Mutacije u promotorskoj regiji gena TERT u diferenciranom karcinomu štitnjače

Nižetić, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:049353

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Mutacije u promotorskoj regiji gena *TERT* u diferenciranom karcinomu štitnjače

Mia Nižetić

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen na Klinici za nuklearnu medicinu i onkologiju KBC Sestre milosrdnice pod vodstvom doc. dr. sc. Ivana Šamije te suvoditeljstvom izv. prof. dr. sc. Petre Korać. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Zahvaljujem se svom voditelju diplomskog rada doc. dr. sc. Ivanu Šamiji i suvoditeljici izv. prof. dr. sc. Petri Korać, na izdvojenom vremenu, strpljivosti, pomoći i savjetima tijekom provedbe i pisanja ovog diplomskog rada.

Od srca hvala svima koji su mi pružali podršku, ljubav i razumijevanje tijekom ovog akademskog putovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Mutacije u promotorskoj regiji gena *TERT* u diferenciranom karcinomu štitnjače

Mia Nižetić
Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U diferenciranom karcinomu štitnjače učestale su mutacije u promotoru gena *hTERT*. Mutacije utječu na razvoj i progresiju karcinoma. Dvije najučestalije mutacije u promotoru su c.124C>T (C228T) i c.146C>T (C250T). Mutacije c.124C>T (C228T) i c.146C>T (C250T) dovode do stvaranja novog mjesta vezanja za transkripcijske faktore ETS što dovodi do pojačane ekspresije gena *hTERT*. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učestalost mutacija c.124C>T i c.146C>T u hrvatskoj populaciji bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače i odrediti postoji li povezanost prisutnosti mutacija c.124C>T i c.146C>T s demografskim (dob, spol) i kliničkim (proširenost bolesti) karakteristikama bolesnika. Sangerovom metodom sekvenciranja određena je prisutnost mutacija u promotorskoj regiji gena *hTERT* u 72 uzorka. Učestalost *hTERT* mutacija u uzorku od 72 ispitanika je bila 9,7%. Prisutnost mutacije bila je češća kod muškaraca starije životne dobi te je uočena povezanost prisutnosti mutacije s metastatskom proširenosti bolesti. Udio bolesnika s udaljenim metastazama bio je veći među bolesnicima s mutacijom (43%) nego među bolesnicima bez mutacije (18%).

(34 stranice, 9 slika, 4 tablice, 44 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: *hTERT*, karcinom štitnjače, sekvenciranje
Voditelj: doc. dr. sc. Ivan Šamija
Suvoditelj: izv. prof. dr. sc. Petra Korać
Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Petra Korać
izv. prof. dr. sc. Ana Galov
doc. dr. sc. Sunčica Bosak
Zamjena: izv. prof. dr. sc. Inga Marijanović
Rad prihvaćen: 18. 06. 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

TERT promoter mutations in differentiated thyroid carcinoma

Mia Nižetić

Rooseveltov Trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

TERT promoter mutations are common in differentiated thyroid carcinoma. Mutations affect the development and progression of carcinoma. The two most common mutations in *hTERT* promoter are c.124C>T (C228T) i c.146C>T (C250T). These mutations create new binding site for ETS transcription factors leading to enhanced *hTERT* expression. The aim of this study was to determine the frequency of c.124C>T and c.146C>T mutations in the Croatian population of patients with differentiated thyroid carcinoma and to determine if there is association between the presence of mutations with demographic (age, gender) and clinical (disease prevalence) characteristics of the patients. The presence of mutations in the promoter region of *hTERT* gene was determined by sequencing of 72 samples with Sanger method. The frequency of *hTERT* mutations in 72 samples was 9,7%. The presence of the mutations was more common in older men and it was observed that the presence of the mutation was associated with metastatic prevalence. The proportion of patients with distant metastases was higher among patients with mutation (43%) than among patients without mutation (18%).

(34 pages, 9 figures, 4 tables, 44 references, original in: Croatian)
Thesis deposited in the Central Biological Library
Key words: *hTERT*, thyroid carcinoma, sequencing
Supervisor: Ivan Šamija, PhD Assoc. Prof.
Cosupervisor: Korać Petra, PhD, Assoc. Prof.
Reviewers: Korać Petra, PhD, Assoc. Prof.
Galov Ana, PhD, Assoc. Prof.
Bosak Sunčica, PhD, Asst. Prof.
Substitute: Inga Marijanović, PhD, Assoc. Prof.
Thesis accepted: 18. 06. 2020.

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. Telomeraza 1
1.1.1. Telomere i uloga telomeraze 1
1.1.2. Građa i funkcija proteina TERT 2
1.1.3. Gen *hTERT* i njegov promotor 4
1.1.4. Regulacija gena i proteina hTERT 5
1.2. TERT i maligni tumori 9
1.2.1. Telomeraza i maligni tumori 9
1.2.2. Mehanizmi aktivacije gena *hTERT* u stanicama malignih tumora 9
1.2.3. Uloga gena i proteina hTERT u nastanku i progresiji malignih tumora 11
1.3. Gen *hTERT* i karcinom štitnjače 12
1.3.1. Karcinogeneza 12
1.3.2. Mutacije u promotorskoj regiji gena *TERT* u karcinomu štitnjače 13
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 15
3. MATERIJALI I METODE 16
3.1. Ispitanici 16
3.2. Uzorci 16
3.3. Izolacija DNA 16
3.4. Određivanje koncentracije i čistoće DNA 17
3.5. Lančana reakcija polimerazom 17
3.6. Elektroforeza u agaroznom gelu 19
3.7. Reakcija sekvenciranja 19
3.8. Analiza rezultata sekvenciranja 19
3.9. Statistička obrada 19
4. REZULTATI 21
4.1. Struktura ispitanika 21
4.2. Mutacije u promotorskoj regiji gena *hTERT* 22
4.3. Mutacije i spol 23
4.4. Mutacije i dob 23
4.5. Mutacije i metastatska proširenost bolesti 24
5. RASPRAVA 26
6. ZAKLJUČCI 29
7. LITERATURA 30
8. ŽIVOTOPIS 34

POPIS KRATICA:

TERT	telomerazna reverzna transkriptaza (prema engl. *telomerase reverse transcriptase*)
TRF1	telomerni ponavljajući faktor 1 (prema engl. *telomeric repeat factor 1*)
TRF2	telomerni ponavljajući faktor 2 (prema engl. *telomeric tepeat factor 2*)
POT1	telomerni zaštitni protein 1 (prema engl. *protection of telomeres 1*)
TIN2	TRF1 i TRF2-jezgrin vezujući protein 2 (prema engl. *TRF1- and TRF2- interacting nuclear protein 2*)
TPP1	Tripeptidil peptidaza 1 (prema engl. *Tripeptydil peptidase 1*)
RAP1	represor/aktivator protein 1 (prema engl. *Repressor / Activator Protein 1*)
TERC	telomerazna RNA komponenta (prema engl. *telomerase RNA component*)
ALT	alternativno prekrajanje telomera (prema engl. *Alternative lengthening of telomeres*)
TEN	TERT N-terminalna domena (prema engl. *TERT essential N-terminal domain*)
TRBD	domena vezanja TERT RNA (prema engl. *TERT RNA binding domain*)
TR	telomerazna RNA (prema engl. *Telomerase RNA*)
RT	reverzna transkriptaza (prema engl. *Reverse transcriptase*)
IFD	domena umetanja prsta (prema engl. *Insertion finger domain*)
CTCF	faktor vezanja regije CCCTC (prema engl. *CCCTC-binding factor*)
TGFβ	tumorski faktor rasta β (prema engl. *Tumor growth factor β*)
WHO	Svjetska Zdravstvena Organizacija (prema engl. *World health organisation*)
ETS	(prema engl. *E-twenty six*)
GABP	protein koji veže GA (prema engl. *GA binding protein*)
NF-κB	(prema engl. *nuclear factor kappa*-light-chain-enhancer of activated *B* cells)

SNP	polimorfizam jednog nukleotida (prema engl. *single-nucleotide polymorphism*)

1. UVOD

1.1. Telomeraza

1.1.1. Telomere i uloga telomeraze

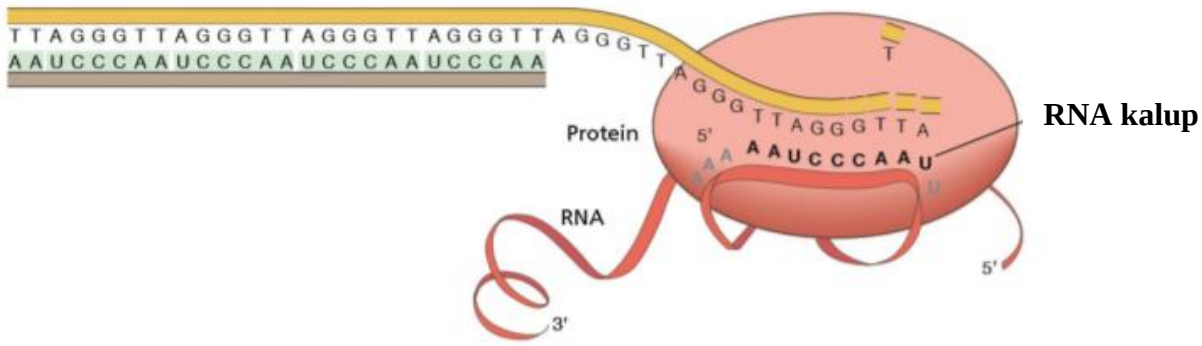
Muller i McClintock su 1930. godine otkrili postojanje specifičnih uzastopnih ponavljajućih sekvenci na krajevima kromosoma te su ih nazvali telomere (Pestana i sur., 2017). Telomere su građene od gvaninom bogatih, nekodirajućih ponavljajućih 5'-TTAGGG-3' sljedova i proteinskog kompleksa nazvanog šelterin (*shelterin*). Krajnji sljedovi nukleotida bogati gvaninom formiraju D-omču i štite krajeve linearnih kromosoma od mehanizama popravka dvolančanih lomova (Shammas, 2011). Telomere kod ljudi su građene od 10-15 kb dvolančanih ponavljajućih sljedova i završavaju s jednolančanim 3'-krajem, veličine oko 150-200 pb. Jednolančani 3'-krajevi tvore T-petlju koji štiti genomsku DNA od oštećenja tijekom diobe stanice (Wang i Feigon, 2017). Šelterin se sastoji od šest proteina. Proteini TRF1 i TRF2 se vežu na dvolančane sljedove TTAGGG dok protein POT1 prepoznaje i veže se na jednolančane sljedove TTAGGG na 3'-kraju. Ovi proteini su međusobno povezani dodatnim proteinima, TIN2, TPP1 i RAP1, te tvore kompleks bitan za stabilizaciju genoma i održavanje integriteta kromosoma (Chen, 2019).

Hayflick je 1965. godine uočio da ljudske stanice u kulturi imaju ograničen životni vijek. Uočio je da se stanice mogu podijeliti 40-60 puta tijekom života. Ograničen broj dioba nazvan je Hayflickov limit (Klingelhutz, 1999). Tijekom svake diobe u somatskoj stanici telomere se skraćuju za 50-200 baza te nakon nekog vremena postaju prekratke i blokiraju diobu stanice (Shay i Wright, 2011). Ova pojava se naziva senescencija i dovodi do zastoja staničnog ciklusa u G1 fazi. Zaustavljanje staničnog ciklusa u G1 fazi rezultat je djelovanja tumor-supresorskog proteina p53 (Liu i sur., 2013).

Kako bi izbjegle smrt uzrokovanu skraćivanjem telomera, stanice su razvile mehanizme stabilizacije i produživanja telomera što dovodi do imortalizacije i neograničene replikacije.

Glavnu ulogu u regulaciji duljine telomera ima telomeraza. Telomeraza je DNA polimeraza ovisna o RNA koja produljuje 3'-krajeve kromosoma sintetizirajući kopije DNA telomernih ponavljajućih sljedova DNA i stabilizira genom. Prvi put je otkrivena 1985. godine kod vrste *Tetrahymena thermophila*. Telomeraza je inaktivna kod većine somatskih stanica, a aktivna kod tumorskih, matičnih i spolnih stanica (Wang i Feigon, 2017).

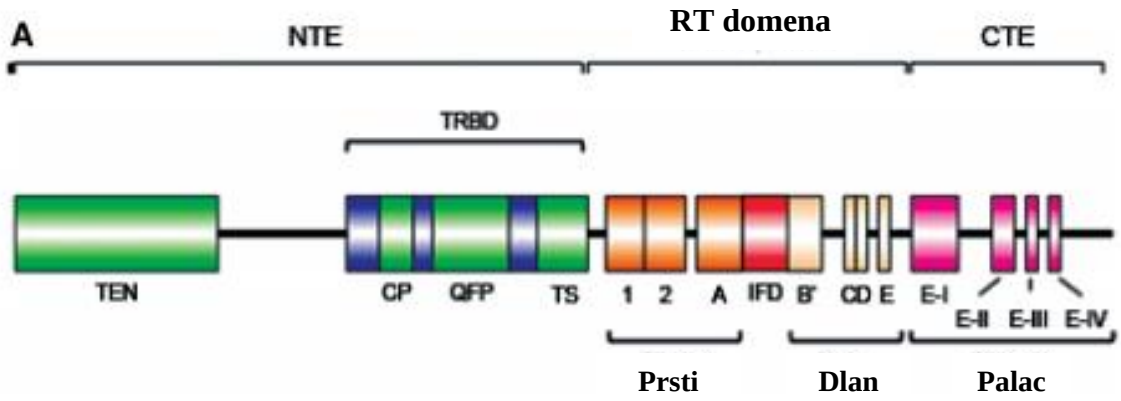
Telomeraza je građena od nekodirajuće RNA koja se kod ljudi naziva hTERC (od engl. *human telomerase RNA component)* i služi kao kalup za telomernu sintezu DNA i od katalitičke podjedinice koja djeluje kao reverzna transkriptaza i kod ljudi se naziva hTERT (od engl. *human telomerase reverse transcriptase*). *hTERC* je visoko eksprimiran u svim tkivima bez obzira na telomeraznu aktivnost dok je *hTERT* eksprimiran u oko 1-5 kopija po stanici. Aktivnost telomeraze ovisi o ekspresiji *hTERT* podjedinice (Cong, Wright i Shay, 2002).
Osim telomeraze, kod ljudskih tumora otkriveno je postojanje drugog mehanizma produljivanja telomera, mehanizma ALT (od engl. *alternative lengthening of telomeres*). Kod stanica kod kojih je aktivan mehanizam ALT uočen je izostanak ekspresije gena *hTERT*. Istraživanja su pokazala da mehanizam ALT uključuje replikaciju DNA posredovanu homolognom rekombinacijom (Cesare i Reddel, 2013).



Slika 1. Ilustracija djelovanja telomeraze kao DNA polimeraze ovisne o RNA koja sintetizira 3'-krajeve DNA. (Preuzeto i prilagođeno prema Verhoeven i sur., 2014).

1.1.2. Građa i funkcija proteina TERT

RNA podjedinica (TERC) i katalitički protein TERT čine katalitičku jezgru telomeraze.
TERT se sastoji od tri glavna strukturna elementa: dugog N-terminalnog produžetka (NTE), centralne katalitičke RT-domene i kratkog C-terminalnog produžetka (CTE).



Slika 2. Linearna struktura proteina TERT. (Preuzeto i prilagođeno prema Wyatt i sur., 2010).

N-terminalni produžetak sadrži dvije domene, domenu TEN (od engl. *telomerase essential N-terminal domain*) i domenu TRBD (od engl. *telomerase RNA binding domain*) (Wang i Feigon, 2017). Obje domene imaju ulogu u vezivanju za jednolančanu nukleinsku kiselinu. Između ove dvije domene nalazi se duga vezna (engl. *linking*) regija koja je važna za konformacijsku fleksibilnost holoenzima. N-terminalni produžetak također sadrži nekoliko specifičnih motiva poput motiva CP, QFP i TS koji su bitni za interakciju TERT-a sa TERC (Wyatt, West i Beattie, 2010).

Regija TRBD je građena od dvije asimetrične podjedinice koje sadrže ostatke motiva CP i TS. Te dvije podjedinice su povezane petljama koje održavaju fleksibilnost proteina (Schmidt i Cech, 2015). Hidrofilni i hidrofobni CP i TS ostatci na površini domene tvore utor za vezanje RNA. U tom utoru nalazi se hidrofilni džep koji veže dvolančanu RNA i obližnji hidrofobni džep koji veže jednolančanu RNA. RNA-vezujući utor se nalazi blizu aktivnog mjesta enzima (Wyatt, West i Beattie, 2010).

N-terminalna domena TEN u TERT-u ima veliki afinitet vezanja za jednolančanu DNA i sadrži ostatke koji su esencijalni za telomeraznu aktivnost. Domena TEN ima važnu ulogu u prepoznavanju DNA i elongaciji. Domene TEN i TRBD djeluju na način da osiguravaju specifično vezanje TERT-a za TERC i optimalni položaj RNA kalupa tijekom telomerazne aktivnosti (Wang i Feigon, 2017).

RT-domena je katalitička domena TERT-a. Organizirana je u dvije poddomene koje nalikuju na prste i dlan. Ove subdomene su povezane petljom koja se veže za RNA-DNA hibrid i 3'-kraj jednolančane DNA te se pretpostavlja da je važna za smještanje 3' –kraja DNA u aktivno mjesto enzima.

RT-domena ima i domenu IFD (od engl. *insertion in fingers domain*). Domena IFD se nalazi između A i B' motiva. Sastoji se od dvije antiparalelne α-uzvojnice koji se nalaze između gore spomenutih poddomena koje nalikuju na prste i dlan te je uključena u intramolekularnu protein-protein interakciju i sudjeluje u stabilizaciji ove domene. Mutacije koje mijenjaju strukturu domene IFD mijenjaju interakcije protein-DNA i RNA-DNA čime se smanjuje aktivnost samog enzima (Wang i Feigon, 2017).

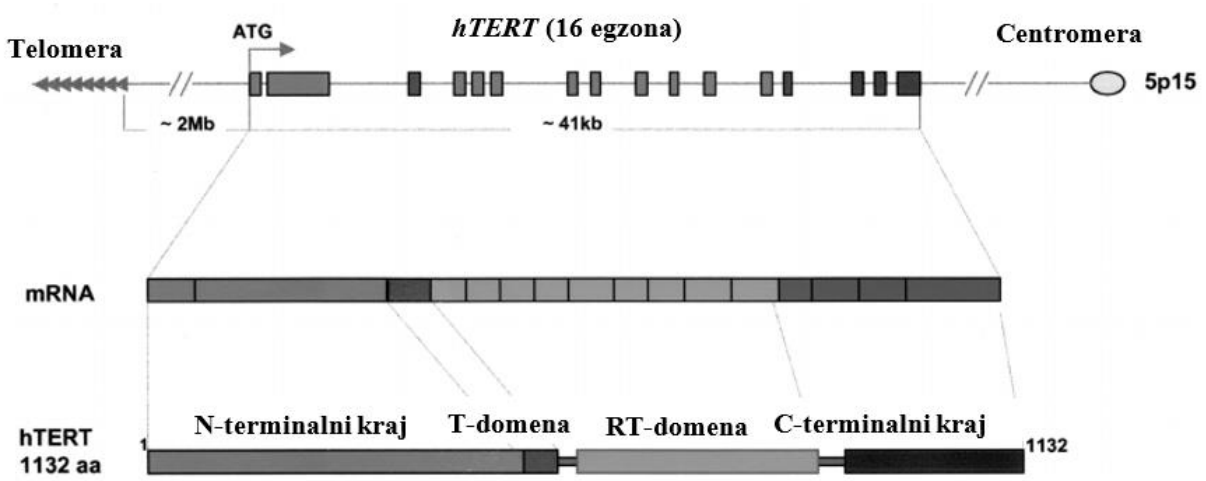
U aktivnom mjestu enzima TERT nalaze se tri asparaginske kiseline od kojih se jedna nalazi u motivu A, a druge dvije u motivu C. Ove tri aminokiseline tvore katalitičku trijadu koja uz pomoć dva metalna iona ima ulogu u dodavanju nukleotida. U slučaju supstitucije asparaginskih kiselina alaninom dolazi do gubitka telomerazne aktivnosti. (Wyatt, West i Beattie, 2010).

C-terminalni produžetak predstavlja domenu telomeraze koja nalikuje na palac. Ima helikalnu strukturu koja sadrži nekoliko površinskih petlji koje pomažu u stvaranju i stabilizaciji RNA-DNA heterodupleksa u enzimskom aktivnom mjestu. Mutacije u ovoj regiji utječu na aktivnost telomeraze i njezinu staničnu lokalizaciju. Također je pokazano da dodatak epitopnog biljega na C-terminalni kraj TERT-a ukida telomernu elongaciju *in vivo*, što ukazuje na to da je ova regija bitna za funkciju telomeraze (Wyatt, West i Beattie, 2010).

1.1.3. Gen *hTERT* i njegov promotor

Gen *hTERT* je dug 40kb i smješten je na p-kraku kromosoma 5 (5p15.33). Sadrži 16 egzona i 15 introna. Udaljen je oko 1,2 Mb od telomere, te je smješten u kromatinskoj domeni koja je otporna na nukleaznu aktivnost (Jafri i sur., 2016). Promotor *hTERT* je najvažniji element za regulaciju ekspresije telomeraze. Obuhvaća regiju koja se nalazi 330 pb uzvodno i 37 pb nizvodno od početnog mjesta transkripcije, mjesta ATG (Daniel, Peek i Tollefsbol, 2012). Promotorska regija je bogata GC-nukleotidima i E-kutijama, nema TATA i CAAT-slogove, ali sadrži brojna mjesta za vezanje različitih transkripcijskih faktora što ukazuje na to da je transkripcija *hTERT* regulirana različitim faktorima, kako aktivatorima i represorima tako i epigenetičkim faktorima (Jafri i sur., 2016). Jezgra promotorske regije koja obuhvaća 260 pb odgovorna je za veći dio transkripcijske aktivnosti gena *hTERT*. Ona sadrži najmanje pet GC kutija (GGGCGG) koje su vezna mjesta za transkripcijski faktor Sp1. Ove GC kutije su smještene između E-kutija, 110 pb uzvodno od početnog mjesta transkripcije. Jezgra promotorske regije gena *hTERT* sadrži i dvije E-kutije (5'-CACGTG-3') koje su vezna mjesta za nekoliko proteina pojačivača kao što je c-Myc, te represora kao što je MAD1. Ta vezna

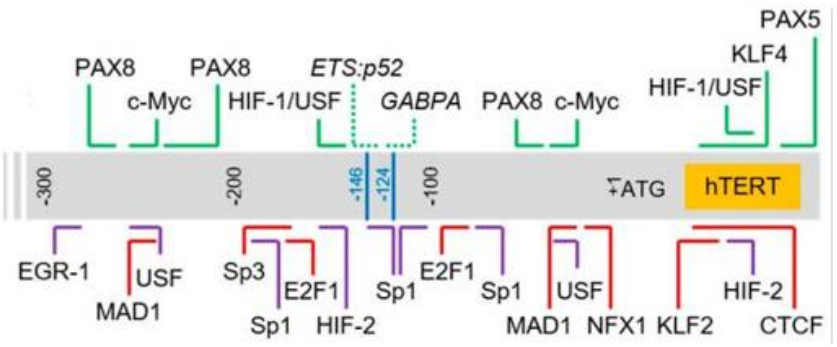
mjesta se nalaze na -165 i +44 mjestu nukleotidne sekvence gena *hTERT* s obzirom na početno mjesto transkripcije (Cong, Wright i Shay, 2002). Postoji nekoliko različitih mRNA transkripta gena *hTERT*. Među njima su transkript pune duljine, α transkript kojemu nedostaje 36 nukeotida s 5'-kraja egzona 6, β transkript kojemu nedostaje egzon 7 i egzon 8 i još mnogi drugi. Svi ovi transkripti eksprimirani su tijekom ljudskog razvoja, ali samo transkript pune duljine ima ulogu u telomeraznoj aktivnosti (Yuan, Larsson i Xu, 2019).



Slika 3. Organizacija gena *hTERT,* mRNA i proteina hTERT. (Preuzeto i prilagođeno prema Cong, Wright i Shay, 2002).

1.1.4. Regulacija gena i proteina hTERT

Telomerazna aktivnost je regulirana na više različitih molekularnih razina uključujući transkripciju, mRNA alternativno prekrajanje, te posttranslacijske modifikacije hTERC i hTERT (Leao i sur., 2018). Međutim, dokazano je da telomerazna aktivnost ponajviše ovisi o transkripciji gena *hTERT*. Budući da je hTERT jedina komponenta telomeraze koja nije uvijek eksprimirana, aktivnost telomeraze je povezana s njezinom ekspresijom. Veliki broj transkripcijskih faktora imaju svoja vezna mjesta u promotorskoj regiji gena *hTERT*. Ekspresija gena *hTERT* je kod zdravih stanica suprimirana vezanjem represora dok je kod tumorskih stanica pojačana vezanjem aktivatora (Ramlee i sur., 2016).



Slika 4. Shematski prikaz mjesta vezanja transkripcijskih faktora za promotor *hTERT*. (Preuzeto sa Ramlee i sur., 2016).

Ekspresija *hTERT* je regulirana pomoću transkripcijskih faktora koji se vežu na određena mjesta u promotoru te djeluju kao aktivatori ili kao represori (Daniel, Peek i Tollefsbol, 2012).

Aktivatori

Postoje brojni aktivatori gena *hTERT* koji mogu biti transkripcijski faktori (npr. Sp1), onkogeni (npr. *c-Myc*) i hormoni.

c-Myc je onkogen koji kod zdravih stanica ima ulogu u poticanju proliferacije, diferencijacije i apoptoze (Daniel, Peek i Tollefsbol, 2012). C-Myc dimerizira sa proteinom Max iz obitelji proteina Myc te se veže na E-kutije u promotoru gena *hTERT* što dovodi do njegove povećane ekspresije i aktivacije telomeraze. Nakupljanjem mutacija u veznim mjestima za c-Myc, slabi ekspresija samog gena *hTERT* (Khattar i Tergaonkar, 2017). U slučaju prekomjerne ekspresije gena *c-myc* zbog amplifikacije, translokacije ili mutacije dolazi do pojačana ekspresije gena *hTERT* što dovodi do aktivacije telomerazne aktivnosti, imortalizacije stanica i nemogućnosti zaustavljanja staničnog ciklusa (Ramlee i sur., 2016).

Sp1 je transkripcijski faktor koji se veže na GC-kutiju u promotoru gena *hTERT*. Promotorska regija gena *hTERT* ne sadrži TATA-slog te je Sp1 odgovoran za aktivaciju transkripcije gena vezanjem na GC-kutiju. Sp1 također stupa u interakciju s molekulama kao što je protein koji veže sekvencu TATA koji inače ima ulogu u aktivaciji transkripcije, da bi se na taj način potaknula transkripcija gena koji nemaju TATA-slog (Cong, Wright i Shay, 2002). Nepoznat je mehanizam na koji način Sp1 dovodi do pojačane transkripcije, ali je uočeno da mutacija u mjestu vezanja za Sp1 drastično smanjuje aktivnost *hTERT* promotora (Ramlee i sur., 2016).

Steroidni hormoni mogu regulirati telomeraznu aktivnost (Daniel, Peek i Tollefsbol, 2012). Telomerazna aktivnost uočena je kod ljudskog endometrija tijekom menstrualnog ciklusa što je

povezano s proliferativnom aktivnošću stanica endometrija. Analiziranjem *hTERT* promotora otkrivena su dva potencijalna elementa za vezanje estrogenskih receptora, te je dokazano da estrogen potiče transkripciju gena *hTERT* i staničnu proliferaciju. Nasuprot tome, progesteron je hormon koji inhibira proliferaciju stanica aktiviranu estrogenom te se progesteron zbog toga koristi u liječenju tumora s receptorima estrogena (Ramlee i sur., 2016).

Represori

Za manjak telomerazne aktivnosti u normalnim tjelesnim stanicama odgovorni su faktori koji suprimiraju transkripciju gena *hTERT*. Dok je kod tumorskih stanica ekspresija represora gena *hTERT* utišana, u normalnim stanicama postoji nekoliko gena koji kodiraju za transkripcijske represore *hTERT*-a (Ramlee i sur., 2016). Neki od represora su Mad1, faktor koji veže CCCTC regiju, Sp3, p53, pRb i WT1.

Mad1 je član mreže transkripcijskih faktora c-Myc/Max/Mad čija je uloga kontrola normalnog staničnog rasta i razvoja te regulacija različitih staničnih procesa poput stanične transformacije, diferencijacije i apoptoze (Cong, Wright i Shay, 2002). Mad1 je antagonist proteina Myc koji se veže na E-kutije. Mad1 se može vezati za protein Max te tvoriti heterodimer koji se potom veže na E-kutiju i suprimira transkripciju gena *hTERT*. S druge strane, heterodimer c-Myc/Max djeluje kao aktivator transkripcije. Ekspresija c-Myc je povećana kod tumorskih stanica dok je ekspresija Mad1 niska (Ramlee i sur., 2016).

Faktor koji veže CCCTC regiju (CTCF) je protein koji se veže na prvi egzon u genu *hTERT* i djeluje kao negativni regulator transkripcije (Leao i sur., 2018). CTCF utišava ekspresiju aktivatora c-Myc tako da regulira njegovu metilaciju (Daniel, Peek i Tollefsbol, 2012).

Sp3 je protein koji se veže na GC-kutije u promotoru. On je antagonist proteina Sp1. Sp3 se veže na GC-kutije i suprimira ekspresiju gena *hTERT*. Istraživanja su pokazala da vezanje Sp3 za proksimalnu promotorsku regiju gena *hTERT* dovodi do regrutacije histonske deacetilaze (HDAC). HDAC potom epigenetički modificira promotorsku regiju što dovodi do utišavanja gena *hTERT* (Ramlee i sur., 2016).

p53 je tumor supresorski protein koji djeluje kao transkripcijski faktor te regulira gene uključene u regulaciju staničnog ciklusa, diferencijaciju i apoptozu (Cong, Wright i Shay, 2002). U 50% tumora p53 je inaktivan. Prethodna istraživanja su utvrdila da p53 inhibira telomeraznu aktivnost na način da suprimira transkripciju gena *hTERT*. Gen *hTERT* ima dva vezna mjesta za p53 uzvodno od 5'-promotorske jezgre, te njegovo vezanje za promotor uz pomoć transkripcijskog faktora Sp1 suprimira promotor *hTERT* (Ramlee i sur., 2016).

pRb također suprimira transkripciju gena *hTERT*. pRb veže transkripcijske faktore E2F te zaustavlja stanični ciklus. pRb je aktivan kada je hipofosforiliran, a inaktivan kada je fosforiliran. Hipofosforilirani pRb reprimira ekspresiju gena *hTERT* (Cong, Wright i Shay, 2002).
WT1 je tumor supresorski protein koji suprimira transkripciju gena *hTERT*. Veže se na svoja mjesta vezanja u promotorskoj regiji gena *hTERT* -352 pb uzvodno od mjesta ATG (Cong, Wright i Shay, 2002).

Tijekom diferencijacije i staničnog ciklusa telomeraza je inaktivna te postoji nekoliko tvari koje imaju izravan učinak na transkripciju gena *hTERT* kao što su interferon-alfa, TGF-beta, vitamin D3 i dr. (Ramlee i sur., 2016).

Epigenetička regulacija transkripcije gena *hTERT*

Zbog brojnih CpG mjesta u promotoru gena *hTERT* smatra se da metilacija ima važnu ulogu u njegovoj ekspresiji. Istraživanja su pokazala da potpuna metilacija promotora gena *hTERT* inhibira transkripciju te da bi se potakla transkripcija *hTERT* promotor mora biti hipometiliran (Leao i sur., 2018).
Osim metilacijom, ekspresija gena *hTERT* je regulirana i acetilacijom i deacetilacijom histona prilikom čega dolazi do promjene u strukturi kromatina. U slučaju aktivacije histonske acetilaze na acetilirani *hTERT* promotor se vežu različiti represori (Ramlee i sur., 2016).

Posttranslacijska modifikacija proteina hTERT

Transkripcijska regulacija je primarni mehanizam u kontroli telomerazne aktivnosti. Međutim, protein hTERT je reguliran i nakon translacije(Cong, Wright i Shay, 2002). Fosforilacija je jedan od glavnih mehanizama u reguliranju proteinske strukture, aktivnosti i lokalizacije. Akt i PKC-alfa kinaze fosforiliraju protein hTERT i na taj način aktiviraju telomeraznu aktivnost.
Za razliku od fosforilacije Akt i PKC-alfa kinazama, fosforilacija tirozin kinazom c-Abl inhibira telomeraznu aktivnost. c-Abl fosforilira hTERT tako što se domena SH3 proteina c-Abl veže za regiju bogatu prolinom proteina hTERT (Daniel, Peek i Tollefsbol, 2012).

1.2. TERT i maligni tumori

1.2.1. Telomeraza i maligni tumori

Maligni tumori nastaju kada u normalnim stanicama dolazi do nakupljanja mutacija u genima odgovornim za reprodukciju i regulaciju rasta stanice. Glavne karakteristike malignih tumora su proliferacija, invazija i metastaziranje, angiogeneza i izbjegavanje apoptoze (Yuan, Larsson i Xu, 2019). Telomere su krucijalne za preživljenje tumorske stanice. Disfunkcionalne telomere nastaju kada telomere postanu kritično skraćene tijekom niza dioba. Kod normalnih stanica kritično skraćene telomere prepoznaju stanični mehanizmi za popravak te stanica ulazi u fazu senescencije. Kod stanica s onkogenim promjenama mehanizmi koji bi doveli do zaustavljanja ciklusa su poremećeni i stanica se nastavlja dijeliti što dovodi do stvaranja nezaštićenih krajeva kromosoma. Nezaštićeni krajevi kromosoma fuzioniraju pomoću popravka dvolančanih lomova DNA nehomolognim spajanjem krajeva (NHEJ). Tijekom sljedeće diobe stanice u anafazi svaka centromera vuče u suprotnu stranu stanice i pritom stvaraju tkz. mostove. Pod pritiskom fuzionirani kromosomi pucaju. Takvi kromosomi ponovno fuzioniraju nastavljajući ciklus lom-fuzija-most (B/F/B). B/F/B ciklusi dovode do translokacija i genomske nestabilnosti. U slučaju da ne dođe do aktivacije telomeraze stanice bi umrle apoptozom. 90% svih tumora imaju eksprimiran *hTERT*. Stanice malignih tumora postaju imortalne, imaju neograničenu replikativnu sposobnost jer dolazi do ekspresije gena *hTERT* te aktivacije telomeraze koja stabilizira telomere (Shay i Wright, 2011). Različiti mehanizmi dovode do aktivacije telomeraze, poput mutacija u promotoru *hTERT*, promjena u alternativnom prekrajanju pre-mRNA *hTERT*, amplifikacije *hTERT* i epigenetičkih promjena. Aktivna telomeraza osigurava stabiliziranje telomera i proliferaciju tumorskih stanica (Jafri i sur., 2016).

1.2.2. Mehanizmi aktivacije gena *hTERT* u stanicama malignih tumora

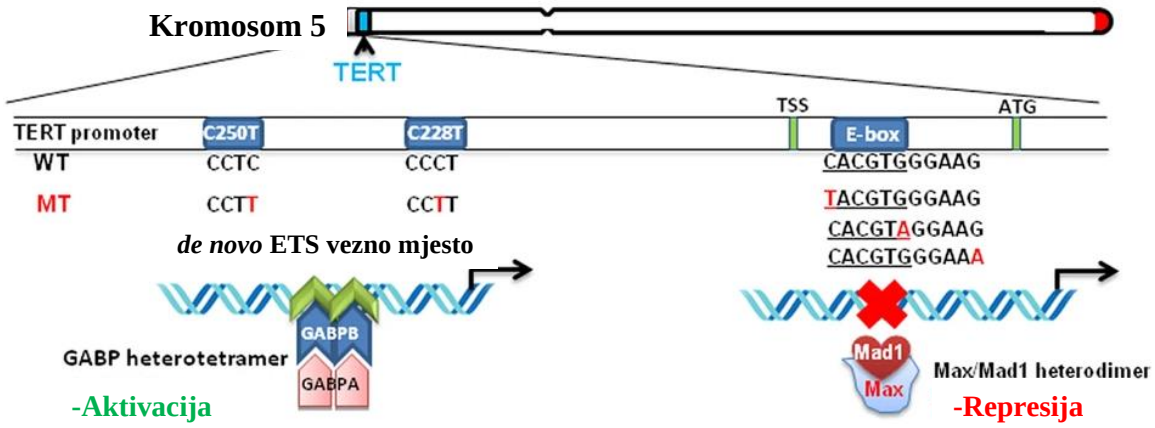
Napredak u tehnologiji sekvenciranja DNA omogućio je identifikaciju mutacija kod različitih vrsta tumora. Tako su kod različitih vrsta tumora otkrivene i mutacije u promotorskoj regiji *hTERT* (Yuan, Larsson i Xu, 2019).

Mutacije u promotorskoj regiji gena *hTERT* su najčešće u dva žarišna mjesta, 124 i 146 pb uzvodno od mjesta ATG. To su mutacije c.124C>T i c.146C>T. Kod tih mutacija dolazi do tranzicije dvaju pirimidina, citozina u timidin. Otkrivene su i druge, manje uobičajene mutacije

u promotorskoj regiji gena *hTERT* kao što su mutacije CC>TT na položajima -124/-125 pb i -138/-139 pb od mjesta ATG (Panebianco i sur., 2019).

Mutacije u promotorskoj regiji gena *hTERT* su prvo otkrivene kod malignog melanoma gdje je pokazana visoka učestalost mutacija c.124C>T i c.146C>T u promotoru gena *hTERT* te je pokazano da prisutnost ovih dviju mutacija ima važnu ulogu u samom nastanku malignih tumora. Ove mutacije su kasnije otkrivene kod 60 vrsta malignih tumora. Česte su kod sporadičnih i nasljednih malignih melanoma, glioblastoma, raka mokraćnog mjehura, liposarkoma, raka štitnjače, hepatocelularnog karcinoma i nekih drugih vrsta malignih tumora. Kako bi se pokazalo na koji način mutacije c.124C>T i c.146C>T uzrokuju pojačanu ekspresiju gena *hTERT*, provedeno je istraživanje u kojem je napravljen konstrukt promotora *hTERT* s mutacijama c.124C>T i c.146C>T te je u tim uzorcima primijećena pojačana aktivnost promotora i pojačana transkripcija gena *hTERT*. Dokazano je da ove mutacije tvore novo mjesto CCGGAA/T za vezivanje transkripcijskih faktora ETS (od engl. *E-twenty six*).

Porodica transkripcijskih faktora ETS uključuje veliki broj gena (*ETS1*, *ETS2*, *ELF1*, *ELK1*, *FLI1* i dr.) koji kodiraju transkripcijske faktore uključene u staničnu proliferaciju, diferencijaciju i onkogenu transformaciju (Valvo i Nucera, 2019). Transkripcijski faktori ETS imaju domenu koja veže DNA u obliku uzvojnice građene od 85 aminokiselina. Svi transkripcijski faktori ETS se vežu za istu ili vrlo sličnu sekvencu DNA (Hollenhorst, 2012). Vezanjem za DNA, ETS regulira telomeraznu aktivnost. Dokazano je da se GABP, jedan od ETS faktora, posebno veže za mjesta vezanja nastala mutacijama *de novo* na specifičnim mjestima u promotoru gena *hTERT* i tako potiče njegovu ekspresiju (Khattar i Tergaonkar, 2017).



Slika 5. Shematski prikaz mutacija u *hTERT* promotorskoj regiji i vezanja odgovarajućih transkripcijskih faktora. (Preuzeto i prilagođeno prema Yuan i sur., 2019).

Istraživanja su pokazala da kromosomski rearanžmani i onko-virusne insercije u genski lokus *hTERT* uzrokuju pojačanu ekspresiju gena *hTERT* i aktivaciju telomeraze. Pokazano je da *hTERT* rearanžmani dovode do direktnog preklapanja pojačivača, ne-kodirajućih regulatornih elemenata i kodirajuće sekvence *hTERT* što dovodi do remodeliranja kromatina i aktivacije transkripcije gena *hTERT* (Pestana i sur., 2017).

Oko 15% tumora nastaje zbog infekcije onkogenim virusom, zbog čega dolazi do aktivacije telomeraze. Aktivacija telomeraze je jedan od glavnih mehanizama odgovornih za virusnu karcinogenezu. Smatra se da postoje dva mehanizma kojim virusi izazivaju nastanak malignih tumora. Prvo se pokazalo da virusni proteini humanog papiloma virusa, virusa hepatitisa B i drugih virusa djeluju kao kofaktori za aktivaciju transkripcije *hTERT*. Drugi mehanizam je da se virusna DNA ugradi u lokus *hTERT* te ga na taj način regulira. Primjer ovakvog mehanizma je infekcija virusom hepatitisa B koja je povezana s razvojem hepatocelularnog karcinoma. fragment DNA virusa hepatitisa B ugrađuje se u 5'-regulatornu regiju gena *hTERT* 1,6 kb uzvodno od početnog mjesta transkripcije i djeluje kao pojačivač transkripcije gena *hTERT* (Cong, Wright i Shay, 2002).

Kod nekih tumora je pronađena i amplifikacija gena *hTERT* što također dovodi do pojačane aktivnosti telomeraze.

1.2.3. Uloga gena i proteina hTERT u nastanku i progresiji malignih tumora

Klinički, tumori s mutacijom u promotoru *hTERT* imaju povećanu razinu *hTERT* mRNA i telomeraznu aktivnost za razliku od normalnog tkiva bez mutacije. Neka istraživanja su

proučavala kako mutacija u promotoru *hTERT* djeluje na nastanak i progresiju malignih tumora (Pestana i sur., 2017).

Artandi i sur. (2002) su proveli istraživanje u kojem su stvorili transgenične miševe s povećanom ekspresijom gena *hTERT* što je dovelo do povećane telomerazne aktivnosti u žljezdanom tkivu dojke. Nakon nekog vremena kod transgeničnih miševa došlo je do spontanog razvoja invazivnog karcinoma dojke. Ovim istraživanjem je dokazano da ekspresija gena *hTERT* može uzrokovati nastanak malignih tumora.

Kod mišjeg modela s konstitutivnom ekspresijom gena *hTERT* u timocitima i perifernim limfocitima T došlo je do razvoja T-staničnog limfoma i njegove diseminacije. Kod miševa s T-staničnim limfomom došlo je do jače diseminacije tumora nego kod miševa divljeg tipa iste dobi. Tumor se osim na limfna tkiva širio i na druga okolna tkiva (Pestana i sur., 2017).

Osim uloge u nastanku malignih tumora *hTERT* ima ulogu i u metastaziranju što su Park i sur. (2016) dokazali kod malignog tumora želuca. Pokazano je da prekomjerna ekspresija *hTERT*-a u stanicama dovodi do povećane razine proteina koji veže protein Mac2, tumorskog proteina uključenog u metastaziranje. Osim toga, hTERT se veže na c-Myc što dovodi do stvaranja kompleksa koji se veže na promotor i potiče invaziju i metastaziranje. Također, signalni put Wnt/β-katenin aktiviran *hTERT*-om dovodi do pojačane ekspresije proteina c-Myc koji potiče transkripciju gena *hTERT*.

Nadalje, Ding i sur. (2013) su ustanovili da aktivacija signalnog puta NF-κB dovodi do pojačane ekspresije metaloproteinaza 1, 3, 9 i 10 koji potiču invaziju malignih tumora. *hTERT* djeluje kao transkripcijski modulator signalnih putova Wnt/β-katenin i NF-κB pojačavajući ekspresiju ciljanih gena ovih putova koji imaju ulogu u proliferaciji, metastaziranju, apoptozi i invaziji karcinoma (Li i Tergaonkar, 2014).

1.3. Gen *hTERT* i karcinom štitnjače

1.3.1. Karcinogeneza

Karcinom štitnjače je najučestaliji maligni tumor endokrinog podrijetla, te čini 1,5% svih tumora u Sjedinjenim Američkim Državama. Učestalost karcinoma štitnjače svake godine raste za 5%. Glavni rizični faktori za razvoj karcinoma štitnjače je izlaganje ionizirajućem zračenju i nedostatak joda u organizmu. Karcinom štitnjače ima najmanju stopu smrtnosti među karcinomima, ali se ipak stopa svake godine povećava za 0,9% (Beynon i Pinneri, 2016).

Stopa incidencije karcinoma štitnjače je 3 puta veća kod žena nego kod muškaraca. Javlja se najčešće u razdoblju između puberteta i menopauze što ukazuje na to da je etiologija karcinoma

štitnjače povezana sa ženskim spolnim hormonima i reproduktivnom funkcijom. Kod muškaraca je uočeno da se incidencija karcinoma štitnjače povećava sa starenjem.

Uočena je različita incidencija i među etničkim skupinama. Posebno je zanimljiva razlika u incidenciji karcinoma štitnjače kod arapske i židovske populacije u Izraelu, te jugoistočno azijske i bjelačke populacije na Havajima (Hojker, 2017).

Karcinom štitnjače nema jasno utvrđene etiološke faktore. Smatra se da izloženost ionizirajućem zračenju dovodi do povećanja učestalosti karcinoma. Dokaz su povećane stope incidencije nakon nuklearne katastrofe tijekom drugog svjetskog rata povezane s bacanjem atomske bombe na Hiroshimu i Nagasaki. Također su pokazane povećane stope incidencije karcinoma štitnjače kod djece izložene radijaciji nakon Černobilske katastrofe (Pacini i DeGroot, 2013).

Prema klasifikaciji WHO *(*od engl. *world health organisation classification*) tumore štitnjače možemo podijeliti na benigne tumore među kojima su najčešći folikularni adenomi i na maligne među koje spadaju papilarni karcinom, folikularni karcinom, slabo diferencirani karcinom, anaplastični karcinom, medularni karcinom i još neki vrlo rijetki tumori šitnjače (Hedinger, Dillwyn i Sobin, 1989).

Papilarni i folikularni karcinom štitnjače spadaju u diferencirane karcinome. Nastaju iz epitelnih folikularnih stanica i na njih otpada >90% svih karcinoma štitnjače. Diferencirani karcinomi štitnjače imaju dobre prognoze i u većini slučajeva stopa desetogodišnjeg preživljenja je 90-95% (Aboelnaga i Ahmed, 2015).

Osim okolišnih čimbenika na razvoj tumora utječu i molekularni čimbenici, genetski i epigenetski. Na temelju molekularne analize tumora štitnjače uočene su mnogobrojne genetske promjene koje se mogu povezati sa razvojem tumora. Najčešće zahvaćeni geni su geni uključeni u popravak DNA i u regulaciju staničnog ciklusa. Najučestalije mutacije i polimorfizmi jednog nukleotida koji se javljaju kod papilarnog i folikularnog karcinoma su: točkaste mutacije BRAF i RAS, kromosomski rearanžmani RET/PTC i PAX8/PPARγ, polimorfizmi RET. Također je uočeno i da točkaste mutacije u genima *TERT* i *p53* utječu na razvoj i progresiju karcinoma štitnjače (Zhou i sur., 2014).

1.3.2. Mutacije u promotorskoj regiji gena *TERT* u karcinomu štitnjače

Mutacije u promotorskoj regiji gena *hTERT* najčešće se javljaju na pozicijama -124 pb i -146 pb uzvodno od mjesta ATG (Liu i Xing, 2016). Najučestalije mutacije kod karcinoma štitnjače su mutacije c.124C>T (C228T) i c.146C>T (C250T) u *hTERT* promotorskoj regiji. Mutacija

c.124C>T se javlja češće u odnosu na mutaciju c.146C>T. Kod papilarnog karcinoma štitnjače učestalost mutacija c.124C>T i c.146C>T je 9,7% i 2,1%, kod folikularnog karcinoma 15,7% i 2,5%. Kod benignih tumora nisu pronađene mutacije u promotoru *hTERT* dok je kod nediferenciranih karcinoma učestalost mutacija od 38-46%.

Prisutnost *hTERT* mutacije kod karcinoma štitnjače dovodi do pojačane transkripcije gena na način da mutacije stvaraju mjesta vezanja za transkripcijske faktore ETS. Vezanjem transkripcijskih faktora ETS na mjesta vezanja dolazi do pojačane ekspresije gena uključujući i gen *hTERT*.

Mutacije *hTERT* su povezane s lošijim kliničkim i patohistološkim karakteristikama tumora. Mutacije u promotoru gena *hTERT* su učestalije kod starijih muškaraca te kod pacijenata s većim tumorom. Također, mutacije u genu *hTERT* su uočene kod pacijenata kod kojih je došlo do invazije karcinoma, pojave udaljeljenih metastaza i većeg stadija tumora. Smrtnost pacijenata s mutacijom u genu *hTERT* je veća u odnosu na pacijente bez mutacije. Istraživanja provedena na raznim populacijama su pokazala da su kod agresivnijih tipova karcinoma štitnjače pronađene mutacije u genu *hTERT* što je dokaz da mutacije dovode do lošije prognoze i slabijeg izliječenja pacijenata s karcinomom štitnjače (Liu i Xing, 2016).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

1. Utvrditi učestalost mutacija c.124C>T i c.146C>T u hrvatskoj populaciji bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače.
2. Odrediti postoji li povezanost prisutnosti mutacija c.124C>T i c.146C>T s demografskim (dob, spol) i kliničkim (proširenost bolesti) karakteristikama bolesnika.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

U ispitivanje je uključen 81 bolesnik s papilarnim i folikularnim karcinomom štitnjače koji su dijagnosticirani i liječeni u Klinici za nuklearnu medicinu i onkologiju KBC Sestre milosrdnice, te patohistološki i imunohistokemijski potvrđeni u Zavodu za patologiju Ljudevit Jurak KBC Sestre Milosrdnice.

3.2. Uzorci

Analizirani su uzorci tkiva fiksirani formalinom i uklopljeni u parafin pohranjeni na Zavodu za patologiju Ljudevit Jurak KBC Sestre Milosrdnice. Svi uzorci i odgovarajući patohistološki nalazi pregledani su od strane patologa kako bi se potvrdilo da se zaista radi o tumorskom tkivu štitnjače. Nakon što je patolog na uzorcima označio dio koji odgovara tumorskom tkivu, ostatak materijala i parafin je uklonjen sterilnim skalpelom prije rezanja na mikrotomu. Za svaki je uzorak ovisno o njegovoj veličini napravljeno 2 do 5 rezova tkiva debljine 6 μm koji su pohranjeni u označene polipropilenske epruvete od 2 mL.

3.3. Izolacija DNA

Nakon što su pripremljeni rezovi tkiva i pohranjeni u epruvete, iz njih je izolirana DNA. Za izolaciju DNA je korišten kit QIAamp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen, Hilden, Njemačka) slijedeći upute proizvođača.

Rezovima tkiva je dodano 1 mL ksilena (Kemika, Zagreb, Hrvatska), kako bi se uklonio parafin iz uzoraka, uzorci su snažno vorteksirani 10 sekundi, inkubirani na sobnoj temperaturi 5 minuta te centrifugirani 2 minute pri 16000 G na sobnoj temperaturi u centrifugi Eppendorf 5415R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Nakon centrifugiranja, uklonjen je supernatant te je na talog dodan 1 mL 96%-tnog etanola (Kemika). Etanol se dodaje kako bi se uklonili ostatci ksilena. Uzorak s dodanim etanolom je vorteksiran te je uslijedilo centrifugiranje 2 minute pri 16000 G na sobnoj temperaturi u centrifugi Eppendorf 5415R. Nakon centrifugiranja pažljivo je uklonjen sav supernatant te su uzorci inkubirani u otvorenim epruvetama 15 minuta na 37°C u termomikseru Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf) kako bi ispario sav preostali etanol. Talog je resuspendiran u 180 μL pufera za lizu iz kita (ATL pufer), dodano je 20 μL proteinaze K koja je dio kita za izolaciju DNA. Nakon toga uzorci su inkubirani 1 sat na 56°C u termomikseru Eppendorf Thermomixer Comfort kako bi se lizirale stanice. Potom su uzorci inkubirani na 90°C, kako bi se postiglo uklanjanje modifikacija molekule DNA do kojih je

došlo uslijed fiksiranja formalinom. Nakon inkubacije na 90°C, dodano je 2 µL RNaze A (100 mg/mL) (Qiagen, Hilden, Njemačka) te su uzorci inkubirani 2 minute na sobnoj temperaturi. Zatim je dodano 200 µL pufera AL iz kompleta, uzorci su dobro promiješani vorteksiranjem pa je potom dodano 200 µL 96 %-tnog etanola i ponovno dobro promiješano vorteksiranjem. Čitav tako dobiven lizat prebačen je u QIAamp MinElute kolonu iz kompleta koja je prethodno stavljena u polipropilensku epruvetu od 2 mL za skupljanje eluata.

Uslijedilo je nekoliko centrifugiranja u različitim puferima kako bi se postiglo vezanje DNA za kolonu i ispiranje drugih tvari koje kontaminiraju DNA. Prvo je zatvorena kolona centrifugirana 1 minutu pri 6000 G na sobnoj temperaturi u centrifugi Eppendorf 5415R. Nakon centrifugiranja, epruveta sa skupljenim eluatom je bačena, a kolona je prebačena u novu čistu polipropilensku epruvetu od 2 mL te je na kolonu dodano 500 µL prvog pufera za ispiranje kolone iz kompleta (pufer AW1). Uslijedilo je ponovno centrifugiranje 1 minutu pri 6000 G na sobnoj temperaturi, nakon čega je epruveta sa skupljenim eluatom bačena, a kolona prebačena u novu čistu polipropilensku epruvetu od 2 mL te je na kolonu dodano 500 µL drugog pufera za ispiranje kolone iz kita (pufer AW2). Nakon još jednog centrifugiranja 1 minutu pri 6000 G, kolona je prebačena u čistu epruvetu te centrifugirana 3 minute pri 16000 G kako bi se membrana na koloni potpuno osušila. U posljednjem koraku izolacije, na kolonu koja je prebačena u čistu polipropilensku epruvetu od 1,5 mL dodano je 80 µL ATE pufera iz kita, kolona je zatvorena i inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi te centrifugirana 1 minutu pri 16000 G. Na taj način je čista genomska DNA isprana iz kolone u 80 µL ATE pufera. Epruvetu s DNA je označena i pohranjena na -20°C.

3.4. Određivanje koncentracije i čistoće DNA

Koncentracija i čistoća izolirane DNA određena je mjerenjem apsorbancije na valnim duljinama od 260 nm i 280 nm koristeći nanospektrofotometar NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Wilmington DE, SAD).

3.5. Lančana reakcija polimerazom

Za umnožavanje promotorske regije gena *hTERT* korištena je ugnježđena lančana reakcija polimerazom, PCR (od engl. *nested polymerase chain reaction*), odnosno dvije uzastopne PCR-reakcije da se umnoži regija gena koja nam je potrebna za sekvenciranje.

Ukupni volumen reakcijske smjese prve PCR reakcije bio je 25 µL. Konačne koncentracije u 25 µL smjese bile su: 1x Pufer II (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SAD), 1,5 mmol/L MgCl2 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SAD), 0,2 µmol/L smjese dNTP (otopina koja sadrži svaki od četiri deoksinukleotida u koncentraciji: 10 mmol/L dATP, 10 mmol/L dCTP, 10 mmol/L dGTP, 10 mmol/L TTP) (Sigma, St Louis, MO, SAD), 5% DMSO, 1 µmol/L kodirajuće početnice, 1 µmol/L nekodirajuće početnice, 0,04 U/µL AmpliTaq Gold® Pfx DNA polimeraze (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SAD) i 4 ng/µL odgovarajućeg DNA uzorka.

Prva PCR reakcija provedena je u 40 ciklusa koji su se sastojali svaki od 30 sekundi denaturacije DNA pri 95°C, 30 sekundi sparivanja početnica pri 68°C, te 30 sekundi umnažanja DNA produljivanjem početnica pri 72°C. Prvom ciklusu prethodilo je 10 minuta preddenaturacije DNA pri 95°C, a nakon posljednjeg ciklusa slijedilo je dodatno produljivanje u trajanju od 10 minuta pri 72°C.

Ukupni volumen reakcijske smjese druge PCR reakcije bio je 50 µL. Konačne koncentracije u 50 µL smjese bile su: 1x Pufer II (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SAD), 1,5 mmol/L MgCl2 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SAD), 0,2 µmol/L dNTP smjese (otopina koja sadrži svaki od četiri deoksinukleotida u koncentraciji: 10 mmol/L dATP, 10 mmol/L dCTP, 10 mmol/L dGTP, 10 mmol/L TTP) (Sigma, St Louis, MO, SAD), 5% DMSO, 1 µmol/L kodirajuće početnice, 1 µmol/L nekodirajuće početnice, 0,025 U/µL AmpliTaq Gold® Pfx DNA polimeraze (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SAD) i 2 µL produkta prve PCR reakcije.

Druga PCR reakcija provedena je u 30 ciklusa koji su se sastojali svaki od 30 sekundi denaturacije DNA pri 95°C, 30 sekundi sparivanja početnica pri 58°C, te 30 sekundi umnažanja DNA produljivanjem početnica pri 72°C. Prvom ciklusu prethodilo je 10 minuta preddenaturacije DNA pri 95°C, a nakon posljednjeg ciklusa slijedilo je dodatno produljivanje u trajanju od 10 minuta pri 72°C.

Umnažanje PCR-om provedeno je u uređaju Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Uzorci su neposredno nakon prve i druge PCR reakcije pohranjeni na 4°C.

Sekvence početnica korištenih u prvoj i u drugoj PCR reakciji navedene su u Tablici 1.

Tablica 1. Sekvence početnica korištenih za PCR reakcije. Početnice P3 i P4 korištene su za prvu PCR reakciju, a početnice P1 i P5 za drugu PCR reakciju.

Početnica	**Sekvenca**
P3	5′-CACCCGTCCTGCCCCTTCACCTT-3′
P4	5′-GGCTTCCCACGTGCGCAGCAGGA-3′
P1	5'-CCCCTTCACCTTCCAGCTC-3'
P5	5′-GCCGCGGAAAGGAAGG-3′

3.6. Elektroforeza u agaroznom gelu

Za provjeru uspješnosti umnažanja regije DNA nakon PCR-reakcije, napravljena je elektroforeza u 2%-tnom agaroznom gelu. Dobiveni fragment je bio veličine 118 pb.

3.7. Reakcija sekvenciranja

Sekvenciranjem je određen slijed nukleotida promotorske regije gena *hTERT*. Sangerova metoda sekvenciranja temelji se na ugradnji fluorescentno označenih dideoksi-nukleotida tijekom PCR-sinteze komplementarnog lanca.
Amplikoni dobiveni ugniježđenom lančanom reakcijom polimerazom su poslani u serijama od po 12 uzoraka u servisnu ustanovu (Macrogen-Europe) na sekvenciranje po Sangeru.

3.8. Analiza rezultata sekvenciranja

Rezultati sekvenciranja su analizirani pomoću programa Mutation Surveyor i Finch TV uspoređujući dobivenu sekvencu s referentnom sekvencom.

3.9. Statistička obrada

Za osnovnu obradu podataka korištena je deskriptivna statistika, a rezultati su prikazani tablično i grafički. Povezanost prisutnosti mutacija i demografskih (dob, spol) i kliničkih (proširenost bolesti) karakteristika bolesnika određena je Hi-kvadrat testom za statističku analizu kvalitativnih varijabli ili Studentovim T-testom za statističku analizu kvantitativnih varijabli.

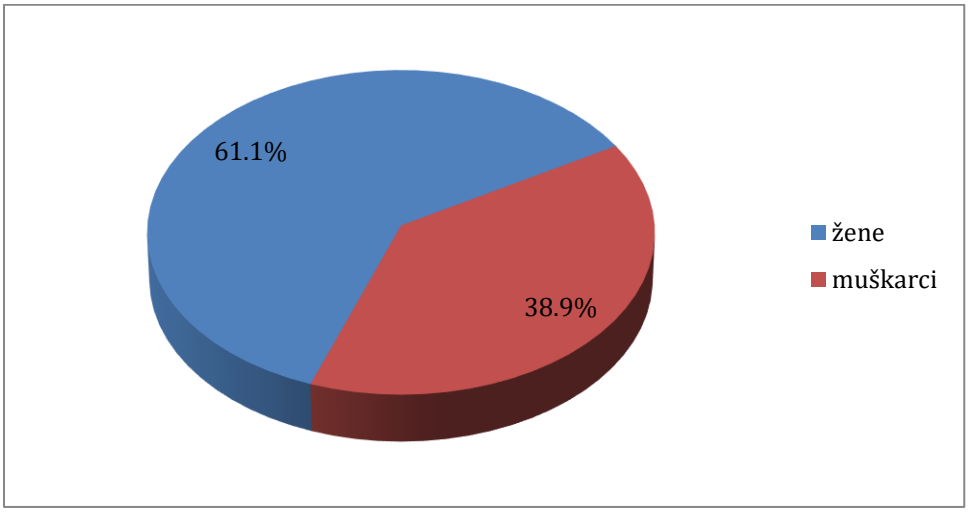
Hi-kvadrat test je korišten za određivanje povezanosti prisutnosti mutacija i spola te za određivanje povezanosti pristutnosti mutacija s metastatskom proširenosti bolesti. Studentov T-test je korišten za određivanje povezanosti prisutnosti mutacija s dobi ispitanika. Statistička analiza je provedena pomoću statističkog programa STATISTICA 7 (StatSoft, Tulsa, USA).

4. REZULTATI

Analiziran je 81 uzorak tumora štitnjače da bi se utvrdila učestalost mutacija c.124C>T i c.146C>T u promotorskoj regiji gena *hTERT*. Uzorci tkiva fiksirani su formalinom i uklopljeni u parafin te pohranjeni na Zavodu za patologiju Ljudevit Jurak KBC Sestre Milosrdnice. Napravljeni su rezovi tkiva i izolirana je DNA. Pomoću ugnježđene reakcije PCR umnožena je promotorska regija gena *hTERT* veličine 118 pb. Potom je Sangerovom metodom sekvenciranja određen slijed nukleotida, a pomoću programa Mutation Surveyor i Finch TV određena je prisutnost mutacija.

4.1. Struktura ispitanika

Određivanje mutacije *hTERT* uspjelo je u 72 uzorka, kod 9 preostalih uzoraka bila je neuspješna PCR reakcija. Među tim uzorcima njih 44 (61,1%) bilo je od bolesnika ženskog spola, a 28 (38,9%) od bolesnika muškog spola (Slika 6). Raspon dobi bolesnika bio je od 13 do 81 godine uz medijan 47 godina, srednju vrijednost 47,6 godina i standardnu devijaciju 18,1 godina. Od ukupno 72 uzorka kod kojih je uspješno analizirana prisutnost mutacija u promotorskoj regiji gena *hTERT*, 27 (37,5%) uzoraka je bilo od bolesnika s lokaliziranom bolesti, 30 (41,7%) od bolesnika s metastazama regionalnih limfnih čvorova i 15 (20,8%) od bolesnika s udaljenim metastazama. Za jednog bolesnika nisam imala pouzdane podatke o proširenosti bolesti (Tablica 2).



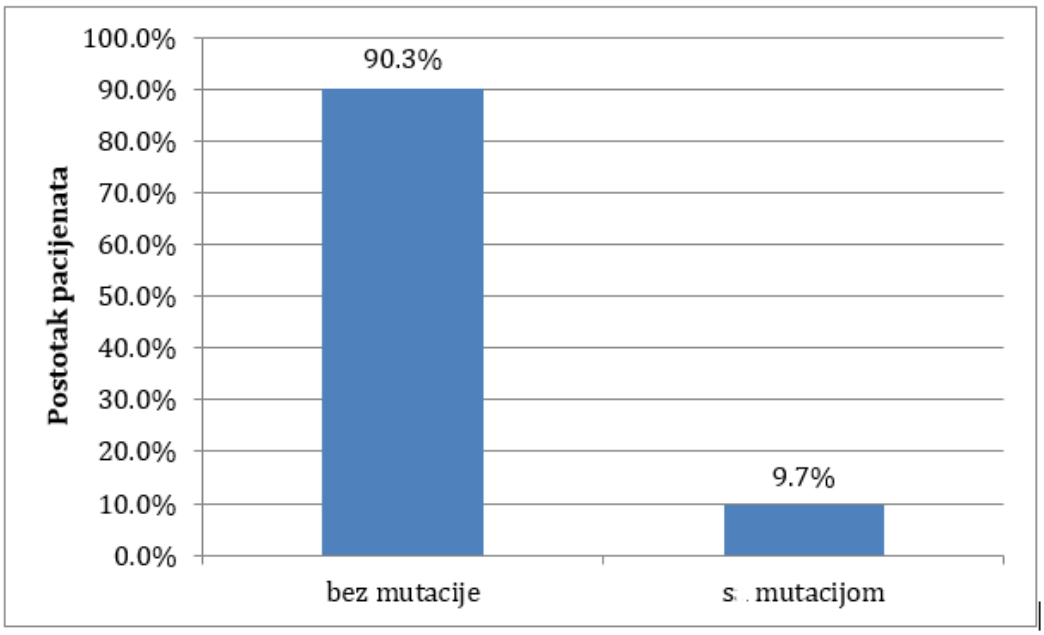
Slika 6. Spolna struktura ispitanika.

Tablica 2**.** Brojnost ispitanika prema spolu i stupnju proširenosti diferenciranog karcinoma štitnjače

	Stupanj proširenosti bolesti /broj (%)/		
Spol	**Lokalizirana bolest**	**Metastaze u regionalnim limfnim čvorovima**	**Udaljene metastaze**
muškarci	6 (8,3%)	14 (19,4%)	8 (11,1%)
Žene	21 (29,2%)	16 (22,2%)	7 (9,7%)
ukupno	27 (37,5%)	30 (41,7%)	15 (20,8%)

4.2. Mutacije u promotorskoj regiji gena *hTERT*

Mutacije u promotorskoj regiji gena *hTERT* su nađene u uzorku sedam (9,7%) od 72 uspješno analizirana bolesnika (Slika 7). U pet uzoraka (6,9%) je pronađena mutacija c.124C>T, u jednom (1,4%) mutacija c.146C>T te jednom (1,4%) obje mutacije (c.124C>T i c.146C>T).



Slika 7. Postotak bolesnika bez i s prisutnom mutacijom u promotorskoj regiji gena *hTERT* u uzorku od 72 uspješno analizirana bolesnika.

4.3. Mutacije i spol

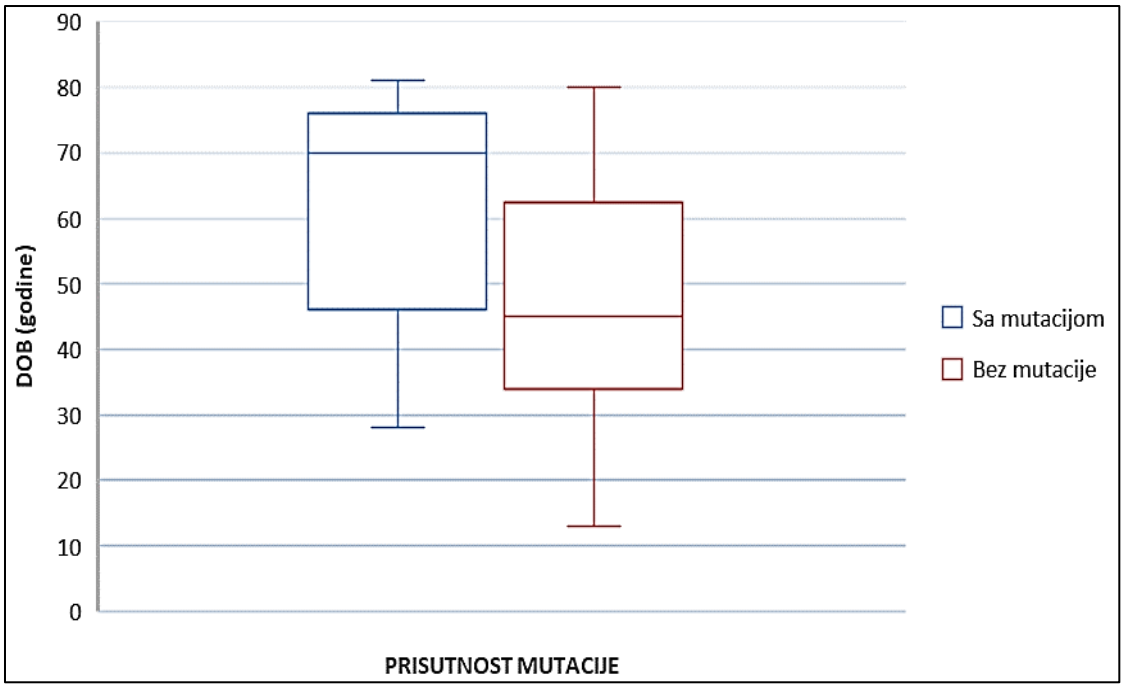
Među bolesnicima s mutacijom, njih 3 je bilo ženskog spola, a 4 muškog spola. Među 44 bolesnika ženskog spola, njih 3 (6,8%) je imalo mutaciju, dok je među 28 bolesnika muškog spola njih 4 (14,3%) imalo mutaciju (Tablica 3). Nije nađena statistički značajna povezanost prisutnosti mutacije i spola (Hi-kvadrat test, χ^2=0,403, p=0,53).

Tablica 3**.** Distribucija ispitanika s obzirom na prisutnost mutacija u promotorskoj regiji gena *hTERT* i spol u skupini 72 bolesnika s diferenciranim rakom štitnjače.

Spol	**nađena mutacija /broj (%)/**	**nije nađena mutacija /broj (%)/**	**ukupno /broj/**
Žene	3 (6,8%)	41 (93,2%)	44
muškarci	4 (14,3%)	24 (85,7%)	28
ukupno	7 (9,7%)	65 (90,3%)	72

4.4. Mutacije i dob

Raspon dobi bolesnika kod kojih je nađena mutacija u promotorskoj regiji gena *hTERT* bio je od 28 do 81 godine uz medijan 70 godina, srednju vrijednost 60,4 godina i standardnu devijaciju 22,1 godina. Raspon dobi bolesnika kod kojih nije nađena mutacija u promotorskoj regiji gena TERT bio je od 13 do 80 godine uz medijan 45 godina, srednju vrijednost 46,2 godina i standardnu devijaciju 17,3 godina (Slika 8). Bolesnici kod kojih je nađena mutacija bili su statistički značajno stariji od bolesnika kod kojih nije nađena mutacija (Studentov t-test, t=-2,014, p=0,048).



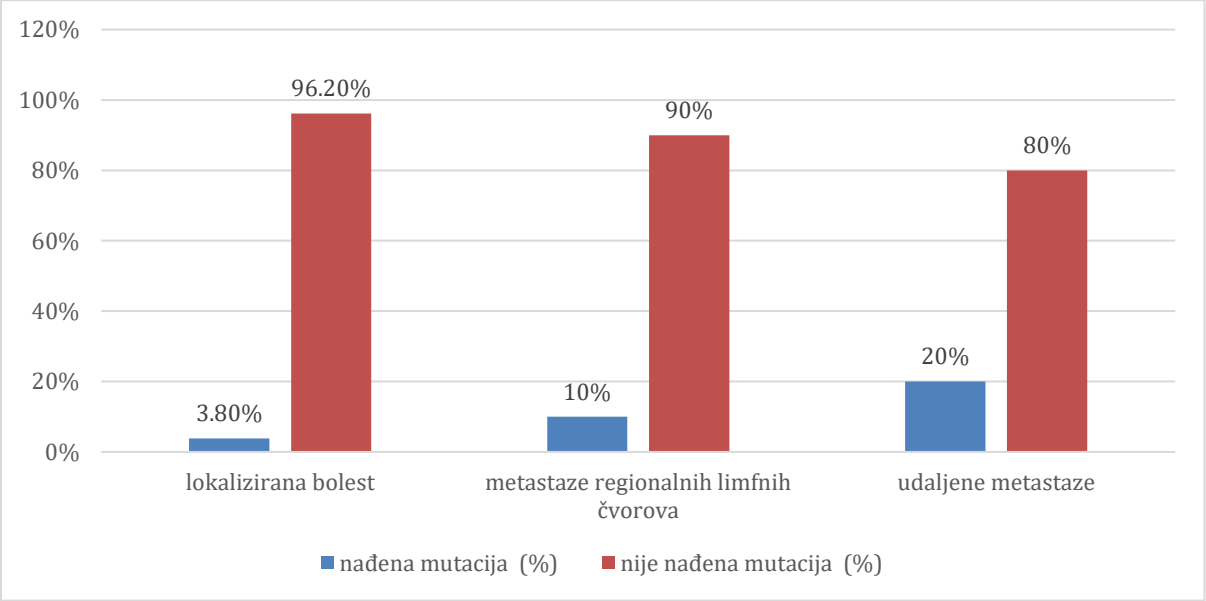
Slika 8. Distribucije dobi bolesnika u različitim skupinama bolesnika s obzirom na prisutnost mutacija u promotorskoj regiji gena *hTERT* u skupini 72 bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače.

4.5. Mutacije i metastatska proširenost bolesti

Mutacije u promotorskoj regiji gena *hTERT* su nađene u jednog (3,8%) od 26 bolesnika s lokaliziranom bolesti, 3 (10%) od 30 bolesnika s metastazama regionalnih limfnih čvorova i 3 (20%) od 15 bolesnika s udaljenim metastazama (Tablica 4). Nije nađena statistički značajna povezanost prisutnosti mutacije i metastatske proširenosti bolesti (Hi-kvadrat test, χ^2=2,79, p=0,25). Od 7 bolesnika s *hTERT* mutacijama, 1 bolesnik je imao lokaliziranu bolest (14,3%), 3 bolesnika su imala metastaze u regionalnim limfnim čvorovima (42,9%) i 3 bolesnika su imala udaljene metastaze (42,9%).

Tablica 4. Distribucija bolesnika s obzirom na prisutnost mutacija u promotorskoj regiji gena *hTERT* i stupanj metastatske proširenosti bolesti u skupini 72 bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače.

Stupanj metastatske proširenosti bolesti	**nađena mutacija /broj (%)/**	**nije nađena mutacija /broj (%)/**	**ukupno /broj/**
lokalizirana bolest	1 (3,8%)	25 (96,2%)	26
metastaze regionalnih limfnih čvorova	3 (10%)	27 (90%)	30
udaljene metastaze	3 (20%)	12 (80%)	15
Ukupno	7 (9,7%)	65 (90,3%)	72



Slika 9. Postotak bolesnika s prisutnom mutacijom u promotorskoj regiji gena *hTERT* u različitim stadijima metastatske proširenosti bolesti u skupini 72 bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače.

5. RASPRAVA

U mojem istraživanju sudjelovalo je 72 bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače, od kojih je 28 muškaraca i 44 žene. Spolna struktura ispitanika je u skladu s prethodnim istraživanjima kod kojih je također zabilježen veći broj ženskih bolesnica nego muških bolesnika (Yan i sur., 2017).

Kada je riječ o zastupljenosti *hTERT* mutacija u cijelom uzorku od 72 ispitanika, 7 ispitanika je imalo mutaciju odnosno 9,7%. Mutacija c.124C>T je pronađena kod 5 bolesnika (6,9%), mutacija c.146C>T kod 1 bolesnika (1,4%), a obje mutacije su pronađene kod 1 bolesnika (1,4%). Slični rezultati dobiveni su i u drugim studijama. U meta-analizi koju su proveli Yang i sur. (2019) analizirani su rezultati 51-og istraživanja u kojoj je uključen 11382 ispitanik sa diferenciranim karcinomom štitnjače gdje je analizirana učestalost mutacija u promotorskoj regiji gena *hTERT*. Kod njih su mutacije pronađene kod 1239 ispitanika odnosno u 10,9% (Yang i sur., 2019). U studiji koju su proveli Melo i sur. (2014) 9,2% ispitanika sa diferenciranim karcinomom štitnjače su imali mutaciju u *hTERT* genu. Liu i sur. (2013) su u istraživanju od 336 ispitanika kod 11,6% ispitanika pronašli mutaciju c.124C>T, u 0,6% mutaciju c.146C>T i u 12,2% ispitanika obje mutacije. U istraživanju kojeg su proveli Qasem i sur. (2015) sudjelovalo je 265 pacijenata sa diferenciranim karcinomom štitnjače. Od 265 ispitanika 10,6% je imalo mutaciju c.124C>T, 2,3% mutaciju c.146C>T i čak 12,8% obje mutacije u promotorskoj regiji *hTERT* gena. Ukupna učestalost mutacija u prijašnjim istraživanjima se preklapa s mojim istraživanjem, međutim učestalost pojedinih mutacija se razlikuje od mojeg istraživanja. U mojem istraživanju manji je postotak bolesnika s obje mutacije c.124C>T i c.146C>T.

U mojem istraživanju mutacije u *hTERT* genu su učestalije kod muških bolesnika (14,3%) dok je kod ženskih bolesnica učestalost mutacija 6,3%, ali nije nađena statistički značajna povezanost prisutnosti mutacije i spola (p=0,53). Veća učestalost mutacija u bolesnika muškog spola je u skladu s rezultatima velike meta-analize u kojoj je pokazano da je među bolesnicima s mutacijom muškaraca bilo 37%, dok je među bolesnicima bez mutacije muškaraca bilo 25% i s obzirom na velik broj bolesnika uključenih u analizu, ova razlika se pokazala i statistički značajnom (Liu i Xing, 2016). U mojem istraživanju je među bolesnicima s mutacijom muškaraca bilo 57%, a među bolesnicima bez mutacije 37%, ali s obzirom na relativno mali broj bolesnika uključenih u moje istraživanje ova izraženija razlika nije dosegla statističku značajnost. Objavljeni su i rezultati drugih istraživanja koji su pokazali različitu distribuciju učestalosti mutacija s obzirom na spol kao što je istraživanje kojeg su proveli Gandolfi i sur.

(2015). U njihovom istraživanju od ukupno 121 ispitanika, njih 21 je imalo mutaciju (17%) u promotorskoj regiji. Od 21-og pozitivnog pacijenata 14 (66,6%) su bile žene i 7 muškarca (33,3%). U tom istraživanju, iako je među bolesnicima s mutacijom bio veći udio žena za razliku od mojeg istraživanja, jednako kao u mojem istraživanju nije nađena statistički značajna povezanost mutacija i spola (Gandolfi i sur., 2015).

Prema dobnoj raspodjeli ispitanika uočeno je da su bolesnici s mutacijama statistički značajno stariji od bolesnika bez mutacija. Kod bolesnika s mutacijama raspon dobi je bio od 28 do 81 godinu uz medijan 70 godina, srednju vrijednost 60,4 godina i standardnu devijaciju od 22,1 godina. Kod bolesnika bez mutacija raspon dobi je bio od 13 do 80 godine uz medijan od 45 godina, srednju vrijednost 46,2 i standardnu devijaciju 17,3 godina. U velikoj meta-analizi koja je uključila rezultate različitih studija srednja vrijednost dobi u bolesnika s mutacijom je bila 59 godina, a u bolesnika bez mutacije 45 godina što se pokazalo statistički značajnom razlikom (Liu i Xing, 2016). Moj rezultat povezanosti mutacija s starijom dobi je u skladu s mnogim drugim studijama koje su pokazale da su mutacije učestalije kod pacijenata starije životne dobi. (Gandolfi i sur., 2015; Liu i Xing, 2016; Melo i sur., 2014; Qasem i sur., 2015).

Što se tiče povezanosti prisutnosti mutacije s metastatskom proširenosti bolesti u mojem istraživanju je udio bolesnika s udaljenim metastazama bio veći među bolesnicima s mutacijom (43%) nego među bolesnicima bez mutacije (18%), ali nije pokazana statistički značajna povezanost prisutnosti mutacija i stupnja metastatske proširenosti bolesti (p=0,25). Prisutnost mutacija u promotorskoj regiji gena *hTERT* je istraživana u više studija kao potencijalni biljeg povezan s lošijom prognozom i agresivnošću diferenciranog karcinoma štitnjače. Tako je pokazano da su mutacije povezane s veličinom tumora, širenjem izvan tkiva štitnjače, prisutnošću udaljenih metastaza, većim rizikom za povrat bolesti i smrt od karcinoma štitnjače (Liu i Xing, 2016). U studiji koju su proveli Melo i sur. (2014) pokazana je statistički značajna povezanost prisutnosti mutacija i prisutnosti udaljenih metastaza, ali ne i prisutnosti mutacija i prisutnosti metastaza regionalnih limfnih čvorova. Osim toga, Kaplan-Meier analizom je pokazano da bolesnici s *hTERT* mutacijom imaju statistički značajno kraće preživljenje u odnosu na bolesnike bez mutacije. Prema istraživanju Gadolfi i sur. 7 od 28 ispitanika s metastazama je imalo mutacije u genu *hTERT* što čini 25% ispitanika. Bournaud i sur. (2019) su dokazali da su kod bolesnika sa mutacijom značajno češće prisutne udaljene metastaze (p=0,014) te da pacijenti s mutacijama imaju lošiju prognozu od onih bez mutacija. Prema istraživanju Yin i sur. (2016) kod 53,18% pacijenata s mutacijom u genu *hTERT* i kod 37,3% pacijenata bez mutacije su bile prisutne metastaze u regionalnim limfnim čvorovima. Pronađena

je statistička značajnost između promotorske mutacije *hTERT* i metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, p=0,001. Osim toga statistički značajne rezultate su dobili i kod uspoređivanja prisutnosti udaljenih metastaza sa prisutnosti mutacije u *hTERT* genu, p<0,00001.

Iako nisam pokazala statistički značajnu povezanost, veći udio bolesnika s udaljenim metastazama u slučaju prisutne mutacije u promotorskoj regiji gena *hTERT* u mojem istraživanju je u skladu s drugim istraživanjima koja su pokazala povezanost mutacija s agresivnošću i lošijom prognozom u bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače. Mogu pretpostaviti da je razlog statističkoj neznačajnosti relativno mali broj ispitanika, te da sam imala veći uzorak pretpostavljam da bi mogla dobiti statistički značajne rezultate.

Ovo istraživanje, prvo na hrvatskoj populaciji bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače je pokazalo sličnu učestalost mutacija u promotorskoj regiji gena *hTERT* i njihovu povezanost s dobi, spolom i stupnjem metastatske proširenosti bolesti kao i druga veća istraživanja. S obzirom da je stopa mutacija među ovim bolesnicima relativno niska, trebalo bi provesti istraživanje na većem broju bolesnika kako bi se sa adekvatnom statističkom snagom testa istražila povezanost prisutnosti mutacija sa stupnjem metastatske proširenosti bolesti i drugim parametrima povezanim s agresivnošću karcinoma štitnjače.

6. ZAKLJUČCI

- Mutacije u promotorskoj regiji gena *hTERT* nađene su u 9,7% bolesnika od 72 uzorka s diferenciranim karcinomom štitnjače.
- Nije nađena statistički značajna povezanost prisutnosti mutacije u promotorskoj regiji gena *hTERT* sa spolom (p=0,53).
- Bolesnici s mutacijama u promotorskoj regiji *hTERT* su bili statistički značajno stariji od bolesnika bez mutacija (p=0,048).
- Nije nađena statistički značajna povezanost prisutnosti mutacije u promotorskoj regiji gena *hTERT* i stupnja metastatske proširenosti bolesti (p=0,25).

7. LITERATURA

1. Aboelnaga E. M., Ahmed R. A. (2015): Difference between papillary and follicular thyroid carcinoma outcomes: an experience from Egyptian institution. *Cancer biology & medicine* **12**(1) : 53.
2. Artandi S. E., Alson S., Tietze M. K., Sharpless N. E., Ye S., Greenberg R. A., DePinho R. (2002): A. Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**(12): 8191-8196.
3. Beynon M. E., Pinneri K. (2016): An Overview of the Thyroid Gland and Thyroid-Related Deaths for the Forensic Pathologist. *Academic forensic pathology* **6**(2): 217-236.
4. Bournaud C., Descotes F., Decaussin-Petrucci M., Berthiller J., de la Fouchardière C., Giraudet A. L., Borson-Chazot F. (2019): TERT promoter mutations identify a high-risk group in metastasis-free advanced thyroid carcinoma. *European Journal of Cancer* **108**: 41-49.
5. Cesare A.J., Reddel R. R. (2013): Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *In Madame Curie Bioscience Database.*
6. Chen Y. (2019): The structural biology of the shelterin complex. *Biological chemistry* **400.4**: 457-466.
7. Cong Y. S., Wright W. E., Shay J.W. (2002): Human telomerase and its regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66.3**: 407-425.
8. Daniel M., Peek G. W., Tollefsbol T. O. (2012): Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* **498**(2): 135-146.
9. Ding D., Xi P., Zhou J., Wang M., Cong Y. S. (2013): Human telomerase reverse transcriptase regulates MMP expression independently of telomerase activity via NF-κB-dependent transcription. *The FASEB Journal* **27**(11): 4375-4383.
10. Eustatia-Rutten C. F., Corssmit E. P., Biermasz N. R., Pereira A. M., Romijn J. A., Smit J. W. (2006): Survival and death causes in differentiated thyroid carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **91**(1): 313-319.
11. Gandolfi G., Ragazzi M., Frasoldati A., Piana S., Ciarrocchi A., Sancisi V. (2015): TERT promoter mutations are associated with distant metastases in papillary thyroid carcinoma. *Eur. J. Endocrinol*. **172**(4): 403-413.
12. Hedinger C., Dillwyn Williams E., Sobin L. H. (1989): The WHO histological classification of thyroid tumors: a commentary on the second edition. *Cancer **63***(5): 908-911.

13. Hojker S. (2007): Epidemiologija raka štitnjače. *Acta clinica Croatica* **46**: 11-13.
14. Hollenhorst P. C. (2012): RAS/ERK pathway transcriptional regulation through ETS/AP-1 binding sites. *Small GTPases* ***3***(3): 154-158.
15. Jafri M. A., Ansari S. A., Alqahtani M. H., Shay J. W. (2016): Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome medicine* **8**(1): 69.
16. Khattar E., Tergaonkar V. (2017): Transcriptional regulation of telomerase reverse transcriptase (TERT) by MYC. *Frontiers in cell and developmental biology* **5**:1.
17. Klingelhutz A. J. (1999): The roles of telomeres and telomerase in cellular immortalization and the development of cancer. *Anticancer research* **19.6A**: 4823-4830.
18. Leão R., Apolónio J. D., Lee D., Figueiredo A., Tabori U., Castelo-Branco P. (2018): Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: clinical impacts in cancer. *Journal of biomedical science* **25**(1): 22.
19. Li Y., Tergaonkar V. (2014): Noncanonical functions of telomerase: implications in telomerase-targeted cancer therapies. *Cancer research*. 2014;74.6:1639-1644.
20. Liu R., Xing M. (2016): TERT promoter mutations in thyroid cancer. *Endocrine-related cancer* **23**(3): R143-R155.
21. Liu T., Wang N., Cao J., Sofiadis A., Dinets A., Zedenius J., Xu D. (2014): The age-and shorter telomere-dependent TERT promoter mutation in follicular thyroid cell-derived carcinomas. *Oncogene* **33**(42): 4978-4984.
22. Liu X., Bishop J., Shan Y., Pai S., Liu D., Murugan A. K., Xing M. (2013): Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocrine-related cancer* **20**(4):603-610.
23. Liu R., Xing M. (2016): TERT promoter mutations in thyroid cancer. *Endocrine Related Cancer* **23**(3):R143-R155.
24. Melo M., da Rocha A. G., Vinagre J., Batista R., Peixoto J., Tavares C., Castro P. (2014): TERT promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* ***99***(5): E754-E765.
25. Nikiforov Y. E. (2008): Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. *Modern Pathology* **21**(2): S37-S43.
26. Pacini F., DeGroot L. J. (2013): Thyroid cancer. In *Endotext* ,MDText. com, Inc.
27. Panebianco F., Nikitski A. V., Nikiforova M. N., Nikiforov Y. E. (2019): Spectrum of TERT promoter mutations and mechanisms of activation in thyroid cancer. *Cancer medicine* ***8***(13): 5831-5839.

28. Park Y. J., Kim E. K., Bae J. Y., Moon S., Kim J. (2016): Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promotes cancer invasion by modulating cathepsin D via early growth response (EGR)-1. *Cancer letters* **370**(2): 222-231.
29. Pestana A., Vinagre J., Sobrinho-Simoes M., Soares P. (2017): TERT biology and function in cancer: beyond immortalisation. *Journal of Molecular Endocrinology* **58**(2): R129-R146.
30. Qasem E., Murugan A. K., Al-Hindi H., Xing M., Almohanna M., Alswailem M., Alzahrani A. S. (2015): TERT promoter mutations in thyroid cancer: a report from a Middle Eastern population. *Endocrine-related cancer* **22**(6): 901-908.
31. Ramlee M. K., Wang J., Toh, W. X., Li S. (2016): Transcription regulation of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Genes* **7**(8): 50.
32. Schmidt J. C., Cech T. R. (2015): Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation. *Genes & development* **29**(11): 1095-1105.
33. Shammas M. A. (2011): Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **14**(1): 28.
34. Shay J. W., Wright W. E. (2011): Role of telomeres and telomerase in cancer. *Seminars in cancer biology*. Academic Press **6**: 349-353.
35. Valvo V., Nucera C. (2019): Coding molecular determinants of thyroid cancer development and progression. *Endocrinology and Metabolism Clinics* **48**(1): 37-59.
36. Verhoeven J. E., Révész D., Wolkowitz O. M., Penninx B. W. (2014): Cellular aging in depression: permanent imprint or reversible process? An overview of the current evidence, mechanistic pathways, and targets for interventions. *Bioessays **36***(10), 968-978.
37. Wang Y., Feigon J. (2017): Structural biology of telomerase and its interaction at telomeres. *Current opinion in structural biology* **47** :77-87.
38. Wyatt H. D., West S. C., Beattie T. L. (2010): InTERTpreting telomerase structure and function. *Nucleic acids research* **38.17**: 5609-5622.
39. Xing M. (2013): Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nature Reviews Cancer* **13**(3): 184-199.
40. Yan H. X., Pang P., Wang F. L., Tian W., Luo Y. K., Huang W., Ba J. M. (2017): Dynamic profile of differentiated thyroid cancer in male and female patients with thyroidectomy during 2000–2013 in China: a retrospective study. *Scientific reports **7***(1): 1-8.
41. Yang J., Gong Y., Yan S., Chen H., Qin S., Gong R. (2019): Association between TERT promoter mutations and clinical behaviors in differentiated thyroid carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Endocrine* **67(1)** :1-14.

42. Yin D. T., Yu K., Lu R. Q., Li X., Xu J., Lei M., Liu, Z. (2016): Clinicopathological significance of TERT promoter mutation in papillary thyroid carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Clinical endocrinology* ***85***(2): 299-305.
43. Yuan X., Larsson C., Xu D. (2019): Mechanisms underlying the activation of TERT transcription and telomerase activity in human cancer: old actors and new players. *Oncogene* **38**(34): 6172-6183.
44. Zhou J., Ding D., Wang M., Cong Y. S. (2014): Telomerase reverse transcriptase in the regulation of gene expression. *BMB reports* **47**(1): 8.

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Mia Nižetić

Datum i mjesto rođenja: 09. 07. 1996., Šibenik

Državljanstvo: Hrvatsko

Završeno obrazovanje:

- rujan 2002. – lipanj 2010. Osnovna škola Brodarica
- rujan 2010. – svibanj 2014. Gimnazija Antuna Vrančića
- listopad 2014. – rujan 2017. Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Preddiplomski studij biologije i kemije (sveučilišna prvostupnica biologije i kemije)
- Listopad 2017. - Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, diplomski studij Molekularne biologije

Prakse i sudjelovanja:

- 2019. Erasmus + stručna praksa na Institutu Biokemije u Grazu pod vodstvom mentora prof. dr. sc. Petera Macherouxa i temom istraživanja aktivacijskog profila dipeptidil peptidaze 3
- 2018. Laboratorijska stručna praksa pod vodstvom dr. sc. Sanje Kapitanović na Institutu Ruđer Bošković s područjem istraživanja molekularno-genetičke osnove nastanka i napredovanja sporadičnih tumora debelog crijeva

Radna iskustva:

- Brojni studentski poslovi tijekom studiranja

Znanja i vještine:

- rad na računalu: dobro poznavanje rada na računalu, poznavanje rada u paketu MS Office: Word, Excel, PowerPoint, Outlook, pretraživanje interneta i stručne literature
- strani jezici: engleski (C1), talijanski (A2)
- komunikativnost, timski rad, upornost, organizacijske sposobnosti, želja i volja za učenjem