRESIJE P-gp I BCRP TRANSPORTNIH PUMPI KOD SORTIRANIH 8505C ĆELIJA SA NISKOM AKUMULACIJOM RODAMINA

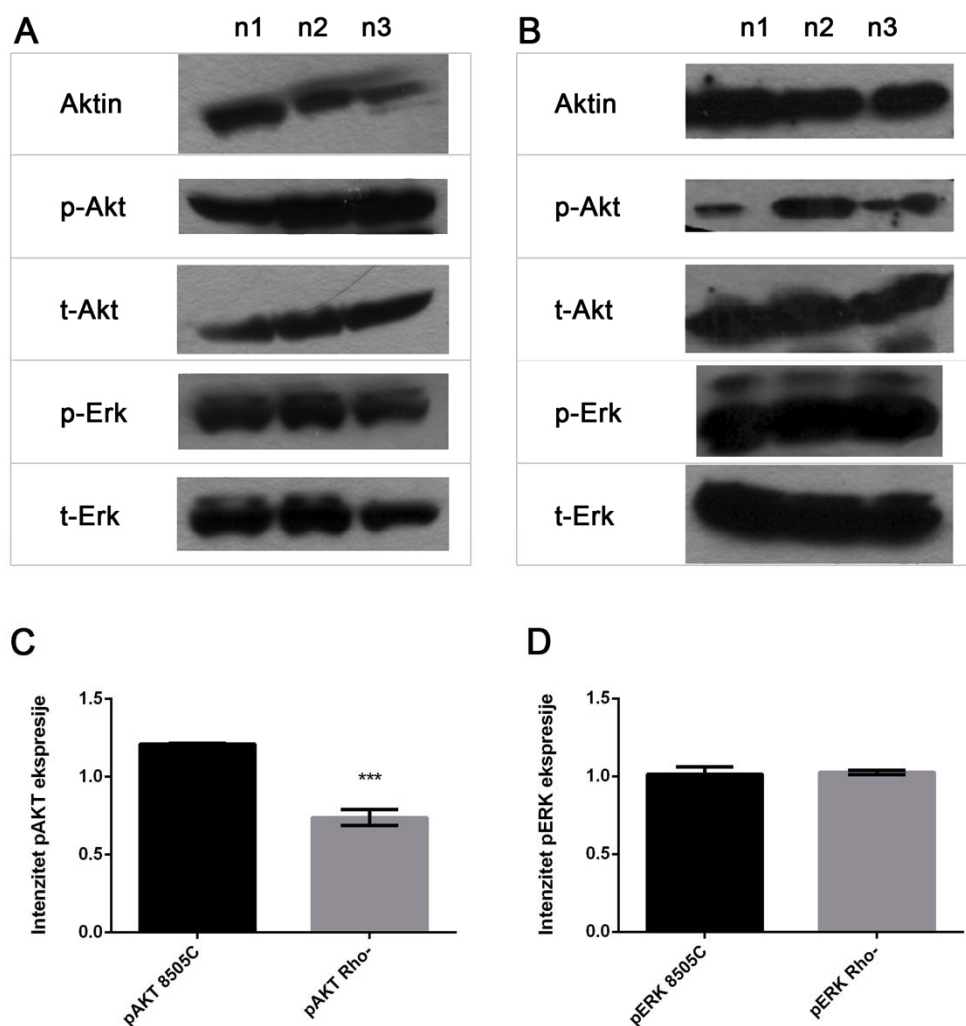
8505C ćelije anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde su sortirane metodom protočne citofluorimetrije prema nivou akumulacije rodamina 123 (Rho123), supstrata za P-gp pumpu, da bi se dobio fenotip anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde koji bi odgovorao fenotipu pacijenata uključenih u našu studiju. Na slici 14A je strelicom pokazana populacija ćelija sa niskom akumulacijom rodamina koja je sortirana i zasejana u flaskove radih daljih eksperimenata. Dobijena ćelijska linija nazvana je Rho-. Nakon 2 meseca kultivacije ćelijske linije 8505C i Rho-su povrgnute analizi akumulacije Rho 123 i ekspresije P-gp i BCRP transportnih pumpi na protočnom citofluorimetru. Promena u ekspresiji proteina je analizirana direktno obeleženim antitelima za P-gp i BCRP. Nakon što je određen osnovni nivo fluorescence (engl. *fluorescence background*) sa kontrolnim, izotipskim antitelom, određen je udeo P-gp i BCRP pozitivnih ćelija u svakom uzorku. Uočava se značajno povećanje P-gp pozitivnih ćelija kod sortiranih Rho- ćelija u odnosu na njihovu parentalnu ćelijsku liniju 8505C (Slika 14B). BCRP pozitivnih ćelija takođe ima više kod Rho- u odnosu na 8505C ćelije (Slika 14C). Provera aktivnosti P-gp pumpe, čija je ekspresija prethodno utvrđena na nivou proteina, izvršena je metodom protočne citofluorimetrije merenjem unutarćelijske akumulacije P-gp supstrata (Rho 123) u 8505C i Rho- ćelijama. Kao što je prikazano na slici 14D, akumulacija Rho 123 je manja kod Rho- u odnosu 8505C ćelije.



Slika 14. Sortiranje 8505C ćelija i analiza ekspresije P-gp, BCRP pumpi kao i akumulacije rodamina kod 8505C ćelija i sortiranih Rho- ćelija. A) Strelicom su pokazane ćelije sa najmanjom akumulacijom Rho123 koje su sortirane i nazvane Rho-; **B)** Analiza ekspresije P-gp-a kod 8505C i Rho- ćelija; **C)** Analiza ekspresije BCRP-a kod 8505C i Rho- ćelija; **D)** Analiza akumulacije Rho 123 kod 8505C i Rho- ćelija; P-gp i BCRP ekspresija (obojenih direktno obeleženim antitelom za P-gp i BCRP) je određena nakon eliminacije ćelija koje su obojene FITC-obeležnim izotipskim antitelom. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta.

4.2.5. ANALIZA EKSPRESIJE pAKT I pERK PROTEINA U 8505C I Rho-ĆELIJAMA

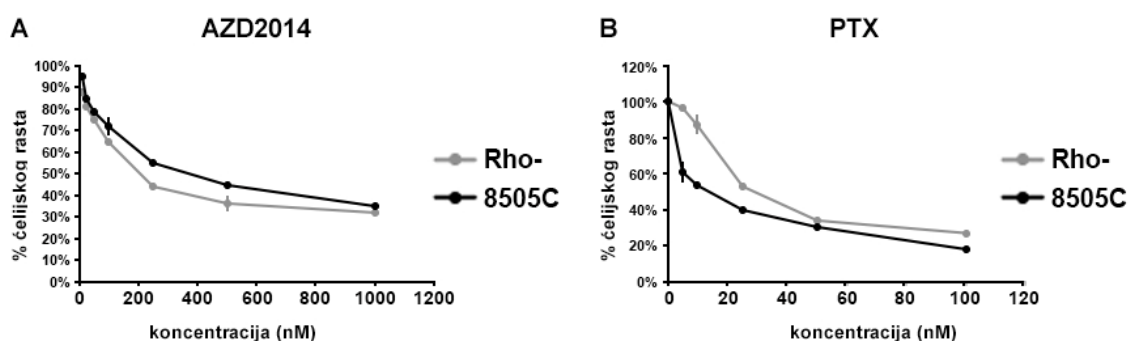
Korišćenjem Western blot analize ispitivana je razlika u ekspresiji pAKT i pERK proteina u 8505C i Rho- ćelijama. Detektovane vrednosti pAKT i pERK proteina su normalizovane u odnosu na vrednosti ukupnog AKT i ERK proteina (tAKT i tERK). Na slici 15A predstavljena je ekspresija aktina, pAKT, tAKT, pERK i tERK proteina kod 8505C ćelija, a na slici 15B ekspresija istih proteina kod Rho-ćelija. Intenzitet dobijenih signala kvantifikovan je denzitometrijski, korišćenjem kompjuterskog programa za analizu signala (ImageQuant 5.0). Vrednosti dobijene za ciljne proteine su normalizovane u odnosu na odgovarajući aktin, kao kontrolu za nanetu količinu totalnih proteina. Tako dobijene relativne vrednosti su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje u Graph Pad programu. Uočili smo statistički značajno smanjenje ekspresije pAKT proteina u sortiranoj Rho- ćelijskoj liniji u odnosu na parentalnu 8505C liniju ($p \leq 0,001$) (Slika 15C). U pogledu ekspresije pERK proteina nije bilo statistički značajne razlike među analiziranim ćelijskim linijama anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde (Slika 15D).



Slika 15. Western blot analiza pAKT i pERK proteina u 8505C i Rho- ćelijama. **A)** Reprezentativni primeri ekspresije aktina, pAKT, tAKT, pERK i tERK proteina kod 8505C ćelija; **B)** Reprezentativni primeri ekspresije aktina, pAKT, tAKT, pERK i tERK proteina kod Rho- ćelija; **C)** Histogram koji pokazuje odnos ekspresije pAKT proteina kod 8505C i Rho- ćelija. Statistički značajne razlike ($p < 0,001$) u ekspresiji pAKT proteina kod Rho- ćelijske linije u odnosu na 8505C ćelijsku liniju označene su ***. **D)** Histogram koji pokazuje odnos ekspresije pERK proteina kod 8505C i Rho- ćelija. Vrednosti su dobijene iz pet nezavisnih eksperimenata ($n=5$).

4.2.6. UPOREĐIVANJE EFEKATA PTX-a I AZD2014 NA 8505C I Rho-ĆELIJSKIM LINIJAMA

PTX i dvostruki mTOR inhibitor (AZD2014) su se pokazali najefikasnijim u tretmanu SW1736 i FRO ćelija, pa je njihov citotoksični efekat ispitan i kod 8505C i Rho- ćelijskih linija. MTT testom je analiziran efekat PTX-a i mTOR inhibitora na inhibiciju rasta ćelijskih linija nakon 72h. IC₅₀ koncentracije za PTX i AZD2014 razlikuju se kod 8505C i Rho- ćelija. Parentalna 8505C ćelijska linija se pokazala manje osjetljivom na dejstvo AZD2014 (IC₅₀ = 470 nM) u odnosu na sortiranu Rho- (IC₅₀ = 207 nM) (Slika 16A). Međutim, Rho- ćelijska linija je rezistentnija na dejstvo PTX-a (IC₅₀ = 36 nM) u odnosu na 8505C ćelijsku liniju (IC₅₀ = 16 nM) (Slika 16B).

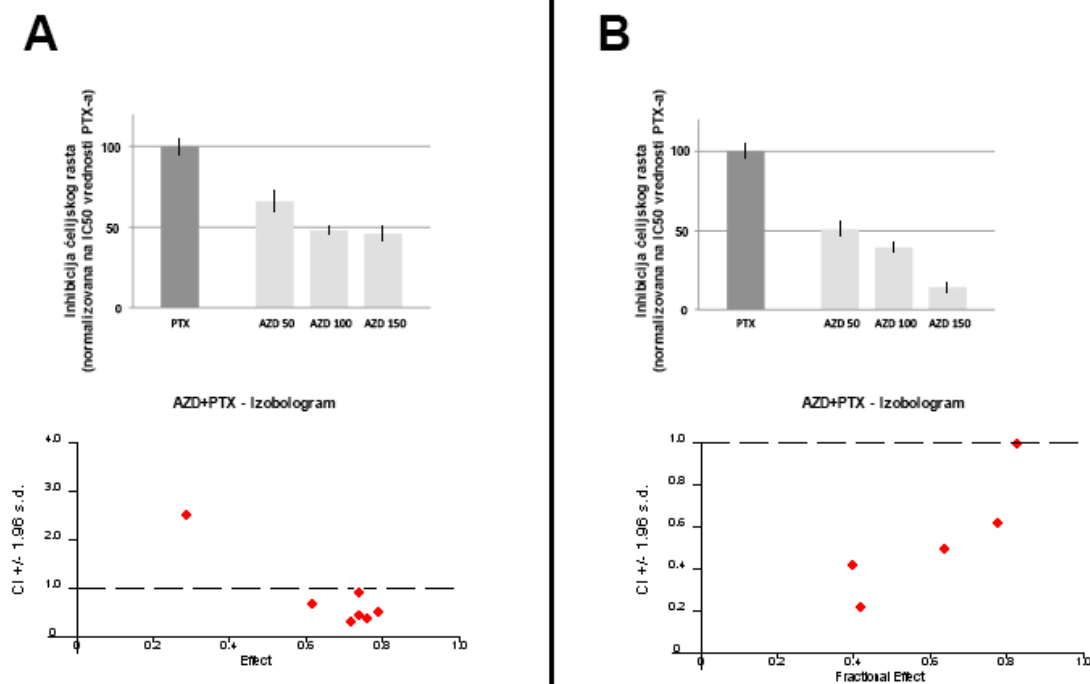


Slika 16. Efikasnost AZD2014 i PTX na 8505C i Rho- ćelijskim linijama. Inhibicija ćelijskog rasta kod 8505C i Rho- ćelija pod dejstvom AZD2014 **A)** i PTX **B)**; Srednje vrednosti su dobijene iz pet nezavisnih eksperimenata (n=5).

4.2.7. EFEKAT AZD2014 NA SENZITIZACIJU 8505C I Rho-ĆELIJA NA PTX

Kombinacija dvostrukog mTOR inhibitora (AZD2014) i PTX-a se pokazala najefikasnijom kod SW1736 ćelija, pa je efekat ove kombinacije ispitan i na 8505C i Rho-ćelijama. Ćelije su tretirane 72h sa tri koncentracije AZD2014 (25, 50 i 100 nM) u kombinaciji sa opsegom koncentracija PTX-a (5–100 nM). Efekat kombinacije terapeutika je određen MTT testom. Priroda uzajamnog dejstva inhibitora sa paklitakselom utvrđena je pomoću kombinacionog indeksa (CI). Dobijeni rezultati ukazuju na sinergistički efekat (CI < 1) i predstavljeni su na slici 17. AZD2014

povećava efikasnost PTX-a kod 8505C ćelija (Slika 17A), kao i kod Rho- ćelija (Slika 17B).

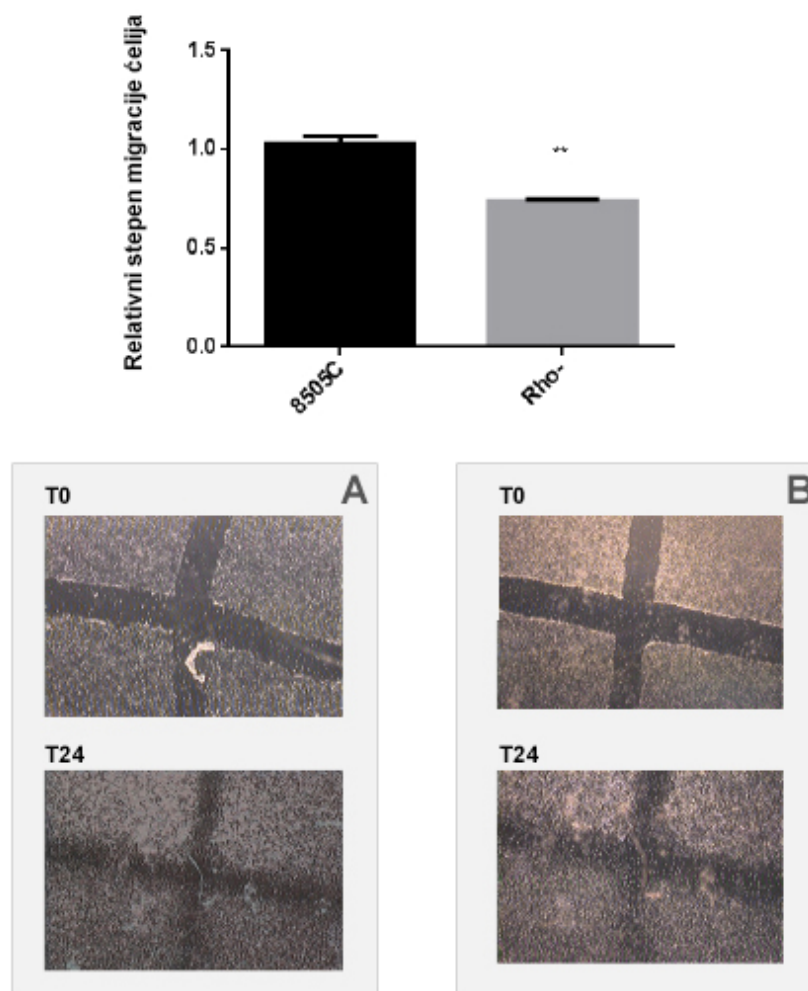


Slika 17. Efekat kombinacijae mTOR inhibitora (AZD2014) i PTX-a kod 8505C i Rho-ćelija. AZD2014 povećava senzitivnost 8505C i Rho-ćelija na PTX, odnosno smanjuje IC50 vrednosti za PTX kod 8505C ćelija **A**) i Rho- ćelija **B**). IC50 vrednosti kombinacija su normalizovane prema IC50 vrednosti PTX-a i predstavljene na histogramima (**A**, **B**). Priroda međudejstva AZD2014 i PTX-a predstavljena je odgovarajućim izobologramima za 8505C ćelijsku liniju **A**) i Rho- ćelijsku liniju **B**). Koncentracije AZD2014 i PTX-a predstavljene su u nanomolima (nM). Efekat kombinacije terapeutika je određen MTT testom. Srednje vrednosti su dobijene iz četiri ili više eksperimenata ($n \geq 4$). Interakcija između mTOR inhibitora (AZD2014) i citostatika (PTX) je određena primenom CalcuSyn softvera. Vrednosti $CI < 1$ ukazuju na sinergistički efekat; AZD, AZD2014; PTX, paklitaksel.

4.2.8. RAZLIKE U INVAZIVNIM KARAKTERISTIKAMA 8505C I Rho- ĆELIJA

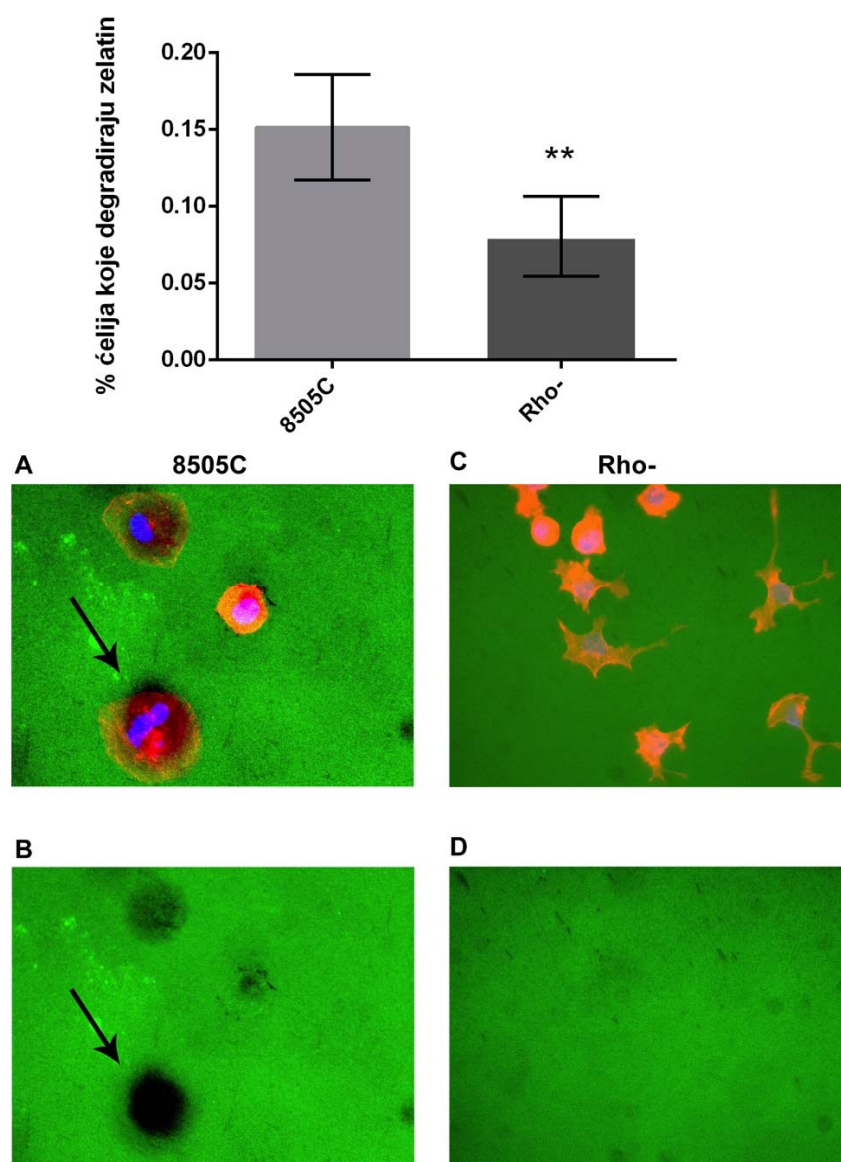
Razlike u invazivnim karakteristikama 8505C i Rho- ćelija analizirane su pomoću tri testa: test zarastanja povrede, test degradacije želatina i test invazivnosti. Cilj ovih metoda je da se pokaže da li postoji razlika između parentalne 8505C i sortirane Rho- ćelijske linije u sposobnosti da migriraju, degradiraju ekstraćelijski matriks i kreću kroz matrigel.

Da bi se ispitala sposobnost migracije ćelije su nakon 24h od zasejavanja i postizanja konfluentnog ćelijskog sloja, zagrebane u obliku krsta. Rezultati eksperimenata su analizirani nakon 24h od nastanka povrede. Upoređena je površina povrede konfluentnog sloja ćelija u nultoj tački i nakon 24h. Na slici 18A se vidi zagrebana površina 8505C ćelija u nultoj tački (T0) i nakon 24h (T24). Na slici 18B se vidi zagrebana površina Rho- ćelija u nultoj tački (T0) i nakon 24h (T24). Vrednosti dobijene iz tri nezavisna eksperimenta za svaku ćelijsku liniju su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje u Graph Pad programu. Pokazano je da sortirana Rho- ćelijska linija statistički značajno manje migrira u odnosu na parentalnu 8505C ćelijsku liniju ($p \leq 0,01$) (Slika 18).



Slika18. Relativni stepen migracije 8505C i Rho- ćelija. Na histogramu je pokazan odnos između migracije 8505C i Rho- ćelija. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta ($n=3$). Statistički značajne razlike ($p<0,01$) u migraciji Rho- ćelijske linije u odnosu na 8505C ćelijsku liniju označene su **. **A)** Test zarastanja povrede na 8505C ćelijskoj liniji. Povreda u obliku krsta je predstavljena u nultoj tački (T0) i nakon 24h (T24). **B)** Test zarastanja povrede na Rho- ćelijskoj liniji. Povreda u obliku krsta je predstavljena u nultoj tački (T0) i nakon 24h (T24).

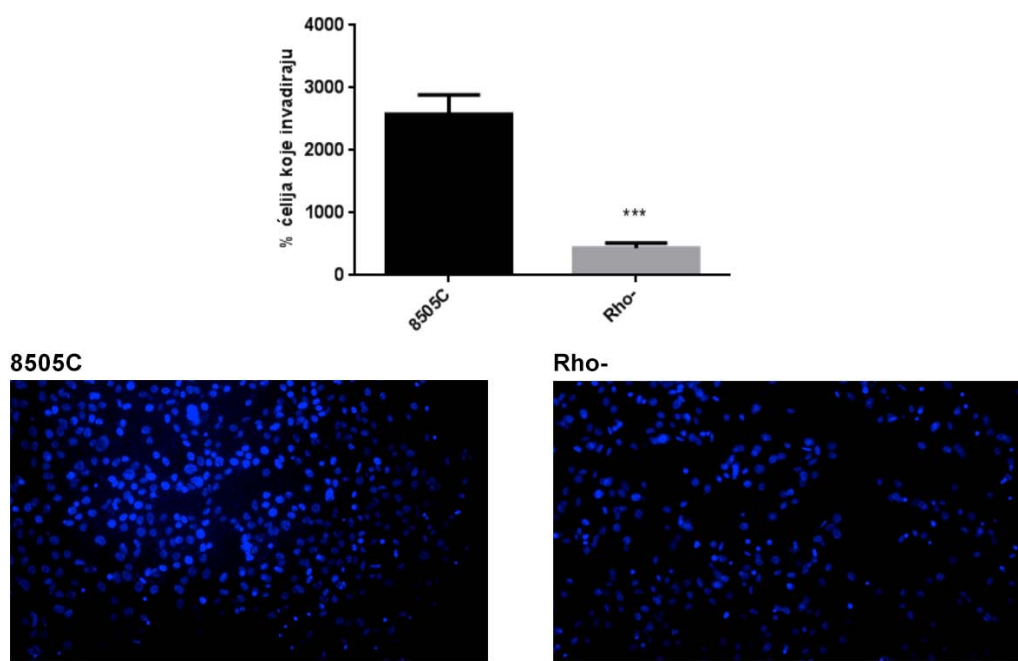
Test degradacije želatina ukazuje na sposobnost kancer ćelija da degradiraju ekstraćelijski matriks, u ovom slučaju želatin koji je supstrat za matriksne metaloproteinaze 2 i 9. Rezultati ovog testa su dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta. Ćelije su gajene na želatinu 24h, a zatim su fiksirane, obojene i slikane na fluorescentnom mikroskopu. Meren je obim tamne oblasti nastale degradacijom želatina (Slika 19B) i normalizovan u odnosu na obim ćelije (Slika 19A). Sve dobijene vrednosti su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje u Graph Pad programu. Pokazano je da 8505C ćelije statistički značajno više degradiraju želatin u odnosu na Rho- ćelije ($p\leq 0,01$) (Slika 19).



Slika 19. Relativni stepen degradacije želatina od strane 8505C i Rho- ćelija. Na histogramu je pokazan odnos između sposobnosti 8505C i Rho- ćelija da degradiraju želatin. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta (n=3). Statistički značajne razlike ($p < 0,01$) između 8505C ćelija i Rho- ćelija označene su **. **A)** Reprezentativni primeri 8505C ćelija zasejanih na želatinu. Strelicom je označena ćelija koja fluorescira crvenom bojom. Na slici se uočavaju jedra koja fluoresciraju plavom bojom. Želatin fluorescira zelenom bojom. **B)** Strelicom je označena degradovana površina želatina od strane prethodno označene 8505C ćelije na slici A. **C)** Reprezentativni primeri Rho- ćelija zasejanih na želatinu. Ćelije fluoresciraju crvenom bojom a želatin zelenom. **D)** Želatin na kome su zasejane Rho- ćelije. Ne uočavaju se degradovane površine.

Testom invazivnosti se utvrđuje sposobnost kancer ćelija za prolazak kroz matrigel. Nakon 24h od zasejavanja, analiziran je broj ćelija koje su prošle kroz matrigel. Rezultati su dobijeni iz 3 nezavisna eksperimenta (n=3) i tako dobijene

vrednosti su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje u Graph Pad programu. Pokazano je da 8505C ćelije imaju veću invazivnu sposobnost, odnosno da statistički značajno ($p \leq 0,001$) više prolaze kroz matrigel u odnosu na sortirane Rho- ćelije (Slika 20).

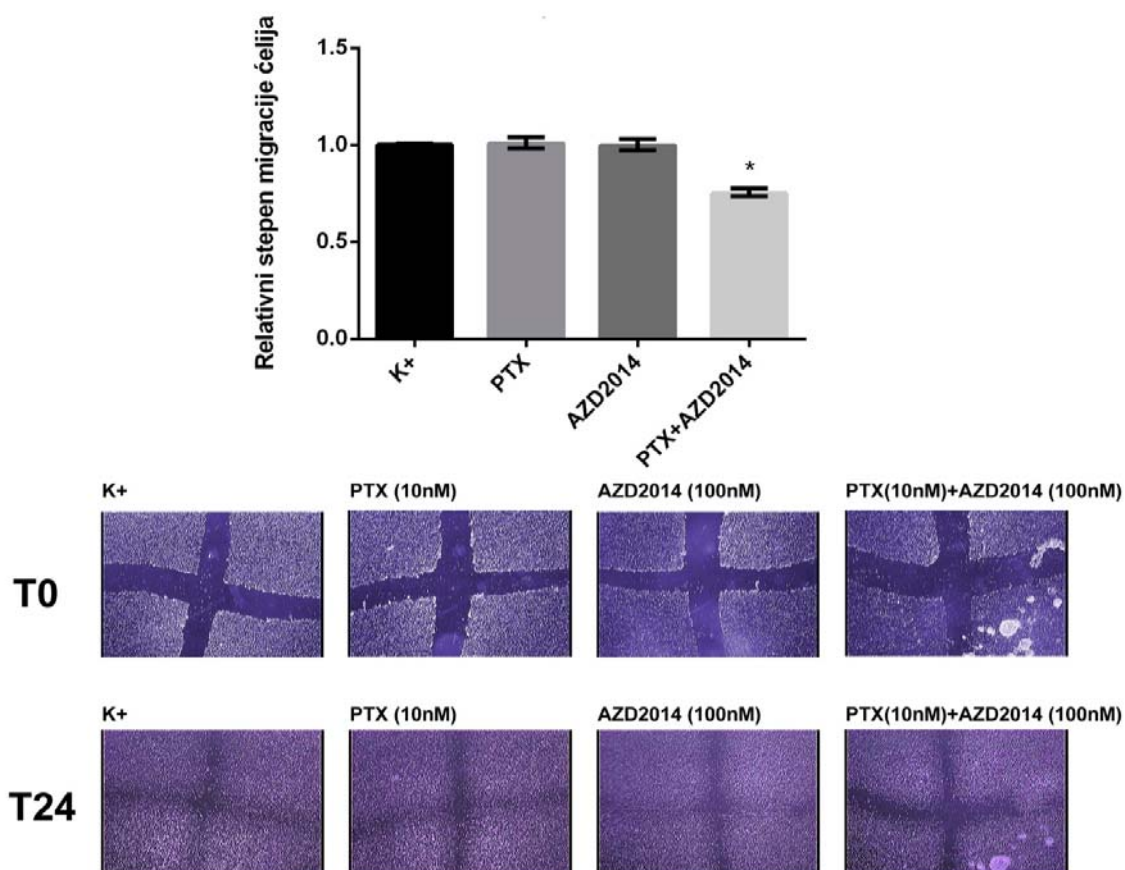


Slika 20. Invazija 8505C i Rho- ćelija. Na histogramu je pokazan odnos između sposobnosti invazije kroz matrigel 8505C i Rho- ćelija. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta ($n=3$). Statistički značajne razlike ($p < 0,001$) u sposobnosti invazije Rho- ćelija kroz matrigel u odnosu na 8505C ćelije označene su ***. Na slikama ispod histograma se vide jedra (plava boja) 8505C i Rho- ćelija koje su prošle kroz matrigel.

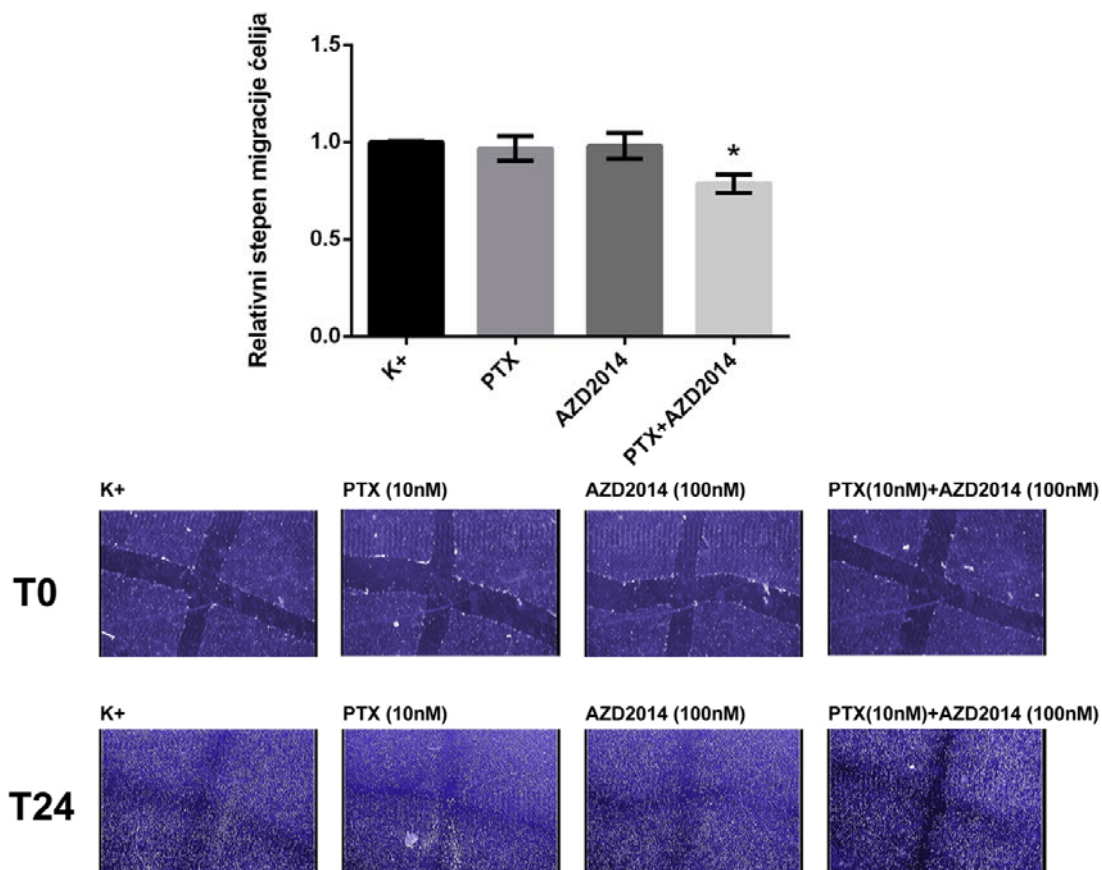
4.2.9. EFEKAT AZD2014 I PTX-a, KAO I NJIHOVE KOMBINACIJE NA INHIBICIJU MIGRACIJE I INVAZIJE

Kombinacija AZD2014 i PTX-a se pokazala izuzetno efikasnom u inhibiciji rasta 8505C i Rho- ćelija, pa je efekat ovih agenasa ispitan i u testovima migracije i invazije. PTX je primenjen u koncentraciji od 10 nM, a AZD2014 u koncentraciji od 100 nM, pojedinačno i u kombinaciji. Ukoliko je procenat ćelija koji je invadirao kroz matrigel u negativnoj kontroli, bio manji od 15%, eksperiment je smatran uspešnim. Vrednosti dobijene iz 3 nezavisna eksperimenta su analizirane korišćenjem programa Graphpad, a uočene razlike su smatrane statistički značajnim ukoliko je stepen

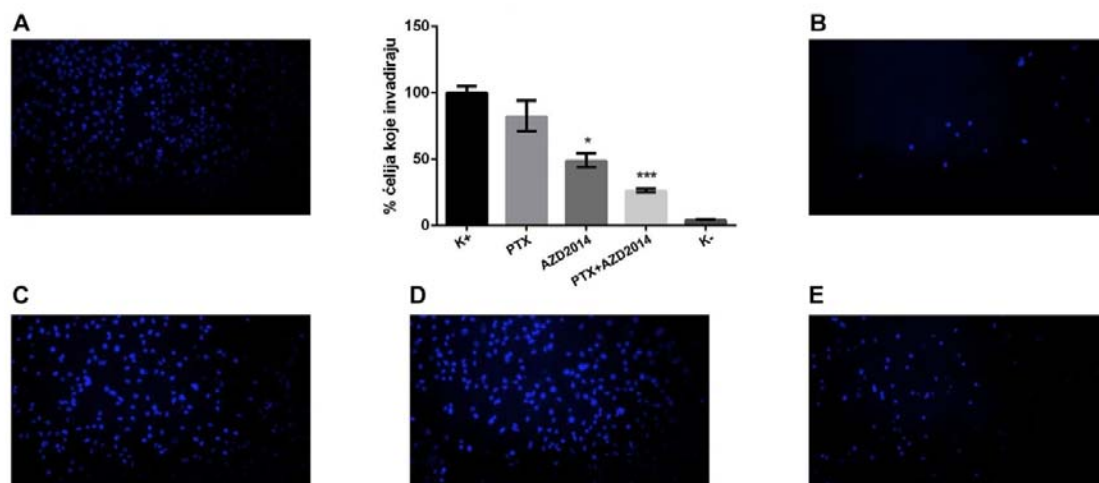
verovatnoće bio $p < 0,05$. Test zarastanja povrede je pokazao da samo kombinacija PTX-a i AZD2014 statistički značajno ($p \leq 0,05$) inhibira migraciju 8505C (Slika 21) i Rho- ćelija (Slika 22). Test invazivnosti je takođe pokazao statistički značajan efekat kombinacije ($p \leq 0,001$) na inhibiciju invazije kancer ćelija kroz matrigel na obe analizirane ćelijske linije: 8505C (Slika 23) i Rho- (Slika 24). PTX, nije pokazao potencijal za inhibiciju ćelijske migracije i invazije ni na parentalnoj 8505C (Slika 21 i 23), niti na sortiranoj Rho- ćelijskoj liniji (Slika 22 i 24). AZD2014 nije uticao na migraciju i invaziju Rho- ćelija (Slika 22 i 24), ali je bio efikasno inhibirao invaziju 8505C ćelija ($p \leq 0,05$) (Slika 23).



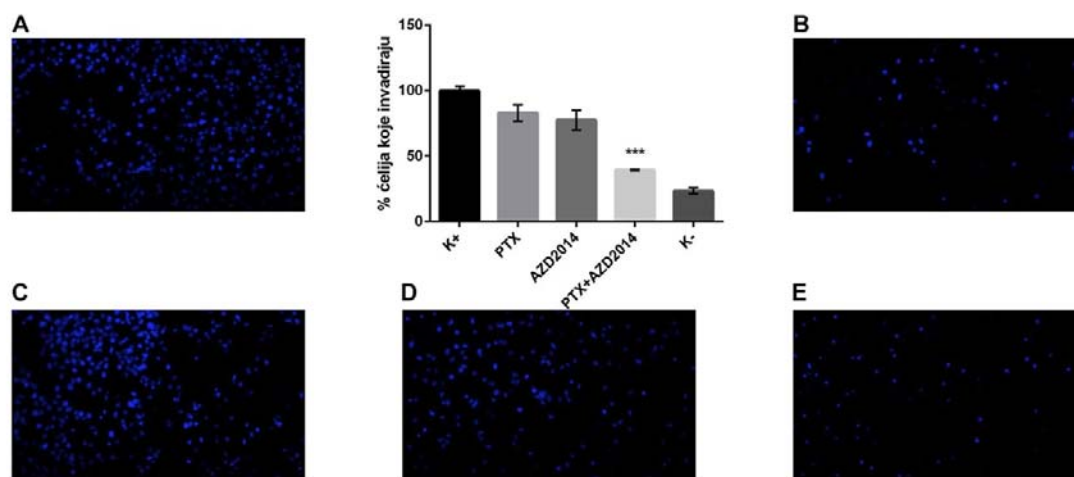
Slika 21. Efekat PTX-a, AZD2014, kao i njihove kombinacije na migraciju 8505C ćelija. Na histogramu je označen zvezdicom (*) statistički značajan efekat ($p \leq 0,05$) kombinacije PTX-a i AZD2014 na inhibiciju migracije 8505C ćelija. Na slikama ispod histograma se vidi efekat pojedinačnih tretmana i kombinacije na zarastanje povrede u obliku krsta kod pozitivne netretirane kontrole (K+), pojedinačnih tretmana, i njihove kombinacije; (T0) Nulta tačka, momenat nastanka povrede; (T24) Zarastanje povrede nakon 24 h.



Slika 22. Efekat PTX-a, AZD2014, kao i njihove kombinacije na migraciju Rho- ćelija. Na histogramu je označen zvezdicom (*) statistički značajan efekat ($p \leq 0,05$) kombinacije PTX-a i AZD2014 na inhibiciju migracije Rho- ćelija. Na slikama ispod histograma se vidi efekat pojedinačnih tretmana i kombinacije na zarastanje povrede u obliku krsta kod pozitivne netretirane kontrole (K⁺), pojedinačnih tretmana, i njihove kombinacije; (T0) Nulta tačka, momenat nastanka povrede; (T24) Zarastanje povrede nakon 24 h.



Slika 23. Efekat PTX-a, AZD2014, kao i njihove kombinacije na invaziju 8505C ćelija. Na histogramu je označen zvezdicom (*) statistički značajan efekat AZD2014 ($p \leq 0,05$) na inhibiciju invazije 8505C ćelija. Statistički značajan efekat ($p \leq 0,001$) kombinacije PTX-a i AZD2014 na inhibiciju invazije 8505C ćelija kroz matrigel označen je sa tri zvezdice (***). Tretman PTX-om nije imao efekat na inhibiciju invazije 8505C ćelija. Na slikama (A,B,C,D,E) se vide jedra (plava boja) 8505C ćelija koje su prošle kroz matrigel: **A)** Pozitivna netretirana kontrola **B)** Negativna kontrola **C)** Tretman PTX-om u koncentraciji od 10 nM; **D)** Tretman sa AZD2014 u koncentraciji od 100 nM; **E)** Tretman kombinacijom PTX-a (10 nM) i AZD2014 (100 nM)



Slika 24. Efekat PTX-a, AZD2014, kao i njihove kombinacije na invaziju Rho- ćelija. Na histogramu je označen sa tri zvezdice (***) statistički značajan efekat ($p \leq 0,001$) kombinacije PTX-a i AZD2014 na inhibiciju invazije Rho- ćelija kroz matrigel. Na slikama (**A,B,C,D,E**) se vide jedra (plava boja) Rho- ćelija koje su prošle kroz matrigel: **A**) Pozitivna netretirana kontrola **B**) Negativna kontrola **C**) Tretman PTX-om u koncentraciji od 10 nM; **D**) Tretman AZD2014 u koncentraciji od 100 nM; **E**) Tretman kombinacijom PTX-a (10 nM) i AZD2014 (100 nM).

5. DISKUSIJA

Karcinomi štitaste žlezde su veoma agresivni maligniteti sa smrtnošću od oko 40%. Među njima, najagresivniji je anaplastični karcinom sa niskom incidencom, ali izrazito visokom stopom mortaliteta. Samo 10% bolesnika živi 2 godine nakon uspostavljanja dijagnoze. Glavni razlog ovako poražavajuće statistike je kompleksna genetička priroda ovog karcinoma, koja otežava njegovo rano otkrivanje i uspešno lečenje (Giuffrida i Gharib, 2000; Kitamura i saradnici, 1999). Generalno uzevši, karcinomi štitaste žlezde su rezistentni na hemioterapiju, ali kod slabo diferenciranih i anaplastičnih tipova ovog karcinoma hemioterapija je često jedino moguće lečenje s obzirom da su izrazito invazivni, rezistentni na radioterapiju i u trenutku otkrivanja često inoperabilni (Nagaiah i saradnici, 2011). Da bi se popravio opšti ishod ove bolesti neophodno je detaljnije upoznati i bolje razumeti sveukupne promene u genomu ćelija anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde i na osnovu toga doći do molekularnih markera za uspešnu ciljanu terapiju što bi doprinelo boljoj prognozi toka i ishoda bolesti.

5.1. ULOGA RAS/MAPK/ERK I PI3K/AKT/MTOR SIGNALIH PUTEVA U PATOGENEZI ATC

Prvi cilj ove studije je bio da se ispituju promene u ključnim komponentama RAS/MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR signalih puteva kod pacijenata sa anaplastičnim karcinomom štitaste žlezde da bi se utvrdila njihova uloga u patogenezi ovog kancera. Ispitivane su mutacije u *p53* tumor-supresoru, a zatim i u *RAS* (*KRAS*, *HRAS*, *NRAS*) i *BRAF* onkogenima kod tumorskih uzoraka pacijenata obolelih od ATC. Ovaj tip karcinoma štitaste žlezde je veoma redak, tako da su uzorci pacijenata uključenih u studiju prikupljeni u vremenskom razdoblju od 20 godina. Promene u PTEN, pAKT, pERK proteinima kod ATC pacijenata ispitivane su imunohistohemijskom analizom.

Mutaciona analiza *p53* gena je pokazala promene u njegovoj primarnoj sekvenci kod 33% (4/12) pacijenata. Pored toga, kod jednog pacijenta je otkrivena mutacija u kodonu 213, egzona 6, koja je redak prirodni polimorfizam. Ovaj polimorfizam je prethodno opisan kod kancera pluća i dojke sa učestalošću pojave

3.2% (Carbone i saradnici, 1991). Među preostalim otkrivenim mutacijama, jedna mutacija sa izmenjenim smislom i jedna delecija 17 nukleotida su prvi put uočene kod anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde. U pogledu distribucije detektovanih mutacija po egzonima, naši rezultati su pokazali prisustvo većine mutacija u egzonu 5 (3/4). Ranije je pokazano da su mutacije u ovom egzonu *p53* tumor supresora negativan prognostički marker u tumorima pluća i dojke (Seshadri i saradnici, 1996; Vega i saradnici, 1997). Inače, inaktivacija *p53* se ističe kao kasni događaj u patogenezi anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde i povezana je sa slabom diferencijacijom tumora i njegovom agresivnošću (Smallridge i Copland, 2010). Tome ide u prilog činjenica da su mutacije u ovom genu veoma retke kod diferenciranih tipova tumora štitaste žlezde u odnosu na slabo diferencirane i anaplastične tipove ovog karcinoma gde je učestalost *p53* mutacija i preko 50% (Legakis i Syrigos, 2011; Smallridge i Copland, 2010).

Mutaciona analiza *RAS* gena je pokazala promene u *NRAS* izoformi ovog gena kod 75% (9/12) analiziranih pacijenata sa anaplastičnim karcinomom, dok u *KRAS* i *HRAS* izoformama ovog gena nisu pokazane promene. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa prethodnim studijama mutacionog statusa *RAS*-a koje su pokazale da je *NRAS* najčešće izmenjena izoforma kod invazivnijih oblika folikularnog karcinoma uključujući i anaplastični karcinom štitaste žlezde (Basolo i saradnici, 2000; Motoi i saradnici, 2000). Najčešće promene *RAS* gena su tačkaste mutacije u 12-om, 13-om i 61-om kodonu, usled čega protein gubi GTP-aznu aktivnost, što za posledicu ima produženo trajanje signalizacije i dalje "pobuđivanje" kaskadne fosforilacije nezavisno od spoljašnjih signala (Quinlan i Settleman, 2009). U uzorcima anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde, analiziranim u ovoj studiji, mutacije u *NRAS* genu su otkrivene u kodonu 50, egzona 2 u svih 9 uzoraka. Prema našim saznanjima, ovo je prvi put da je ovaj tip mutacija uočen kod karcinoma štitaste žlezde. Zanimljivo je da su one karakteristične za Nunanov sindrom (engl. *Noonan*), koji predstavlja rasopatiju sa izraženom predispozicijom za pojavu višestrukih tumora (Tidyman i Rauen, 2009). Mutacija u kodonu 50 ne dovodi do gubljenja GTP-azne aktivnosti RAS proteina kao što je slučaj sa mutacijama u 12-om, 13-om i 61-om kodonu, ali zato dovodi do aktivacije MAPK kaskade, odnosno povišenog nivoa fosforilacije MAP kinaza na serinskim i treoninskim ostacima nezavisno od spoljašnjih signala. Mehanizam RAS aktivacije usled mutacije u kodonu 50 za sada

nije poznat i predmet je istraživanja (Cirstea i saradnici, 2010). Pored aktivacije RAS/MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR signalnih puteva i doprinosa ćelijskom rastu i proliferaciji, aktivirani *NRAS* suprimira apoptozu i samim tim doprinosi razvoju tumora (Haigis i saradnici, 2008; Klampfer i saradnici, 2004; Wolfman i Wolfman, 2000).

Što se tiče promena u ostalim komponentama RAS/MAPK/ERK signalnog puta, na uzorcima ATC pacijenata analizirane su i promene u *BRAF* genu, konkretno na prisustvo mutacije V600E u egzonu 15 (kodon 600, zamena amino-kiseline valin glutaminskom kiselinom). Mutacija u kodonu 600 (V600E) koja rezultira preteranom kinaznom aktivnošću BRAF proteina je najčešća promena *BRAF* gena i uočena je u 26% anaplastičnih karcinoma štitaste žlezde (Liu i saradnici, 2007; Smallridge i Copland, 2010). U našem setu uzoraka, ova promena je uočena kod samo jednog pacijenta.

Kao što je već rečeno *NRAS* je mutiran u 75 % analiziranih uzoraka, za razliku od ostalih analiziranih gena čije su promene nađene u znatno manjem procentu. Visok procenat mutacija u *NRAS* genu sugerise da su mutacije ovog gena mogući rani događaj u evoluciji anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde. U literaturi postoji više dokaza koji idu u prilog ovoj pretpostavci. Pokazano je da su sve tri izoforme *RAS* gena (*KRAS*, *HRAS*, *NRAS*) izmenjene u benignim i malignim karcinomima štitaste žlezde. Takođe učestalost ovih izmena se ne razlikuje kod benignih u odnosu na maligne karcinome štitaste žlezde što potvrđuje hipotezu da je promena *RAS* gena rani događaj u kancerogenezi štitaste žlezde (Lemoine i saradnici, 1989; Namba i saradnici, 1990). Niska učestalost *BRAF* mutacija u našem uzorku pacijenata sa visokom učestalošću *NRAS* mutacija sugerise da su ove mutacije međusobno isključive. Slična situacija je pokazana u kancerogenezi melanoma gde je promena *NRAS* gena dominantan događaj, a *BRAF* mutacije su retke. Imajući u vidu da su *NRAS* i *BRAF* važne komponente RAS/MAPK/ERK signalnog puta, kao i da se RAS nalazi ushodno od RAF proteina, pretpostavlja se da je promena *NRAS* gena bitnija u aktivaciji ovog signalnog puta u melanogenezi što može biti slučaj i sa genezom anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde (Brose i saradnici, 2002; Davies i saradnici, 2002; Singer i saradnici, 2003).

Imunohistohemijska analiza ATC uzoraka pokazala je visoku ekspresiju fosforilisane forme AKT proteina (pAKT) kod 41,6% pacijenata. Visoka ekspresija fosforilisane forme ERK proteina (pERK) pokazana je kod 50% analiziranih uzoraka. Ekspresija PTEN-a se pokazala niskom kod 41,6% pacijenata. Ovi rezultati ukazuju na činjenicu da oba signalna puta, RAS/MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR imaju ulogu u genezi anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde. Prethodne studije su pokazale da je RAS/MAPK/ERK signalni put češće aktiviran u genezi papilarnog karcinoma štitaste žlezde, a PI3K/AKT/mTOR u genezi folikularne forme štitastog karcinoma, dok u genezi ATC-a, koji najčešće nastaje dediferencijacijom ova dva tipa karcinoma, mogu biti aktivna oba puta, RAS/MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR (Xing, 2010).

Analiza povezanosti svih ispitivanih promena u *NRAS* i *p53* genima, kao i promena u ekspresiji PTEN, pAKT, pERK proteina u uzorcima pacijenata sa anaplastičnim karcinomom štitaste žlezde pokazala je statistički značajnu povezanost između promena u *NRAS* genu i pAKT proteinu, kao i između promena u PTEN i pERK proteinskoj ekspresiji. Analiza povezanosti promena između ostalih analiziranih gena i proteina nije pokazala statističku značajnost. Između ekspresije PTEN i pERK proteina pokazana je pozitivna asocijacija, što znači da je učestalost povećane ekspresije PTEN-a značajno veća kod tumorskih uzoraka sa povećanom ekspresijom pERK proteina. Imajući u vidu da je PTEN tumor-supresor, negativni regulator PI3K/AKT/mTOR puta, a povišena ekspresija pERK proteina ukazuje na aktivaciju RAS/MAPK/ERK signalnog puta, može se zaključiti da se ova dva puta međusobno isključuju u genezi anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde. U prilog tome govori i podatak da je u analiziranom setu uzoraka pokazana statistički značajna negativna asocijacija između aktiviranog *NRAS* gena i ekspresije pAKT-a, što znači da je učestalost aktivacije *NRAS* gena značajno manja kod tumorskih uzoraka sa povišenom ekspresijom pAKT proteina. U genezi različitih tipova kancera pokazana je slična situacija i poznata je pod nazivom onkogeni zavisnost (engl. *oncogene addiction*), što znači da je aktivnost samo jednog signalnog puta odgovornog za proliferaciju i preživljavanje ćelija dovoljna da dovode do progresije kancera (Mendoza i saradnici, 2011). Slična situacija uočena je u genezi tumora bešike i endometrijalnih kancera gde se mutacije koje aktiviraju *PIK3CA* gen i aktivirajuće mutacije u *RAS* genu međusobno isključuju (Menges i McCance, 2008; Yuan i Cantley, 2008). Dve studije, rađene na različitim etničkim populacijama pokazale su da su mutacije

PIK3CA gena, *RAS* onkogeni i *PTEN* tumor supresora, međusobno isključive u genezi karcinoma štitaste žlezde, pre svega u genezi folikularnog tipa ovog karcinoma što sugerije da su promene u bilo kom od ovih gena dovoljne za aktivaciju PI3K/AKT/mTOR signalnog puta koji se smatra dominantnim u genezi folikularnog tipa karcinoma štitaste žlezde (Hou i saradnici, 2007; Wang i saradnici, 2007). Ranije studije su pokazale da se mutacije u RAS/MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR signalnom putu mogu naći zajedno u genezi anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde, međutim češće je inaktiviran PI3K/AKT/mTOR put, s obzirom da su njegove promene učestalije kod slabodiferenciranih folikularnih i anaplastičnih karcinoma štitaste žlezde u odnosu na diferencirane tipove ovog tumora (Hou i saradnici, 2007; Liu i saradnici, 2008; Vasko i saradnici, 2004). Naši rezultati idu u prilog tezi da se RAS/MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR signalni putevi međusobno isključuju u genezi ATC (Milosevic i saradnici, 2014).

5.2.ULOGA RAS/MAPK/ERK I PI3K/AKT/mTOR SIGNALNIH PUTEVA U REZISTENCIJI NA KLASIČNE HEMIOTERAPEUTIKE

Poznato je da je anaplastični karcinom štitaste žlezde rezistentan na klasičnu hemioterapiju. Najčešće korišćeni citostatiki u terapiji ovog karcinoma su doksorubicin (DOX), paklitaksel (PTX) i cisplatina (CPT) (Nagaiah i saradnici, 2011). DOX i CPT su citostatiki koji deluju na nivou DNK molekula. DOX delovanjem na topoizomerazu II, zaustavlja proces replikacije (Thorn i saradnici, 2011), dok CPT uzrokuje unakrsno povezivanje DNK molekula, što rezultuje apoptozom (programirana ćelijska smrt) (He i saradnici, 2011). Za razliku od ova dva citostatika PTX je antimitotski agens koji se vezuje za mikrotubule deobnog vretena i sprečava njihovu depolimerizaciju, što ometa normalno odvijanje ćelijske deobe (Kavallaris i saradnici, 1997). Ova tri citostatika su najčešće korišćena u terapiji različitih tipova tumora (Eng i saradnici, 2001). DOX sam kao i u kombinaciji sa CPT nije dao zadovoljavajuće rezultate u lečenju anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde (Nagaiah i saradnici, 2011). U studijama rađenim sa pacijentima obolelim od anaplastičnog karcinoma najbolje se pokazala terapija PTX-om gdje je 53% pacijenata pokazalo delimičan odgovor na ovu terapiju, dok preostali pacijenti nisu reagovali (Ain i saradnici, 2000).

Pokazano je da RAS/MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR signalni putevi imaju ulogu u rezistenciji tumora na hemioterapiju (McCubrey i saradnici, 2006). Prethodne studije su pokazale da PI3K/AKT/mTOR signalni put ima ulogu u rezistenciji tumora na DOX (Bezler i saradnici, 2012), dok je RAS/MAPK/ERK signalni put odgovoran za rezistenciju na PTX (Xu i saradnici, 2009). Shodno tome, uloga inhibitora ovih puteva u senzitivizaciji tumora na konvencionalne hemioterapeutike se intenzivno ispituje u kliničkim studijama (Britten, 2013; Burris, 2013). U ovoj studiji ispitali smo efekat klasičnih citostatika (DOX, PTX, CPT), kao i inhibitora RAS/MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR signalnih puteva kod dve humane ćelijske linije FRO i SW1736.

FRO je humana ćelijska linija slabo diferenciranog folikularnog karcinoma štitaste žlezde, a SW1736 je humana ćelijska linija anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde. Obe linije imaju mutiran BRAF (V600E), a imunocitohemijska analiza je pokazala visoku ekspresiju pERK-a i PTEN-a, a nisku ekspresiju pAKT-a, što ukazuje na aktivnost RAS/MAPK/ERK signalnog puta. DOX i PTX su se pokazali efikasnijim u inhibiciji rasta obe ćelijske linije u odnosu na CPT. Ispitivan je takođe i efekat inhibitora signalnih molekula: RAS-a (tipifarnib), pan-AKT-a (GSK690693), mTOR kompleksa 1 i 2 (AZD2014), mutiranog BRAFV600E (dabrafenib) i PI3K (vortmanin). FRO ćelijska linija je bila generalno senzitivnija na primenjene citostatike i inhibitore, sem na AZD2014 i dabrafenib. Uzrok tome može biti više diferenciran fenotip FRO ćelijske linije u odnosu na SW1736 liniju anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde. Najslabiji efekat je pokazan u tretmanu pan-AKT inhibitorom verovatno zbog niske ekspresije pAKT-a u ovim linijama, a najefikasnijim se pokazao dvostruki mTOR inhibitor, AZD2014. Primena ovog inhibitora je pokazala značajan antitumorski efekat na ćelijskim linijama FRO i SW1736 već pri niskim nanomolarnim koncentracijama. Prethodne studije su pokazale dobar efekat AZD2014 inhibitora u lečenju kolorektalnog kancera *in vivo*. Naime, uočeno je da oralna primena ovog inhibitora značajno inhibira rast ksenografta kolorektalnog karcinoma u imunodeficientnim miševima i takođe značajno povećava preživljavanje ovih miševa (Huo i saradnici, 2014). Do sada niti jedna studija drugih autora o efektu ovog inhibitora na karcinome štitaste žlezde nije objavljena.

Dalje smo ispitali da li GSK690693, AZD2014, tipifarnib, dabrafenib i vortmanin mogu poboljšati efikasnost PTX-a i DOX-a u SW1736 ćelijskoj liniji anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde. Nismo ispitali kombinacije sa cisplatinom

jer su ćelije pokazale visoku rezistenciju na ovaj hemioterapeutik koji inače u ranijim studijama nije pokazao efikasnost na pacijentima obolelim od karcinoma štitaste žlezde i najčešće je primenjivan u kombinaciji sa doksorubicinom (Nagaiah i saradnici, 2011). Uticaj inhibitora na efikasnost PTX-a i DOX-a utvrđena je pri relativno niskim koncentracijama inhibitora.

Rezultati su pokazali da sve kombinacije inhibitora (GSK690693, AZD2014, tipifarnib, dabrafenib, vortmanin) sa PTX-om ili DOX-om imaju aditivno ili sinergističko dejstvo. Tretman pan-AKT inhibitorom (GSK690693) se pokazao efikasnijim u kombinaciji sa DOX-om nego sa paklitakselom, dok je RAS inhibitor (tipifarnib) bio efikasniji u kombinaciji sa PTX-om.

Smatra se da se mehanizam zajedničkog delovanja GSK690693 i DOX-a odvija preko pAKT molekula u ćelijama kancera. Naime, pokazano je da tretman DOX-om povećava količinu fosforilisanog AKT proteina u jedru tumorske ćelije što favorizuje preživljavanje ćelije, a njegovom inhibicijom se povećava citotoksični efekat DOX-a. U skladu sa tim, prethodne studije su pokazale da PI3K/AKT inhibicija značajno povećava apoptozu i pojačava antitumorski efekat DOX-a u humanim linijama kancera dojke i ovarijuma (Wallin i saradnici, 2010). Ovaj rezultat je u našim istraživanjima potvrđen sinergističkim dejstvom PI3K inhibitora (vortmanin) i DOX-a na ATC ćelijama. Naime, PI3K inhibitor se takođe pokazao efikasnim u senzitivizaciji SW1736 ćelija na DOX. Imajući u vidu ranije pomenutu ulogu PI3K/AKT/mTOR signalnog puta u rezistenciji na DOX (Bezler i saradnici, 2012), PI3K i pan-AKT inhibitori bi mogli biti obećavajući terapeutici u prevazilaženju rezistencije na ovaj klasični hemioterapeutik kod pacijenata sa anaplastičnim karcinomom štitaste žlezde.

S druge strane, prethodne studije su pokazale da inhibitori farnezil-transferaza kao što je tipifarnib sinergizuju sa taksanima. Mehanizam zajedničkog delovanja je preko enzima histon deacetilaze 6 (HDAC6). Ova dva terapeutika u kombinaciji inhibiraju dejstvo HDAC6 čime se povećava acetilacija tubulina, ciljnog molekula delovanja PTX-a. Njihovim sinergističkim dejstvom dolazi do acetilacije tubulina, zastavljanja ćelijskog ciklusa i ćelijske smrti (Marcus i saradnici, 2005).

Dabrafenib se pokazao efikasnim u u senzitivizaciji SW1736 ćelija i na DOX, i na PTX. Ova ćelijska linija poseduje mutiran *BRAF*, tako da inhibicija ove kinaze ima efekat na senzitivizaciju ćelija na oba hemioterapeutika. Inhibicijom BRAF kinaze inhibira se RAS/MAPK/ERK signalni put koji je kao što je već navedeno odgovoran

za rezistenciju kancer ćelija na PTX. Ranije studije su pokazale i sinergističko dejstvo BRAF inhibitora i DOX-a na ćelijama hepatocelularnog karcinoma. Naime, pokazano je da inhibicija BRAF-a dovodi do povećane unutarćelijske akumulacije DOX-a čime se povećava njegova citotoksičnost (Huynh i saradnici, 2007).

U ispitivanju efikasnosti inhibitora RAS/MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR signalnih puteva u kombinovanim tretmanima, najefikasnijim se pokazao dvostruki mTOR inhibitor –AZD2014. Ovaj inhibitor deluje na oba mTOR kompleksa, mTORC1 i mTORC2 i tako potpuno blokira PI3K/AKT/mTOR signalni put (Zaytseva i saradnici, 2012). AZD2014 deluje u nanomolarnom opsegu za razliku od prethodno pomenutih inhibitora i značajno senzitiše SW1736 ćelije na DOX i PTX. Međutim, dejstvo mTOR inhibitora nije dozno zavisno, već sve tri primenjene koncentracije u kombinaciji sa PTX-om izazivaju isti sinergistički efekat. Shafer i saradnici (2010) su već ispitivali efekat mTORC1 (rapamicin) inhibitora u kombinaciji sa PTX-om i pokazali sinergistički efekat ova dva terapeutika u inhibiciji ćelijske proliferacije i indukciji apoptoze na humanim ćelijama endometrijalnog kancera. Mehanizam ovog kombinovanog dejstva se ostvaruje preko S6 kinaze, glavnog nishodnog efektor mTOR signalnog puta. Naime kombinovanim delovanjem mTOR inhibitora i PTX-a, fosforilacija S6 kinaze se statistički značajno smanjuje u odnosu na delovanje ovih terapeutika pojedinačno. Takođe, kombinovano dejstvo mTOR inhibitora i PTX-a dovodi do snažnijeg efekta PTX-a na polimerizaciju tubulina, čime se uvećava njegovo citotoksično dejstvo (Shafer i saradnici, 2010). Poznata je uloga PI3K/AKT/mTOR signalnog puta u rezistenciji tumorskih ćelija na DOX (Bezler i saradnici, 2012), pa tako inhibicija ovog puta dvostrukim mTOR inhibitorom povećava osetljivost ćelija štitastog karcinoma i na DOX.

S obzirom da se dvostruki mTOR inhibitor pokazao najefikasnijim u senzitivizaciji SW1736 ćelijske linije na PTX (Milosevic i saradnici, 2014), efekat ove kombinacije smo ispitali i na 8505C ćelijskoj liniji anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde.

Ćelijska linija 8505C ima kao i prethodne dve mutiran BRAF (V600E) i stoga aktivan RAS/MAPK/ERK signalni put. Imunocitohemijskom analizom pokazana je pojačana ekspresija pAKT proteina što sugeriše da je u ovoj ćelijskoj liniji aktivan i PI3K/AKT/mTOR signalni put. Kombinacija dvostrukog mTOR inhibitora i PTX-a se pokazala izuzetno efikasnom i na ovoj ćelijskoj liniji sugerišući da bi ovaj terapijski

modalitet mogao biti obećavajući u terapiji anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde bez obzira koji je signalni put aktiviran, RAS/MAPK/ERK, PI3K/AKT/mTOR ili oba.

Ranija studija Serra i saradnika (2008) je takođe pokazala dobar efekat kombinacije dvostrukog PI3K/mTOR inhibitora (BEZ235) i PTX-a na ćelijskim linijama anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde. BEZ235 se pokazao efikasnim i na *in vivo* modelu, tj. ksenograftima 8505C ćelijske linije. Problem ove terapije je bio povećana koncentracija pAKT-a u ćeliji nakon primene niskih doza PI3K/mTOR inhibitora u kombinaciji sa PTX-om. Pretpostavlja se da je uzrok ove pojave sektivna blokada mTORC1 kompleksa i PI3K kinaze, dok je efikasnost u blokadi mTORC2 kompleksa niska. Usled toga pri niskim koncentracijama ovog inhibitora dolazi do inaktivacije S6 kinaze, ali i do aktivacije mTORC2 kompleksa i povišene koncentracije pAKT-a u ćeliji, što favorizuje preživljavanje. Pri visokim dozama inhibitora ovaj efekat se prevazilazi i terapija je bila efikasna (Lin i saradnici, 2012; Manara i saradnici, 2010; Serra i saradnici, 2008). Prednost terapije dvostrukim mTOR inhibitorom, kao što je AZD2014 je što svoj efekat ostvaruje preko oba mTOR kompleksa i pri niskim koncentracijama. Pored toga što nema koncentraciono zavisno dejstvo, kompletno blokira PI3K/AKT/mTOR signalni put i značajno senzitiše ćelije anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde na PTX.

5.3. MDR FENOTIP ANAPLASTIČNOG KARCINOMA ŠTITASTE ŽLEZDE

Anaplastični karcinom kao i ostali tipovi karcinoma štitaste žlezde su urođeno rezistentni na primenu hemioterapeutika (Nagaiah i saradnici, 2011). Mehanizam rezistencije nije poznat. Pored povišene ekspresije RAS/MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR signalnih puteva, jedan od mogućih uzroka neuspeha hemioterapije može biti i prekomerna ekspresija transportnih pumpi. U određenom procentu pacijenata sa anaplastičnim karcinomom štitaste žlezde pokazana je povećana ekspresija P-gp proteina (Satake i saradnici, 1997). Međutim, ne postoje podaci o ekspresiji BCRP pumpi kod ovih pacijenata. Jedan od ciljeva ove studije bio je i da se ispita udeo ekspresije P-gp i BCRP proteina u rezistenciji anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde, kako kod pacijenata, tako i na humanim ćelijskim linijama ovog karcinoma (FRO, SW1736 i 8505C).

Imunohistohemijska analiza uzoraka tumorskog tkiva pacijenata obolelih od anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde pokazala je visoku ekspresiju P-gp proteina

kod 66,7% (8/12) pacijenata. Visoka ekspresija BCRP pumpi pokazana je kod 33,4% (4/12) analiziranih uzoraka. Karakteristika P-gp-a je široka supstratna specifičnost. Njegovi supstrati imaju različite hemijske strukture i širok spektar bioloških aktivnosti, a većina citostatika upravo i jesu njegovi supstrati: antraciklini, taksani, *vinca* alkaloidi, epipodofilotoksini (Fung i Gottesman, 2009). Upravo iz tog razloga visoka ekspresija P-gp-a pokazana na uzorcima anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde u našoj studiji, može biti jedan od uzroka rezistencije ovog tumora na antitumorske agense, kao što su DOX i PTX. Naša studija je pokazala visoku ekspresiju BCRP pumpe kod 33,4% analiziranih uzoraka što je znatno niži procenat u odnosu na ekspresiju P-gp-a. Povećana ekspresija ovog proteina u tumorima određuje stepen rezistencije na većinu inhibitora topoizomerase I ili II, kao što su topotekan, irinotekan, i DOX (Doyle i Ross, 2003).

Imunocitohemijska analiza FRO, SW1736 i 8505C ćelija u poređenju sa uzorcima pacijenata je pokazala znatno nižu ekspresiju analiziranih pumpi.

Da bismo dobili model sistem koji odgovara pacijentima sortirali smo 8505C ćelijsku liniju koja ima aktivna oba signalna puta, RAS/MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR, prema smanjenoj akumulaciji rodamina (Rho123), poznatog P-gp supstrata. Novouspostavljena ćelijska linija nazvana je Rho-. Nakon par meseci kultivisanja, proverena je ekspresija transportnih pumpi i akumulacija rodamina kod Rho- ćelija. Ispostavilo se da nova sortirana ćelijska linija Rho- znatno manje akumulira rodamin u odnosu na parentalnu 8505C ćelijsku liniju, što je praćeno povišenom ekspresijom P-gp i BCRP pumpi. Ispitali smo i citotoksični efekat PTX-a na ovoj ćelijskoj liniji i pokazalo se da je 2 puta rezistentija na PTX u odnosu na 8505C ćelijsku liniju.

Iako rezistentna na PTX, Rho- ćelijska linija se pokazala senzitivnijom na AZD2014 u poređenju sa 8505C ćelijskom linijom. Uzrok ove povećane senzitivnosti može biti smanjena pAKT ekspresija kod Rho- ćelija u odnosu na parentalne 8505C ćelije. Ranije studije su pokazale veću rezistenciju tumora bešike na inhibitore mTORC1 kod ćelija koje imaju wt PTEN i smanjenu pAKT ekspresiju (Seront i saradnici, 2012). Ovaj tip rezistencije nastaje inaktivacijom S6 kinaze, usled čega se aktivira mTORC2 kompleks koji povratno indukuje povećanje koncentracije pAKT-a u ćeliji favorizujući preživljavanje. Dvostrukom blokadom oba kompleksa, mTORC1 i mTORC2, prevazilazi se povratna sprega preko koje se aktivira pAKT (Lin i saradnici, 2012; Manara i saradnici, 2010; Serra i saradnici, 2008). Stoga su ćelije sa

nižom ekspresijom pAKT-a u slučaju primene kompletnih blokatora ovog puta, kao što je AZD2014, podložnije njegovom dejstvu u odnosu na ćelije sa većim prisustvom pAKT-a.

Kombinacija AZD2014 i PTX-a je dovela do sinergističkog efekta i na sortiranoj Rho- i na parentalnoj 8505C ATC liniji. Ovim je dodatno potvrđeno da kombinacija dvostrukog mTOR inhibitora i PTX-a predstavlja obećavajuću terapiju u lečenju anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde.

5.4. ULOGA PI3K/AKT/mTOR PUTA U INVAZIJI ATC ĆELIJA

Anaplastični karcinom štitaste žlezde ne samo da je rezistentan na hemioterapiju, već je i izrazito invazivan. Prodire u okolne strukture i metastazira u limfne čvorove i udaljene organe kao što su pluća i kosti što je još jedan razlog izuzetno loše prognoze ovog tipa karcinoma (Giuffrida i Gharib, 2000). Aktivacija PI3K/AKT/mTOR signalnog puta doprinosi metastatskoj pokretljivosti ćelija preko aktivacije Rho familije GTP-aza (RhoA, Rac1 i Cdc42) (Kolsch i saradnici, 2008). Rho GTP-aze regulišu dinamiku citoskeleta, ćelijsku adheziju i migraciju i imaju centralnu ulogu u invaziji i metastazi ćelija kancera (Vega i Ridley, 2008). Prethodne studije na ćelijskim linijama tumora prostate su pokazale da inhibicija PI3K/AKT/mTOR signalnog puta preko PI3K inhibitora efikasno suprimira invaziju ćelija, što potvrđuje da je aktivacija ovog puta bitna za invaziju i progresiju kancera (Shukla i saradnici, 2007).

Da bi se ispitala invazivna sposobnost 8505C i Rho- ćelija, utvrđen je stepen njihove migracije, efikasnost u degradaciji želatina i mogućnost kretanja kroz matrigel. Testovi su pokazali da 8505C ćelije statistički značajno više migriraju, degradiraju želatin i prolaze kroz matrigel u odnosu na sortirane Rho- ćelije. S obzirom da je pokazana znatno veća količina pAKT proteina u parentalnoj 8505C ćelijskoj liniji u odnosu na Rho- ćelije možemo reći da je aktivacija PI3K/AKT/mTOR signalnog puta bitna za invaziju kancer ćelija. Takođe, neke studije su pokazale negativnu korelaciju između MDR fenotipa i malignog potencijala tumora. Tako je prekomerna ekspresija P-gp proteina povezana sa manje invazivnim tumorskim fenotipom (Biedler i Spengler, 1994; Scotli i saradnici, 1996), što je u skladu sa našim rezultatima. Novija studija je takođe pokazala da ćelije kancera kolona koje imaju povišenu ekspresiju P-gp proteina, pored toga što su rezistentnije na

hemioterapiju, proliferišu sporije, imaju manje diferenciran fenotip, ali takođe i manje invazivan, što je otvorilo mogućnosti za razmatranje ovih ćelija kao potencijalnih tumorskih stem ćelija (Schumacher i saradnici, 2012).

Uticaj AZD2014 i PTX-a na migraciju i invaziju 8505C i Rho- ćelija ispitan je u pojedinačnim tretmanima, kao i u kombinaciji. Kod parentalne linije, dvostruki mTOR inhibitor je pokazao određenu efikasnost u inhibiciji invazije, ali je imao znatno manji efekat u odnosu na kombinovani tretman sa PTX-om. Kod rezistentne Rho- linije, pojedinačni tretmani nisu imali nikakvog efekta na migraciju i invaziju, dok je kombinacija bila izrazito efikasna. Ovi rezultati ukazuju da inhibicija PI3K/AKT/mTOR signalnog puta efikasno suprimira invaziju ATC ćelija u kombinaciji sa PTX-om. Mogući mehanizam sinergističkog dejstva dvostrukog mTOR inhibitora i PTX-a na inhibiciju migracije i invazije ćelija je preko S6 kinaze (Shafer i saradnici, 2010). Prethodne studije su pokazale ulogu ove kinaze u različitim tipovima ćelijske pokretljivosti, i to preko aktivacije određenih gena kao što su geni za matriksne metaloproteinaze (MMP1, MMP9, MMP10), zatim α 2-integrin, Rho GTP-aze. Stoga, inhibicija ove kinaze može smanjiti invazivnu sposobnost kancer ćelija. Takođe, kombinacija mTOR inhibitora i terapeutika koji ciljaju mikrotubule ima i antiangiogeni efekat (Campostrini i saradnici, 2006).

Stoga, dvostruki mTOR inhibitor ne samo da povećava osetljivost ćelija na dejstvo PTX-a, već u kombinaciji sa ovim citostatikom efikasno inhibira i invaziju ATC ćelija. Imajući u vidu da su rezistentnost i invazivnost glavni uzrok loše prognoze anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde, terapija kombinacijom dvostrukog mTOR inhibitora i PTX-a bi mogla doprineti efikasnijem lečenju pacijenata obolelih od ovog tipa karcinoma.

6. ZAKLJUČCI

Iz prikazanih rezultata, kao i njihovog tumačenja u odnosu na postojeću literaturu, proizilaze sledeći zaključci ove doktorske disertacije:

Studije na pacijentima sa ATC su pokazale:

1. *NRAS* onkogen i *p53* tumor-supresor su sa visokom učestalošću izmenjeni u ispitivanim tumorskim uzorcima ATC. *NRAS* gen je mutiran sa najvećom učestalošću, u 75% analiziranih uzoraka, za njim sledi *p53* gen koji je mutiran kod 33% analiziranih pacijenata. Sve otkrivene mutacije u *NRAS* genu i dve mutacije u *p53* genu su prvi put prijavljene kod anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde. Analiza promena u *BRAF* genu pokazala je prisustvo mutacije kod samo jednog pacijenta. Iako su i *NRAS* i *BRAF* ključni za patogenezu ATC, naša studija je pokazala da je promena *NRAS* gena dominantna u ispitivanoj grupi pacijenata.

2. Imunohistohemijska analiza je pokazala da su promene u komponentama RAS/MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR signalnih puteva važne u genezi ATC. Pokazana je visoka ekspresija pAKT proteina kod 41,6% pacijenata. Visoka ekspresija pERK proteina je pokazana kod 50% analiziranih uzoraka, a ekspresija PTEN-a je bila niska kod 41,6% pacijenata. Takođe, uočeno je i prisustvo transportnih pumpi. Visoka ekspresija P-gp proteina je utvrđena kod 66,7% pacijenata, dok je visoka ekspresija BCRP pumpi pokazana kod 33,4% analiziranih uzoraka.

3. Analiza povezanosti dobijenih promena u ispitivanim genima (*NRAS* i *p53*) i proteinima (pAKT, pERK, PTEN, P-gp i BCRP) u ATC uzorcima je pokazala statistički značajne asocijacije između promena u *NRAS* genu i pAKT proteinu, kao i između promena u PTEN i pERK proteinskoj ekspresiji. Pokazano je da je učestalost povišene ekspresije PTEN proteina značajno veća kod tumorskih uzoraka sa povišenom ekspresijom pERK proteina, kao i da je učestalost aktivacije *NRAS* gena značajno manja kod tumorskih uzoraka sa povišenom ekspresijom pAKT proteina. Imajući u vidu ulogu ovih promena u aktivaciji RAS/MAPK/ERK i

PI3K/AKT/mTOR signalnih puteva može se zaključiti da se ovi putevi međusobno isključuju u genezi ATC.

In vitro studije na humanima ATC ćelijskim linijama su pokazale:

1. Slabo diferencirane ćelije karcinoma štitaste žlezde (FRO) su se pokazale osetljivijim na citotoksični efekat klasičnih hemioterapeutika i inhibitora komponenti PI3K/AKT/mTOR i RAS/MAPK/ERK signalnih puteva u odnosu na dediferencirane anaplastične ćelije (SW1736). Najefikasniji citostatik u inhibiciji ćelijskog rasta obe analizirane ATC humane ćelijske linije bio je PTX, a najefikasniji inhibitor AZD2014 (mTOR inhibitor).
2. Najefikasnija senzitivizacija ATC ćelija na klasične hemioterapeutike postignuta je nakon tretmana dvostrukim mTOR inhibitorom (AZD2014). AZD2014, već pri niskim primenjenim dozama, statistički značajno povećava citotoksični efekat PTX-a na ATC ćelijama.
3. Sortiranjem 8505C ćelija sa smanjenom akumulacijom rodamina uspostavljena je Rho- ćelijska linija, čija je karakterizacija pokazala da ima višu ekspresiju P-gp i BCRP pumpe, a nižu ekspresiju pAKT u odnosu na parentalne 8505C ćelije.
4. Pokazano je da su Rho- ćelije rezistentije na PTX, ali senzitivnije na AZD2014 u odnosu na 8505C ćelije. Kombinovani tretman AZD2014 i PTX-a je pokazao sinergistički efekat kod obe ispitivane ćelijske linije: 8505C i Rho-.
5. Analizom invazivnih karakteristika 8505C i Rho- ćelija pokazano je da Rho- ćelije statistički značajno manje migriraju, degradiraju želatin i invadiraju kroz matrigel.
6. Kombinovani tretman AZD2014 i PTX-a je značajno inhibirao migraciju i invaziju 8505C i Rho- ćelija.

Opšti zaključak:

Promene u komponentama RAS/MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR signalnih puteva su važne u genezi anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde. Inhibicija komponenti ovih puteva značajno povećava osetljivost ćelija anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde na doksorubicin i paklitaksel. Najefikasniji u smanjenju rezistencije na klasične hemioterapeutike pokazao se dvostruki mTOR inhibitor (AZD2014). Naime, AZD2014 ne samo da povećava osetljivost na paklitaksel, već u kombinaciji sa ovim citostatikom efikasno inhibira i migraciju i invaziju ATC ćelija. Imajući u vidu da su rezistentnost i invazivnost anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde glavni uzrok loše prognoze, terapija kombinacijom dvostrukog mTOR inhibitora i paklitaksela bi mogla biti logična strategija u lečenju pacijenata obolelih od ovog karcinoma.

LITERATURA

Ain, K.B., Egorin, M.J., and DeSimone, P.A. (2000). Treatment of anaplastic thyroid carcinoma with paclitaxel: phase 2 trial using ninety-six-hour infusion. Collaborative Anaplastic Thyroid Cancer Health Intervention Trials (CATCHIT) Group. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* *10*, 587-594.

Alessi, D.R., Saito, Y., Campbell, D.G., Cohen, P., Sithani, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C.J., and Cowley, S. (1994). Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J* *13*, 1610-1619.

Altomare, D.A., Zhang, L., Deng, J., Di Cristofano, A., Klein-Szanto, A.J., Kumar, R., and Testa, J.R. (2010). GSK690693 delays tumor onset and progression in genetically defined mouse models expressing activated Akt. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *16*, 486-496.

Arcaro, A., and Wymann, M.P. (1993). Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *The Biochemical journal* *296 (Pt 2)*, 297-301.

Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., vanTuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y., *et al.* (1989). Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* *244*, 217-221.

Basolo, F., Pisaturo, F., Pollina, L.E., Fontanini, G., Elisei, R., Molinaro, E., Iacconi, P., Miccoli, P., and Pacini, F. (2000). N-ras mutation in poorly differentiated thyroid carcinomas: correlation with bone metastases and inverse correlation to thyroglobulin expression. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* *10*, 19-23.

Berridge, M.V., Herst, P.M., and Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review* 11, 127-152.

Bezler, M., Hengstler, J.G., and Ullrich, A. (2012). Inhibition of doxorubicin-induced HER3-PI3K-AKT signalling enhances apoptosis of ovarian cancer cells. *Molecular oncology* 6, 516-529.

Biedler, J.L., and Spengler, B.A. (1994). Genetics of drug resistance. *Cancer treatment and research* 73, 1-16.

Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Leal, J.F., and Carnero, A. (2007). PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis* 28, 1379-1386.

Bredel, M. (2001). Anticancer drug resistance in primary human brain tumors. *Brain research Brain research reviews* 35, 161-204.

Brentnall, T.A. (1995). Microsatellite instability. Shifting concepts in tumorigenesis. *Am J Pathol* 147, 561-563.

Britten, C.D. (2013). PI3K and MEK inhibitor combinations: examining the evidence in selected tumor types. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 71, 1395-1409.

Brose, M.S., Volpe, P., Feldman, M., Kumar, M., Rishi, I., Guerrero, I., Einhorn, E., Herlyn, M., Minna, J., Nicholson, A., et al. (2002). BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer research* 62, 6997-7000.

Brosh, R., and Rotter, V. (2009). When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* 9, 701-713.

Bruni, P., Boccia, A., Baldassarre, G., Trapasso, F., Santoro, M., Chiappetta, G., Fusco, A., and Viglietto, G. (2000). PTEN expression is reduced in a subset of sporadic thyroid carcinomas: evidence that PTEN-growth suppressing activity in thyroid cancer cells mediated by p27kip1. *Oncogene* 19, 3146-3155.

Burris, H.A., 3rd (2013). Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 71, 829-842.

Cahill, D.P., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Lengauer, C. (1999). Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* 9, M57-60.

Campostrini, N., Marimpietri, D., Totolo, A., Mancone, C., Fimia, G.M., Ponzoni, M., and Righetti, P.G. (2006). Proteomic analysis of anti-angiogenic effects by a combined treatment with vinblastine and rapamycin in an endothelial cell line. *Proteomics* 6, 4420-4431.

Carbone, D., Chiba, I., and Mitsudomi, T. (1991). Polymorphism at codon 213 within the p53 gene. *Oncogene* 6, 1691-1692.

Carlomagno, F., and Santoro, M. (2011). Thyroid cancer in 2010: a roadmap for targeted therapies. *Nat Rev Endocrinol* 7, 65-67.

Chang, E.H., Furth, M.E., Scolnick, E.M., and Lowy, D.R. (1982). Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* 297, 479-483.

Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984;22:27-55.

Cirstea, I.C., Kutsche, K., Dvorsky, R., Gremer, L., Carta, C., Horn, D., Roberts, A.E., Lepri, F., Merbitz-Zahradnik, T., Konig, R., *et al.* (2010). A restricted spectrum of NRAS mutations causes Noonan syndrome. *Nature genetics* 42, 27-29.

Clark, A.S., West, K., Streicher, S., and Dennis, P.A. (2002). Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* 1, 707-717.

Cohen, Y., Xing, M., Mambo, E., Guo, Z., Wu, G., Trink, B., Beller, U., Westra, W.H., Ladenson, P.W., and Sidransky, D. (2003). BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 95, 625-627.

Croce, C.M. (2008). Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 358, 502-511.

Dang, C.V. (1999). c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Molecular i cellular biology* 19, 1-11.

Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., *et al.* (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949-954.

Davies, L., and Welch, H.G. (2006). Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA* 295, 2164-2167.

Derry, W.B., Wilson, L., and Jordan, M.A. (1995). Substoichiometric binding of taxol suppresses microtubule dynamics. *Biochemistry* 34, 2203-2211.

Diaz-Cano, S.J. (2008). General morphological and biological features of neoplasms: integration of molecular findings. *Histopathology* 53, 1-19.

Diaz, L.A., Jr. (2005). The current clinical value of genomic instability. *Semin Cancer Biol* 15, 67-71.

Diggle, C.P., Bentley, J., Knowles, M.A., i Kiltie, A.E. (2005). Inhibition of double-strand break non-homologous end-joining by cisplatin adducts in human cell extracts. *Nucleic Acids Res* 33, 2531-2539.

Doyle, L., and Ross, D.D. (2003). Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 22, 7340-7358.

Enewold, L., Zhu, K., Ron, E., Marrogi, A.J., Stojadinovic, A., Peoples, G.E., and Devesa, S.S. (2009). Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980-2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, 784-791.

Eng, C., Mauer, A.M., Fleming, G.F., Bertucci, D., Rotmensch, J., Jacobs, R.H., and Ratain, M.J. (2001). Phase I study of pegylated liposomal doxorubicin, paclitaxel, and cisplatin in patients with advanced solid tumors. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 12, 1743-1747.

Esteva, F.J., Guo, H., Zhang, S., Santa-Maria, C., Stone, S., Lanchbury, J.S., Sahin, A.A., Hortobagyi, G.N., and Yu, D. (2010). PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *The American journal of pathology* 177, 1647-1656.

Falchook, G.S., Long, G.V., Kurzrock, R., Kim, K.B., Arkenau, T.H., Brown, M.P., Hamid, O., Infante, J.R., Millward, M., Pavlick, A.C., *et al.* (2012). Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 379, 1893-1901.

Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W., Comber, H., Forman, D., and Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 49, 1374-1403.

Ferni ez-Medarde, A., and Santos, E. (2011). Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer* 2, 344-358.

Frebourg, T., Barbier, N., Yan, Y.X., Garber, J.E., Dreyfus, M., Fraumeni, J., Jr., Li, F.P., and Friend, S.H. (1995). Germ-line p53 mutations in 15 families with Li-Fraumeni syndrome. *Am J Hum Genet* 56, 608-615.

Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and Gonzalez-Baron, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 30, 193-204.

Fridman, J.S., and Lowe, S.W. (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22, 9030-9040.

Fung, K.L., and Gottesman, M.M. (2009). A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochimica et biophysica acta* 1794, 860-871.

Furnari, F.B., Fenton, T., Bachoo, R.M., Mukasa, A., Stommel, J.M., Stegh, A., Hahn, W.C., Ligon, K.L., Louis, D.N., Brennan, C., *et al.* (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21, 2683-2710.

Fuster, J.J., Sanz-Gonzalez, S.M., Moll, U.M., and Andres, V. (2007). Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. *Trends Mol Med* 13, 192-199.

Garcia-Echeverria, C. (2010). Allosteric and ATP-competitive kinase inhibitors of mTOR for cancer treatment. *Bioorg Med Chem Lett* 20, 4308-4312.

Garcia-Rostan, G., Zhao, H., Camp, R.L., Pollan, M., Herrero, A., Pardo, J., Wu, R., Carcangiu, M.L., Costa, J., and Tallini, G. (2003). Ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol* 21, 3226-3235.

Giuffrida, D., and Gharib, H. (2000). Anaplastic thyroid carcinoma: current diagnosis and treatment. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 11, 1083-1089.

Gottesman, M.M., Fojo, T., and Bates, S.E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature reviews Cancer* 2, 48-58.

Grande, E., Diez, J.J., Zafon, C., and Capdevila, J. (2012). Thyroid cancer: molecular aspects and new therapeutic strategies. *J Thyroid Res* 2012, 847108.

Guertin, D.A., and Sabatini, D.M. (2007). Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer cell* 12, 9-22.

Haigh, P.I. (2000). Anaplastic thyroid carcinoma. Current treatment options in oncology 1, 353-357.

Haigis, K.M., Kendall, K.R., Wang, Y., Cheung, A., Haigis, M.C., Glickman, J.N., Niwa-Kawakita, M., Sweet-Cordero, A., Sebolt-Leopold, J., Shannon, K.M., *et al.* (2008). Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nature genetics* 40, 600-608.

Halachmi, N., Halachmi, S., Evron, E., Cairns, P., Okami, K., Saji, M., Westra, W.H., Zeiger, M.A., Jen, J., and Sidransky, D. (1998). Somatic mutations of the PTEN tumor suppressor gene in sporadic follicular thyroid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 23, 239-243.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Handra -Luca, A., Bilal, H., Bertri, J.C., and Fouret, P. (2003). Extra-cellular signal-regulated ERK-1/ERK-2 pathway activation in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma: association to aggressive tumor behavior and tumor cell proliferation. *The American journal of pathology* 163, 957-967.

Hanna, N.N., McGrath, P.C., Sloan, D.A., and Kenady, D.E. (1999). Advances in the pathogenesis and treatment of thyroid cancer. *Current opinion in oncology* 11, 42-47.

Harvey, J.J. (1964). An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice. *Nature* 204, 1104-1105.

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-299.

He, G., Kuang, J., Khokhar, A.R., and Siddik, Z.H. (2011). The impact of S- i G2-checkpoint response on the fidelity of G1-arrest by cisplatin and its comparison to a non-cross-resistant platinum(IV) analog. *Gynecologic oncology* 122, 402-409.

He, L., He, X., Lim, L.P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., *et al.* (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447, 1130-1134.

Hegedus, C., Ozvegy-Laczka, C., Apati, A., Magocsi, M., Nemet, K., Orfi, L., Keri, G., Katona, M., Takats, Z., Varadi, A., *et al.* (2009). Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties. *British journal of pharmacology* 158, 1153-1164.

Hennessy, B.T., Smith, D.L., Ram, P.T., Lu, Y., and Mills, G.B. (2005). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4, 988-1004.

Higgins, M.J., Forastiere, A., and Marur, S. (2009). New directions in the systemic treatment of metastatic thyroid cancer. *Oncology (Williston Park)* 23, 768-775.

Hou, P., Liu, D., Shan, Y., Hu, S., Studeman, K., Condouris, S., Wang, Y., Trink, A., El-Naggar, A.K., Tallini, G., *et al.* (2007). Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 1161-1170.

Hu, L., Hofmann, J., Lu, Y., Mills, G.B., and Jaffe, R.B. (2002). Inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase increases efficacy of paclitaxel in in vitro and in vivo ovarian cancer models. *Cancer research* 62, 1087-1092.

Huo, H.Z., Zhou, Z.Y., Wang, B., Qin, J., Liu, W.Y., and Gu, Y. (2014). Dramatic suppression of colorectal cancer cell growth by the dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD-2014. *Biochemical and biophysical research communications* 443, 406-412.

Huynh, H., Chow, P.K., and Soo, K.C. (2007). AZD6244 and doxorubicin induce growth suppression and apoptosis in mouse models of hepatocellular carcinoma. *Molecular cancer therapeutics* 6, 2468-2476.

Jancik, S., Drabek, J., Radzioch, D., and Hajduch, M. (2010). Clinical relevance of KRAS in human cancers. *J Biomed Biotechnol* 2010, 150960.

Jonker, J.W., Smit, J.W., Brinkhuis, R.F., Maliepaard, M., Beijnen, J.H., Schellens, J.H., and Schinkel, A.H. (2000). Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *Journal of the National Cancer Institute* 92, 1651-1656.

Kainthla, R., Kim, K.B., and Falchook, G.S. (2014). Dabrafenib for treatment of BRAF-mutant melanoma. *Pharmacogenomics and personalized medicine* 7, 21-29.

Karp, J.E., and Lancet, J.E. (2008). Tipifarnib in the treatment of newly diagnosed acute myelogenous leukemia. *Biologics : targets & therapy* 2, 491-500.

Kavallaris, M., Kuo, D.Y., Burkhart, C.A., Regl, D.L., Norris, M.D., Haber, M., and Horwitz, S.B. (1997). Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. *The Journal of clinical investigation* 100, 1282-1293.

Kent, W.D., Hall, S.F., Isotalo, P.A., Houlden, R.L., George, R.L., and Groome, P.A. (2007). Increased incidence of differentiated thyroid carcinoma and detection of subclinical disease. *CMAJ* 177, 1357-1361.

Kim, K.W., Hwang, M., Moretti, L., Jaboin, J.J., Cha, Y.I., and Lu, B. (2008). Autophagy upregulation by inhibitors of caspase-3 and mTOR enhances radiotherapy in a mouse model of lung cancer. *Autophagy* 4, 659-668.

Kirsten, W.H., Schauf, V., and McCoy, J. (1970). Properties of a murine sarcoma virus. *Bibl Haematol*, 246-249.

Kitamura, Y., Shimizu, K., Nagahama, M., Sugino, K., Ozaki, O., Mimura, T., Ito, K., Ito, K., and Tanaka, S. (1999). Immediate causes of death in thyroid carcinoma: clinicopathological analysis of 161 fatal cases. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84, 4043-4049.

Klampfer, L., Huang, J., Sasazuki, T., Shirasawa, S., and Augenlicht, L. (2004). Oncogenic Ras promotes butyrate-induced apoptosis through inhibition of gelsolin expression. *The Journal of biological chemistry* 279, 36680-36688.

Klugbauer, S., Demidchik, E.P., Lengfelder, E., and Rabes, H.M. (1998). Detection of a novel type of RET rearrangement (PTC5) in thyroid carcinomas after Chernobyl and analysis of the involved RET-fused gene RFG5. *Cancer Res* 58, 198-203.

Knudson, A.G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 820-823.

Kolasa, I.K., Rembiszewska, A., Janiec-Jankowska, A., Dansonka-Mieszkowska, A., Lewiowska, A.M., Konopka, B., and Kupryjanczyk, J. (2006). PTEN mutation, expression and LOH at its locus in ovarian carcinomas. Relation to TP53, K-RAS and BRCA1 mutations. *Gynecol Oncol* 103, 692-697.

Kolsch, V., Charest, P.G., and Firtel, R.A. (2008). The regulation of cell motility and chemotaxis by phospholipid signaling. *Journal of cell science* 121, 551-559.

Kumar, R., Angelini, S., Czene, K., Sauroja, I., Hahka-Kemppinen, M., Pyrhonen, S., and Hemminki, K. (2003). BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 9, 3362-3368.

Kurzrock, R., Albitar, M., Cortes, J.E., Estey, E.H., Faderl, S.H., Garcia-Manero, G., Thomas, D.A., Giles, F.J., Ryback, M.E., Thibault, A., *et al.* (2004). Phase II study of R115777, a farnesyl transferase inhibitor, in myelodysplastic syndrome. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22, 1287-1292.

Lancet, J.E., Gojo, I., Gotlib, J., Feldman, E.J., Greer, J., Liesveld, J.L., Bruzek, L.M., Morris, L., Park, Y., Adjei, A.A., *et al.* (2007). A phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in poor-risk and elderly patients with previously untreated acute myelogenous leukemia. *Blood* 109, 1387-1394.

Lee, E.Y., and Muller, W.J. (2010). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003236.

Legakis, I., and Syrigos, K. (2011). Recent advances in molecular diagnosis of thyroid cancer. *Journal of thyroid research* 2011, 384213.

Lemoine, N.R., Mayall, E.S., Wyllie, F.S., Williams, E.D., Goyns, M., Stringer, B., and Wynford-Thomas, D. (1989). High frequency of ras oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene* 4, 159-164.

Levine, A.J., Hu, W., and Feng, Z. (2006). The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* 13, 1027-1036.

Li, C., Lee, K.C., Schneider, E.B., and Zeiger, M.A. (2012). BRAF V600E mutation and its association with clinicopathological features of papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 97, 4559-4570.

Lin, S.F., Huang, Y.Y., Lin, J.D., Chou, T.C., Hsueh, C., and Wong, R.J. (2012). Utility of a PI3K/mTOR inhibitor (NVP-BEZ235) for thyroid cancer therapy. *PloS one* 7, e46726.

Liu, D., Liu, Z., Condouris, S., and Xing, M. (2007). BRAF V600E maintains proliferation, transformation, and tumorigenicity of BRAF-mutant papillary thyroid cancer cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92, 2264-2271.

Liu, Z., Hou, P., Ji, M., Guan, H., Studeman, K., Jensen, K., Vasko, V., El-Naggar, A.K., and Xing, M. (2008). Highly prevalent genetic alterations in receptor tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/akt and mitogen-activated protein kinase pathways in anaplastic and follicular thyroid cancers. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93, 3106-3116.

Loeb, L.A. (2001). A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 61, 3230-3239.

Loeb, L.A., Loeb, K.R., and Ierson, J.P. (2003). Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 776-781.

Longley, D.B., and Johnston, P.G. (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* 205, 275-292.

Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica* 114, 97-109.

MacKeigan, J.P., Collins, T.S., and Ting, J.P. (2000). MEK inhibition enhances paclitaxel-induced tumor apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 275, 38953-38956.

Manara, M.C., Nicoletti, G., Zambelli, D., Ventura, S., Guerzoni, C., Liuzzi, L., Lollini, P.L., Maira, S.M., Garcia-Echeverria, C., Mercuri, M., *et al.* (2010). NVP-BEZ235 as a new therapeutic option for sarcomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 530-540.

Marais, R., Light, Y., Paterson, H.F., Mason, C.S., and Marshall, C.J. (1997). Differential regulation of Raf-1, A-Raf, i B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem* 272, 4378-4383.

Marcus, A.I., Zhou, J., O'Brate, A., Hamel, E., Wong, J., Nivens, M., El-Naggar, A., Yao, T.P., Khuri, F.R., i Giannakakou, P. (2005). The synergistic combination of the farnesyl transferase inhibitor lonafarnib and paclitaxel enhances tubulin acetylation and requires a functional tubulin deacetylase. *Cancer research* 65, 3883-3893.

Marusyk, A., and Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta* 1805, 105-117.

Mason, C.S., Springer, C.J., Cooper, R.G., Superti-Furga, G., Marshall, C.J., and Marais, R. (1999). Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J* 18, 2137-2148.

McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Abrams, S.L., Lee, J.T., Chang, F., Bertri, F.E., Navolanic, P.M., Terrian, D.M., Franklin, R.A., D'Assoro, A.B., *et al.* (2006). Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Advances in enzyme regulation* 46, 249-279.

McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., *et al.* (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1263-1284.

McNamara, C.R., and Degterev, A. (2011). Small-molecule inhibitors of the PI3K signaling network. *Future medicinal chemistry* 3, 549-565.

Medeiros, B.C., Li au, H.J., Morrow, M., Lockerbie, R.O., Pitts, T., and Eckhardt, S.G. (2007). The farnesyl transferase inhibitor, tipifarnib, is a potent inhibitor of the MDR1 gene product, P-glycoprotein, and demonstrates significant cytotoxic synergism against human leukemia cell lines. *Leukemia* 21, 739-746.

Meinkoth, J.L. (2004). Biology of Ras in thyroid cells. *Cancer Treat Res* 122, 131-148.

Mendoza, M.C., Er, E.E., i Blenis, J. (2011). The Ras-ERK i PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in biochemical sciences* 36, 320-328.

Menges, C.W., and McCance, D.J. (2008). Constitutive activation of the Raf-MAPK pathway causes negative feedback inhibition of Ras-PI3K-AKT and cellular arrest through the EphA2 receptor. *Oncogene* 27, 2934-2940.

Milosevic, Z., Pesic, M., Stankovic, T., Dinic, J., Milovanovic, Z., Stojsic, J., Dzodic, R., Tanic, N., and Bankovic, J. (2014). Targeting RAS-MAPK-ERK i PI3K-AKT-mTOR signal transduction pathways to chemosensitize anaplastic thyroid carcinoma. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*.

Mimeault, M., Hauke, R., and Batra, S.K. (2008). Recent advances on the molecular mechanisms involved in the drug resistance of cancer cells and novel targeting therapies. *Clinical pharmacology and therapeutics* 83, 673-691.

Morris, S.M. (2002). A role for p53 in the frequency and mechanism of mutation. *Mutat Res* 511, 45-62.

Motoi, N., Sakamoto, A., Yamochi, T., Horiuchi, H., Motoi, T., and Machinami, R. (2000). Role of ras mutation in the progression of thyroid carcinoma of follicular epithelial origin. *Pathology, research i practice* 196, 1-7.

Moura, M.M., Cavaco, B.M., Pinto, A.E., Domingues, R., Santos, J.R., Cid, M.O., Bugalho, M.J., and Leite, V. (2009). Correlation of RET somatic mutations with clinicopathological features in sporadic medullary thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 100, 1777-1783.

Nagaiah, G., Hossain, A., Mooney, C.J., Parmentier, J., and Remick, S.C. (2011). Anaplastic thyroid cancer: a review of epidemiology, pathogenesis, and treatment. *Journal of oncology* 2011, 542358.

Namba, H., Rubin, S.A., and Fagin, J.A. (1990). Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Molecular endocrinology* 4, 1474-1479.

Ng, S.S.W., Tsao, M.S., Chow, S., and Hedley, D.W. (2000). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Cancer research* 60, 5451-5455.

Nicoletti, M.I., Myers, T.G., Fojo, T., and Blagosklonny, M.V. (2001). Wild-type p53 marginally induces endogenous MDR-1 mRNA without causing a measurable drug resistance in human cancer cells. *International journal of oncology* 18, 375-381.

Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.

Nucera, C., Nehs, M.A., Nagarkatti, S.S., Sadow, P.M., Mekel, M., Fischer, A.H., Lin, P.S., Bollag, G.E., Lawler, J., Hodin, R.A., *et al.* (2011). Targeting BRAFV600E with PLX4720 displays potent antimigratory and anti-invasive activity in preclinical models of human thyroid cancer. *Oncologist* 16, 296-309.

Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., and Sekiya, T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 2766-2770.

Pakos, E.E., and Ioannidis, J.P. (2003). The association of P-glycoprotein with response to chemotherapy and clinical outcome in patients with osteosarcoma. A meta-analysis. *Cancer* 98, 581-589.

Patel, K.N., and Shaha, A.R. (2006). Poorly differentiated and anaplastic thyroid cancer. *Cancer Control* 13, 119-128.

Payne, S.R., and Kemp, C.J. (2005). Tumor suppressor genetics. *Carcinogenesis* 26, 2031-2045.

Pellegriti, G., Frasca, F., Regalbuto, C., Squatrito, S., and Vigneri, R. (2013). Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *J Cancer Epidemiol* 2013, 965212.

Peters GJ, van der Wilt CL, van Moorsel CJ, Kroep JR, Bergman AM, Ackland SP. Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites. *Pharmacol Ther* 2000;87:227-253.

Phillips, B., Kalady, M., and Kim, R. (2010). BRAF testing in advanced colorectal cancer: is it ready for prime time? *Clinical advances in hematology & oncology : H&O* 8, 437-444.

Pikor, L., Thu, K., Vucic, E., and Lam, W. (2013). The detection and implication of genome instability in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 32, 341-352.

Podsypanina, K., Ellenson, L.H., Nemes, A., Gu, J., Tamura, M., Yamada, K.M., Cordon-Cardo, C., Catoretti, G., Fisher, P.E., and Parsons, R. (1999). Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1563-1568.

Powis, G., Bonjouklian, R., Berggren, M.M., Gallegos, A., Abraham, R., Ashendel, C., Zalkow, L., Matter, W.F., Dodge, J., Grindey, G., *et al.* (1994). Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer research* 54, 2419-2423.

Pratilas, C.A., and Solit, D.B. (2010). Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway:physiological feedback and drug response. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 3329-3334.

Quinlan, M.P., and Settleman, J. (2009). Isoform-specific ras functions in development and cancer. *Future oncology* 5, 105-116.

Quiros, R.M., Ding, H.G., Gattuso, P., Prinz, R.A., and Xu, X. (2005). Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations. *Cancer* 103, 2261-2268.

Ringel, M.D., Hayre, N., Saito, J., Saunier, B., Schuppert, F., Burch, H., Bernet, V., Burman, K.D., Kohn, L.D., and Saji, M. (2001). Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma. *Cancer Res* 61, 6105-6111.

Saad, A.G., Kumar, S., Ron, E., Lubin, J.H., Stanek, J., Bove, K.E., and Nikiforov, Y.E. (2006). Proliferative activity of human thyroid cells in various age groups and its correlation with the risk of thyroid cancer after radiation exposure. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 2672-2677.

Santarpia, L., El-Naggar, A.K., Cote, G.J., Myers, J.N., and Sherman, S.I. (2008). Phosphatidylinositol 3-kinase/akt i ras/raf-mitogen-activated protein kinase pathway mutations in anaplastic thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 278-284.

Satake, S., Sugawara, I., Watanabe, M., and Takami, H. (1997). Lack of a point mutation of human DNA topoisomerase II in multidrug-resistant anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *Cancer letters* 116, 33-39.

Sawka, A.M., Goldstein, D.P., Brierley, J.D., Tsang, R.W., Rotstein, L., Ezzat, S., Straus, S., George, S.R., Abbey, S., Rodin, G., *et al.* (2009). The impact of thyroid cancer and post-surgical radioactive iodine treatment on the lives of thyroid cancer survivors: a qualitative study. *PLoS One* 4, e4191.

Schubbert, S., Shannon, K., and Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 295-308.

Schumacher, U., Nehmann, N., Adam, E., Mukthar, D., Slotki, I.N., Horny, H.P., Flens, M.J., Schlegelberger, B., and Steinemann, D. (2012). MDR-1-overexpression in HT 29 colon cancer cells grown in SCID mice. *Acta histochemica* 114, 594-602.

Scotli i, K., Serra, M., Nicoletti, G., Vaccari, M., Manara, M.C., Nini, G., Liuzzi, L., Colacci, A., Bacci, G., Bertoni, F., *et al.* (1996). Multidrug resistance and malignancy in human osteosarcoma. *Cancer research* 56, 2434-2439.

Seront, E., Rottey, S., Sautois, B., Kerger, J., D'Hondt, L.A., Verschaeve, V., Canon, J.L., Dopchie, C., Vi enbulcke, J.M., Whenham, N., *et al.* (2012). Phase II study of everolimus in patients with locally advanced or metastatic transitional cell carcinoma of the urothelial tract: clinical activity, molecular response, and biomarkers. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 23, 2663-2670.

Serra, V., Markman, B., Scaltriti, M., Eichhorn, P.J., Valero, V., Guzman, M., Botero, M.L., Llonch, E., Atzori, F., Di Cosimo, S., *et al.* (2008). NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer research* 68, 8022-8030.

Seshadri, R., Leong, A.S., McCaul, K., Firgaira, F.A., Setlur, V., and Horsfall, D.J. (1996). Relationship between p53 gene abnormalities and other tumour characteristics in breast-cancer prognosis. *International journal of cancer Journal international du cancer* 69, 135-141.

Shafer, A., Zhou, C., Gehrig, P.A., Boggess, J.F., and Bae-Jump, V.L. (2010). Rapamycin potentiates the effects of paclitaxel in endometrial cancer cells through inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis. *International journal of cancer Journal international du cancer* 126, 1144-1154.

Shoman, N., Klassen, S., McFadden, A., Bickis, M.G., Torlakovic, E., and Chibbar, R. (2005). Reduced PTEN expression predicts relapse in patients with breast carcinoma treated by tamoxifen. *Modern pathology : an official journal of the United States i Canadian Academy of Pathology, Inc* 18, 250-259.

Shukla, S., MacLennan, G.T., Hartman, D.J., Fu, P., Resnick, M.I., and Gupta, S. (2007). Activation of PI3K-Akt signaling pathway promotes prostate cancer cell invasion. *International journal of cancer Journal international du cancer* 121, 1424-1432.

Simpson, L., and Parsons, R. (2001). PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 264, 29-41.

Singer, G., Oldt, R., 3rd, Cohen, Y., Wang, B.G., Sidransky, D., Kurman, R.J., and Shih Ie, M. (2003). Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 95, 484-486.

Sipos, J.A., and Mazzaferri, E.L. (2010). Thyroid cancer epidemiology and prognostic variables. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 22, 395-404.

Sippel, R.S., Kunnimalaiyaan, M., and Chen, H. (2008). Current management of medullary thyroid cancer. *Oncologist* 13, 539-547.

Smallridge, R.C., and Copland, J.A. (2010). Anaplastic thyroid carcinoma: pathogenesis and emerging therapies. *Clinical oncology* 22, 486-497.

Smilenov, L.B., Lieberman, H.B., Mitchell, S.A., Baker, R.A., Hopkins, K.M., and Hall, E.J. (2005). Combined haploinsufficiency for ATM and RAD9 as a factor in cell transformation, apoptosis, and DNA lesion repair dynamics. *Cancer Res* 65, 933-938.

Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Kempf, R.C., Long, J., Laidler, P., Mijatovic, S., Maksimovic-Ivanic, D., Stivala, F., Mazzarino, M.C., *et al* (2011). Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)* 3, 192-222.

Steelman, L.S., Pohnert, S.C., Shelton, J.G., Franklin, R.A., Bertri, F.E., and McCubrey, J.A. (2004). JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 18, 189-218.

Stites, E.C., Trampont, P.C., Ma, Z., and Ravichiran, K.S. (2007). Network analysis of oncogenic Ras activation in cancer. *Science* 318, 463-467.

Suarez, H.G., du Villard, J.A., Severino, M., Caillou, B., Schlumberger, M., Tubiana, M., Parmentier, C., and Monier, R. (1990). Presence of mutations in all three ras genes in human thyroid tumors. *Oncogene* 5, 565-570.

Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Stambolic, V., Elia, A.J., Sasaki, T., del Barco Barrantes, I., Ho, A., Wakeham, A., Itie, A., Khoo, W., *et al.* (1998). High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr Biol* 8, 1169-1178.

Taccaliti, A., Silvetti, F., Palmonella, G., and Boscaro, M. (2012). Anaplastic thyroid carcinoma. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3, 84.

Tada, M., Furuuchi, K., Kaneda, M., Matsumoto, J., Takahashi, M., Hirai, A., Mitsumoto, Y., Iggo, R.D., and Moriuchi, T. (2001). Inactivate the remaining p53 allele or the alternate p73? Preferential selection of the Arg72 polymorphism in cancers with recessive p53 mutants but not transdominant mutants. *Carcinogenesis* 22, 515-517.

Thomas, X., and Elhamri, M. (2007). Tipifarnib in the treatment of acute myeloid leukemia. *Biologics : targets & therapy* 1, 415-424.

Thorn, C.F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T.E., and Altman, R.B. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and genomics* 21, 440-446.

Tidyman, W.E., and Rauen, K.A. (2009). The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Current opinion in genetics & development* 19, 230-236.

- Tiwari, A.K., Sodani, K., Wang, S.R., Kuang, Y.H., Ashby, C.R., Jr., Chen, X., and Chen, Z.S. (2009). Nilotinib (AMN107, Tasigna) reverses multidrug resistance by inhibiting the activity of the ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP/MXR transporters. *Biochemical pharmacology* 78, 153-161.
- Vakiani, E., and Solit, D.B. (2011). KRAS i BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol* 223, 219-229.
- Vasko, V., Ferri , M., Di Cristofaro, J., Carayon, P., Henry, J.F., and de Micco, C. (2003). Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2745-2752.
- Vasko, V., Saji, M., Hardy, E., Kruhlak, M., Larin, A., Savchenko, V., Miyakawa, M., Isozaki, O., Murakami, H., Tsushima, T., *et al.* (2004). Akt activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. *Journal of medical genetics* 41, 161-170.
- Vega, F.J., Iniesta, P., Caldes, T., Sanchez, A., Lopez, J.A., de Juan, C., Diaz-Rubio, E., Torres, A., Balibrea, J.L., and Benito, M. (1997). p53 exon 5 mutations as a prognostic indicator of shortened survival in non-small-cell lung cancer. *British journal of cancer* 76, 44-51.
- Vega, F.M., and Ridley, A.J. (2008). Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS letters* 582, 2093-2101.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
- Waite, K.A., and Eng, C. (2002). Protean PTEN: form and function. *Am J Hum Genet* 70, 829-844.

Wallin, J.J., Guan, J., Prior, W.W., Edgar, K.A., Kassees, R., Sampath, D., Belvin, M., and Friedman, L.S. (2010). Nuclear phospho-Akt increase predicts synergy of PI3K inhibition and doxorubicin in breast and ovarian cancer. *Science translational medicine* 2, 48ra66.

Wan, P.T., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., Barford, D., *et al.* (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116, 855-867.

Wang, H.M., Huang, Y.W., Huang, J.S., Wang, C.H., Kok, V.C., Hung, C.M., Chen, H.M., and Tzen, C.Y. (2007). Anaplastic carcinoma of the thyroid arising more often from follicular carcinoma than papillary carcinoma. *Ann Surg Oncol* 14, 3011-3018.

Wang, T.H., Wang, H.S., Ichijo, H., Giannakakou, P., Foster, J.S., Fojo, T., and Wimalasena, J. (1998). Microtubule-interfering agents activate c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase through both Ras and apoptosis signal-regulating kinase pathways. *J Biol Chem* 273, 4928-4936.

Wang, Y., Hou, P., Yu, H., Wang, W., Ji, M., Zhao, S., Yan, S., Sun, X., Liu, D., Shi, B., *et al.* (2007). High prevalence and mutual exclusivity of genetic alterations in the phosphatidylinositol-3-kinase/akt pathway in thyroid tumors. *The Journal of clinical endocrinology i metabolism* 92, 2387-2390.

Watanabe, N., Okochi, E., Mochizuki, M., Sugimura, T., and Ushijima, T. (2001). The presence of single nucleotide instability in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 61, 7739-7742.

Weng, L.P., Gimm, O., Kum, J.B., Smith, W.M., Zhou, X.P., Wynford-Thomas, D., Leone, G., and Eng, C. (2001). Transient ectopic expression of PTEN in thyroid cancer cell lines induces cell cycle arrest and cell type-dependent cell death. *Hum Mol Genet* 10, 251-258.

Wolfman, J.C., and Wolfman, A. (2000). Endogenous c-N-Ras provides a steady-state anti-apoptotic signal. *The Journal of biological chemistry* 275, 19315-19323.

- Wu, G., Mambo, E., Guo, Z., Hu, S., Huang, X., Gollin, S.M., Trink, B., Ladenson, P.W., Sidransky, D., and Xing, M. (2005). Uncommon mutation, but common amplifications, of the PIK3CA gene in thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* *90*, 4688-4693.
- Xing, M. (2005). BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* *12*, 245-262.
- Xing, M. (2010). Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* *20*, 697-706.
- Xu, N., Lao, Y., Zhang, Y., and Gillespie, D.A. (2012). Akt: a double-edged sword in cell proliferation and genome stability. *Journal of oncology* *2012*, 951724.
- Xu, R., Sato, N., Yanai, K., Akiyoshi, T., Nagai, S., Wada, J., Koga, K., Mibu, R., Nakamura, M., and Katano, M. (2009). Enhancement of paclitaxel-induced apoptosis by inhibition of mitogen-activated protein kinase pathway in colon cancer cells. *Anticancer research* *29*, 261-270.
- Yamada, K.M., and Araki, M. (2001). Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci* *114*, 2375-2382.
- Yang, Q., and Guan, K.L. (2007). Exploiting mTOR signaling. *Cell research* *17*, 666-681.
- Yu, Z., Fotouhi-Ardakani, N., Wu, L., Maoui, M., Wang, S., Banville, D., and Shen, S.H. (2002). PTEN associates with the vault particles in HeLa cells. *The Journal of biological chemistry* *277*, 40247-40252.
- Yuan, T.L., and Cantley, L.C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* *27*, 5497-5510.
- Zaytseva, Y.Y., Valentino, J.D., Gulhati, P., and Evers, B.M. (2012). mTOR inhibitors in cancer therapy. *Cancer letters* *319*, 1-7.

Zheng LS, Wang F, Li YH, Zhang X, Chen LM, Liang YJ, Dai CL, Yan YY, Tao LY, Mi YJ, Yang AK, To KK, Fu LW. Vandetanib (Zactima, ZD6474) antagonizes ABCC1- and ABCG2-mediated multidrug resistance by inhibition of their transport function. PLoS One 2009;4:e5172.

Zhou, Y., Zhen, H., Mei, Y., Wang, Y., Feng, J., Xu, S., and Fu, X. (2009). PI3K/AKT mediated p53 down-regulation participates in CpG DNA inhibition of spontaneous B cell apoptosis. Cell Mol Immunol 6, 175-180.

Zurita, A.J., Diestra, J.E., Condom, E., Garcia Del Muro, X., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Perez, J., Germa-Lluch, J.R., and Izquierdo, M.A. (2003). Lung resistance-related protein as a predictor of clinical outcome in advanced testicular germ-cell tumours. British journal of cancer 88, 879-886.

BIOGRAFIJA

Zorica Milošević je rođena 14.02.1985. godine u Kotoru, u Crnoj Gori. Osnovnu i srednju školu završila je u Herceg Novom. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2003. godine, a diplomirala je 2008. godine na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija sa srednjom ocenom 9,43. Doktorske studije je upisala 2009. godine na smeru Biologija (Modul Genetika) na Biološkom fakultetu. Na odeljenju za neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” radi od maja 2010. godine kao stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj a zaposlena je od juna 2012. godine. Eksperimentalni deo doktorske disertacije Zorice Milošević urađen je u laboratoriji za molekularnu neurobiologiju, u okviru naučno-istraživačkih projekata #143009 Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj i III41031 Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj. U svom dosadašnjem radu Zorica Milošević je učestvovala sa jednim kongresnim saopštenjem na naučnim skupovima međunarodnog značaja i sa jednim kongresnim saopštenjem na skupovima domaćeg značaja. Zorica Milošević je autor dva naučna rada objavljena u časopisima međunarodnog značaja i koautor još 4 rada objavljenih u časopisima međunarodnog značaja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Зорица Милошевић

број индекса Б3501/2009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Улога mTOR и MAPK сигналних путева у резистенцији карцинома штитасте

жлезде на хемиотерапију

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 31.11.2014. године

Зорица Милошевић

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Зорица Милошевић

Број индекса Б3501/2009

Студијски програм Биологија

Наслов рада Улога mTOR и MAPK сигналних путева у резистенцији карцинома
штитасте жлезде

Ментор др Марина Стаменковић-Радак и др Јасна Банковић

Потписани/а Зорица Милошевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 31.11.2014. године

Зорица Милошевић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Улога mTOR и MAPK сигналних путева у резистенцији карцинома штитасте

жлезде на хемиотерапију

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

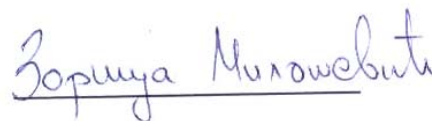
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- ☒ 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 31.11.2014. године



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.