

# Protoonkogen RET i karcinomi štitnjače

---

**Vuković, Andro**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:270445>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-11**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija

**Andro Vuković**

7429/BT

**PROTOONKOGEN *RET* I KARCINOMI ŠTITNJAJE**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biologija

**Mentor:** *izv. prof. dr. sc. Reno Hrašćan*

**Zagreb, 2020.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**  
**Znanstveno polje: Biotehnologija**

### Protoonkogen *RET* i karcinomi štitnjače

**Andro Vuković, 0058210824**

**Sažetak:** Karcinom štitnjače najčešći je maligni endokrini tumor. Mnogo gena je uključeno u njegov nastanak, a jedan od njih je protoonkogen *RET* koji kodira za transmembranski receptor RET. Točkaste mutacije protoonkogenog *RET* te njegove fuzije s različitim genima uzrokuju nastajanje mutiranog proteina RET. Kada se na mutirani protein RET vežu faktori rasta, pokreću se različiti signalni putevi kao što su MAPK i PI3K/Akt/mTOR signalni put, čija stalna aktivnost dovodi do nekontroliranog rasta stanica i inhibicije apoptoze te na taj način nastaje tumor. Ovi tumori se dijagnosticiraju opipom i ultrazvukom, a njihovo liječenje se provodi operacijom, terapijom radioaktivnim jodom ili inhibitorima tirozin kinaza (TKI).

**Ključne riječi:** RET receptor, karcinom štitnjače, MAPK signalni put, PI3K signalni put

**Rad sadrži:** 20 stranica, 5 slika, 1 tablica, 25 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici**

**Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Reno Hrašćan

**Datum obrane:** 15.9.2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering  
Laboratory of Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

### *RET* protooncogene and thyroid carcinoma

**Andro Vuković, 0058210824**

**Abstract:** Thyroid carcinoma is the most common endocrine malignancy. Many genes are involved in its formation and one of them is *RET* protooncogene, which encodes a transmembrane receptor RET. Mutant protein RET is created by point mutations or RET fusions. Protein RET binding growth factors will cause abnormal activation of signal pathways, which include MAPK and PI3K/Akt/mTOR signal pathways. Their constant activity leads to uncontrollable cell growth, inhibition of apoptosis and tumour formation. Thyroid cancer diagnosis can be done by palpation or ultrasound and treatment options are operation, radioactive iodine therapy and thyroid kinase inhibitors (TKI).

**Keywords:** RET receptor, thyroid carcinoma, MAPK signaling pathway, PI3K signaling pathway

**Thesis contains:** 20 pages, 5 pictures, 1 table, 25 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Dr. sc. Reno Hrašćan, Assoc. Prof.

**Defence date:** September 15th 2020

## SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD .....   | 1  |
| 2. TEORIJSKI DIO .....  | 2  |
| 2.1. Štitna žlijezda .....  | 2  |
| 2.1.1. Hormoni štitne žlijezde .....  | 2  |
| 2.2. Karcinomi štitne žlijezde .....  | 3  |
| 2.2.1. Karcinogeneza .....  | 4  |
| 2.2.2. Simptomi karcinoma štitnjače .....                                   | 4  |
| 2.2.3. Dijagnoza karcinoma štitnjače .....                                  | 4  |
| 2.2.4. Liječenje karcinoma štitnjače .....                                  | 5  |
| 2.3. Geni povezani s karcinomom štitnjače .....                             | 5  |
| 2.3.1. Protoonkogen <i>RET</i> .....  | 6  |
| 2.3.1.1. Mutacije protoonkogene <i>RET</i> .....                            | 7  |
| 2.3.1.1.1. Gametske mutacije .....  | 7  |
| 2.3.1.1.2. Somatske mutacije .....  | 8  |
| 2.3.1.1.3. Detekcija <i>RET</i> fuzija .....                                | 9  |
| 2.3.1.1.4. <i>RET/PTC</i> u ostalim tumorima .....                          | 10 |
| 2.3.2. Protein <i>RET</i> .....   | 10 |
| 2.3.3. Aktivacija proteina <i>RET</i> .....                                 | 11 |
| 2.3.4. Proteini u interakciji s <i>RET</i> receptorom .....                 | 12 |
| 2.3.5. Signalni putevi .....  | 13 |
| 2.3.5.1. Kaskada protein kinaza aktiviranih mitogenom ( <i>MAPK</i> ) ..... | 13 |
| 2.3.5.2. Signalni put fosfatidilinozitol-3-kinaze ( <i>PI3K</i> ) .....     | 15 |
| 3. ZAKLJUČAK .....  | 18 |
| 4. POPIS LITERATURE .....   | 19 |
| 5. PRILOZI  |    |
| 5.1. Popis kratica  |    |

## 1. UVOD

Štitna žlijezda je endokrina žlijezda koja luči hormone tiroksin (T4) i trijodtironin (T3), a nalazi se ispod grkljana. Ovi hormoni služe za regulaciju intenziteta metabolizma u tijelu. Tumori su posljedica nekontrolirane stanične proliferacije. Oni mogu biti dobroćudni (benigni), potencijalno zloćudni ili zloćudni (maligni). Svaki karcinom je zloćudni tumor. Prvi simptom karcinoma štitnjače je najčešće kvržica na prednjoj strani vrata ili povećani limfni čvor. Ostali simptomi uključuju bol u vratu i promjene u glasu. Dijagnoza se najčešće postavlja na temelju ultrazvuka i aspiracije sitnim iglama, a liječi se operacijom, terapijom radioaktivnim jodom i terapijom inhibitorima tirozin kinaze (Nguyen i sur., 2015). Karcinomi štitnjače dijele se na nekoliko tipova: diferencirani karcinom (papilarni i folikularni), anaplastični karcinom, medularni karcinom i slabo diferencirani karcinom štitnjače (Grimm, 2017).

Protoonkogeni su normalni geni koji kodiraju za protoonkoproteine koji su uključeni u regulaciju staničnog rasta i proliferaciju. Mutacijom protoonkogena nastaju onkogeni koji izazivaju nekontrolirani rast stanica, odnosno pojavu tumora. Protoonkogen *RET* (REarranged during Transfection) nalazi se na kromosomu 10q11.2. Sadrži 21 ekson i kodira za protein RET, stanični receptor koji spada u skupinu tirozin kinaza (Kouvaraki i sur., 2005). Tirozin kinaze prenose fosfatnu skupinu s ATP-a na stanične proteine. Protein RET je eksprimiran u živčanim i endokrinim stanicama, uključujući C stanice u štitnjači, stanice srži nadbubrežne žlijezde, simpatičke i parasimpatičke ganglijske stanice te ganglijske stanice kolona, stanice urogenitalnog trakta i stanice doštitne žlijezde. Protein RET se sastoji od N-terminalnog signalnog peptida, izvanstanične regije (4 ponavljanja koja nalikuju kadherinu, mjesto za vezanje kalcija i domena bogata cisteinom), transmembranske domene i dvije unutarstanične tirozin kinazne domene (Kouvaraki i sur., 2005).

Cilj ovoga rada je opisati utjecaj mutacije u protoonkogenu *RET* na pojavu karcinoma štitne žlijezde.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Štitna žlijezda

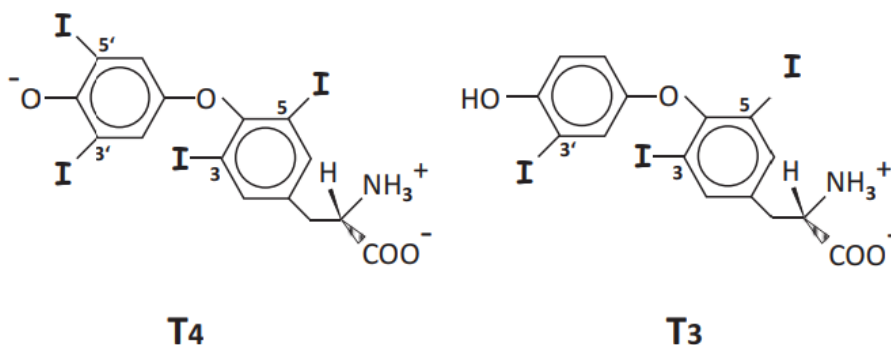
Štitna žlijezda (štitnjača) važna je endokrina žlijezda smještena na osnovici prednjeg dijela grla kod dušnika. Sastoji se od dva režnja u obliku krila i suženja (isthmus) koje ih spaja (Nguyen i sur., 2015). Sadrži veliki broj folikula koji su okruženi vlaknastom kapsulom formirajući septe koje dijele parenhim na lobule. Septe sadrže živce i krvne žile koje opskrbljuju lobule. Svaki od lobula sadrži 20-40 okruglih folikula prosječnog dijametra od 200 mikrometara. Folikuli se sastoje od folikularnih stanica koje okružuju koloid, viskozni materijal koji se pretežno sastoji od prekursora hormona štitnjače tiroglobulina. Folikularne stanice imaju u sredini male jezgre, a neke od njih sadrže zrnatu citoplazmu i nazivaju se Hürthleovim stanicama. Štitnjača također sadrži i parafolikularne (C stanice) koje su derivati neuralnog grebena i ulaze u štitnjaču preko ultimobranhijalnog tjelešca. Parafolikularne stanice tvore nakupine između folikula, a u najvećoj su koncentraciji pronađene unutar srednjih i gornjih lobula (Benyon i Pinneri, 2016).

#### 2.1.1. Hormoni štitne žlijezde

Hormoni koje štitnjača izlučuje su tiroksin (T4), trijodtironin (T3) i kalcitonin (Slika 1). Hipotalamus i hipofiza kontroliraju lučenje hormona T4 i T3. Hipotalamus izlučuje tireotropin-oslobađajući hormon (TRH) koji potiče hipofizu na lučenje tireotropina (tireoidni stimulirajući hormon - TSH). Vežanje TSH za receptor na staničnoj membrani folikularnih stanica stimulira biosintezu T4 i T3. Ovi hormoni kontroliraju metabolizam, sintezu proteina i ugljikohidrata, razvoj i funkcioniranje središnjeg živčanog sustava, normalan rast i razvoj kostiju, kardiovaskularne i bubrežne funkcije (Mondal i sur., 2016).

Kalcitonin proizvode parafolikularne stanice štitnjače. To je peptid sastavljen od trideset i dvije aminokiseline, a njegova je uloga inhibicija resorpcije kosti posredovane osteoklastima i poticanje izlučivanja kalcija pomoću bubrega. Osim kalcija regulira i količinu fosfora u krvi (Pondel, 2000).

Commented [LS1]: nije naveden u popisu literature



**Slika 1.** Kemijska struktura hormona T4 i T3 (Köhrle, 2018)

## 2.2. Karcinomi štitne žlijezde

Karcinom štitnjače je najčešći maligni endokrini tumor. Tipovi karcinoma štitnjače klasificiraju se prema njihovim histološkim karakteristikama. Diferencirani karcinom štitnjače (DTC) dijeli se na papilarni (PTC) i folikularni (FTC). DTC predstavlja većinu svih tipova karcinoma štitnjače s dobrom prognozom. Folikularni adenom je benigni tumor štitnjače. To je čvrsti, homogeni, okrugli ili ovalni tumor okružen vlaknastom kapsulom i česta je neoplazija štitnjače. Većina pacijenata s folikularnim adenomom ima nisku razinu hormona štitnjače (McHenry i Phitayakorn, 2011). Slijedeća grupa je anaplastični karcinom štitnjače (ATC) koji predstavlja 2% svih karcinoma štitnjače. ATC se razlikuje od DTC po tome što tkivo sadrži uglavnom nediferencirane stanice koje imaju jako malo ili nemaju sličnosti s normalnim tkivom štitnjače. Smrtnost kod ovih karcinoma iznosi 90%. Slabo diferencirani karcinom štitnjače (PDTC) sličan je kao ATC, ali je rjeđi i ima također lošu prognozu. Medularni karcinom štitnjače (MTC) potječe iz neuroendokrinih C-stanica. Petogodišnja stopa preživljavanja za pacijente s MTC iznosi 86% (Grimm, 2017).

U zadnja tri desetljeća broj ljudi kojima je dijagnosticiran karcinom štitnjače je dramatično porastao. Razlog tome bi mogla biti bolja mogućnost dijagnosticiranja zbog upotrebe tehnologija kao što su ultrazvuk, računalna tomografija (CT), magnetska rezonanca i pozitronska emisijska tomografija (PET).



Karcinom štitnjače češće se pojavljuje kod žena nego muškaraca u omjeru 3:1 i više je rasprostranjen kod bijelaca, Azijata i populacije Pacifičkih otoka u odnosu na ostale populacije (Nguyen i sur., 2015).

### **2.2.1. Kancerogeneza**

Kancerogeneza je kompleksan proces u više koraka koji se može podijeliti u tri glavne faze: inicijacija, promocija i progresija. Inicijacija uključuje ireverzibilne promjene stanica koje se događaju pod utjecajem tvari koja izaziva mutaciju (mutagen). Promocija uključuje rast stanica iz faze inicijacije. U ovu fazu uključeni su neki epigenetski čimbenici koji utječu na proliferaciju stanica. Rezultat promocije su benigni tumori koji ulaze u fazu progresije. U fazi progresije benigni tumori razvijaju se u maligne. Kancerogeneza je kombinacija promjena u staničnim procesima i neučinkovite aktivnosti mehanizama popravka. Tumorske stanice posjeduju određene karakteristike poput neograničenog potencijala za replikaciju, mogućnosti izbjegavanja prepoznavanja imunskog sustava i inhibicije njegove aktivnosti. Ove stanice također imaju mogućnost širenja u ostala tkiva i metastaziraju (Nowak i sur., 2014).

### **2.2.2. Simptomi karcinoma štitnjače**

Prvi simptom karcinoma je čvor na štitnjači. To je vrlo česta pojava i većina njih je benigna. Čvor na štitnjači je posljedica rasta stanica. Procjenjuje se da 3 – 7 % svjetske populacije ima opipljivi čvor, a učestalost se može povećati do 70 % ako se pacijenti pregledaju ultrazvukom. Otprilike 5 % detektiranih čvorova na štitnjači je maligno, s iznimkom čvorova detektiranih pomoću pozitronske emisijske tomografije kod kojih malignost iznosi do 33 %.

Ostali simptomi karcinoma štitnjače uključuju bezbolno oticanje na prednjoj strani vrata, poteškoće s gutanjem i disanjem te promuklost ili promijenenu u glas (Nguyen i sur., 2015).

### **2.2.3. Dijagnoza karcinoma štitnjače**

Nakon otkrića čvora na štitnjači potrebno je izmjeriti razinu tireotropnog hormona. Ako je razina tireotropnog hormona veća od normalnih vrijednosti, što ukazuje na hiperaktivnu žlijezdu, potrebno je provesti medicinsko snimanje da bi se utvrdilo je li čvor hiperfunktionalan (vrući), izofunktionalan (topli) ili nefunktionalan (hladni) u odnosu na ostatak tkiva.

Za nefunkcionalne će čvorove biti potrebno provesti aspiraciju sitnim iglama. Može se primijeniti uz opip ili ultrazvuk. Preporučuje se ultrazvuk jer je neke čvorove teško opipati (Nguyen i sur., 2015).

#### **2.2.4. Liječenje karcinoma štitnjače**

Karcinom štitnjače može se liječiti operacijom, terapijom radioaktivnim jodom i terapijom inhibitorima tirozin kinaza (TKI). Standardne opcije za liječenje razlikuju se ovisno o tipu i stadiju karcinoma. Opcije za operaciju primarnih tumora uključuju hemitireoidotomiju, s ili bez operacije isthmusa (suženja), djelomičnu tireoidotomiju (ostavlja manje od 1 g tkiva štitnjače blizu rekurentnog laringealnog živca) i potpunu tireoidotomiju (uklanjanje svog vidljivog tkiva štitnjače). Radioaktivni jod koristi se u kombinaciji s tireoidotomijom kako bi se u potpunosti uklonili ostatci karcinoma. Radioaktivni jod ulazi u stanice štitnjače pomoću natrij jodid transportera i emitira beta zračenje kratke valne duljine te tako uzrokuje akutnu smrt stanica. Inhibitori tirozin kinaza su vandetanib, karbozantinib i sorafenib. Vandetanib djeluje na RET, EGFR i VEGF receptore. Karbozantinib djeluje na MET, VEGF receptor 2 i RET receptor. Sorafenib djeluje na mnogo proteina kinaza kao što su RET, BRAF divlji tip i V600E mutantni tip te VEGF receptori 2 i 3 (Nguyen i sur., 2015).

#### **2.3. Geni povezani s karcinomom štitnjače**

Mnoge genske promjene povezane su sa signalnim putevima tirozin kinaza, uključujući *RET*, *RAF* i *RAS* gene, koji dovode do aktivacije tirozin kinazne domene. *RET/RAS/RAF* put je povezan s kaskadom epidermalnog faktora rasta koju aktiviraju receptori što dovodi do sinteze vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) i VEGF receptora. Mutacije u *BRAF* onkogenu koje mijenjaju ili povećavaju aktivnost proteina najčešće su genske promjene kod pacijenata s papilarnim karcinomom, a događaju se u 45 % do 70 % osoba s ovim tumorom. Prekomjerna ekspresija VEGF i ostalih faktora rasta često je pronađena u tumorima štitnjače, naročito kod tumora s mutacijama u *BRAF* genu (Nguyen i sur., 2015). Postoji povezanost između onkogenog genotipa i histopatološkog fenotipa. Primjerice, mutacije u *BRAF*, *PAX8* i *PPARG* genima česte su kod FTC, a mutacije u *RAS* genima kod FTC ili kod folikularnevarijante PTC (fvPTC). Točkasta mutacija u *RAS* genima (*H-RAS*, *N-RAS* i *K-RAS*) može uzrokovati nastanak folikularnog adenoma, FTC (40 – 53 %), PTC (0 – 20 %), fvPTC (17 – 25 %) te slabo diferenciranog i anaplastičnog karcinoma štitnjače (20 – 60 %). *PAX8-PPARG* fuzijski protein je produkt kromosomske translokacije t(2;3)(q13;p25) te je povezan s folikularnim

karcinomom. Kada određeni geni mutiraju, tumor se razvija u agresivniji karcinom štitnjače. Neki od tih slučajeva su: mutacije u *RAS* genima (25 % u PDTC), mutacije *PIK3CA* gena, točkasta mutacija p.V600E u *BRAF* genu, mutacije *CTNNB1* ( $\beta$ -katenin) gena i mutacije u *TP53* tumor supresijskog gena. Navedene mutacije mogu sudjelovati u dediferencijaciji tumora (Luzón-Toro i sur., 2019). Mutacije inaktivacije ili delecije tumor supresijskog gena *PTEEN* aktiviraju PI3K/AKT signalni put i čine gensku osnovu za nastanak tumorskih stanica folikularnog karcinoma kod Cowden sindroma. MAPK i PI3K/AKT signalni putevi uključeni su u nastanak diferenciranog papilarnog i folikularnog karcinoma. Nakupljanjem genskih promjena oba signalna puta postaju aktivna i tumor se razvija u slabo diferencirani i anaplastični karcinom (Younis, 2017).

### 2.3.1. Protoonkogen *RET*

Protoonkogen *RET* sastoji se od 21 eksona i nalazi se na kromosomu 10q11.2 te kodira za receptor tirozin kinazu. Ekspirira se u C-stanicama štitnjače, ali ne i u normalnim folikularnim stanicama (Younis, 2017). Otkriven je tijekom transfekcije NIH/3T3 stanica ljudskog limfoma odakle potječe i njegovo ime (REarranged during *Transfection*) (Li i sur., 2019). *RET* može biti aktiviran fuzijom s različitim genima tako da se 3' tirozin kinazna domena *RET* gena spaja s 5' domenom konstitutivno ekspimiranog stranog gena. Ova fuzija rezultira stalnom ekspresijom izmjenjenog gena *RET*. Ove promjene su prvobitno bile nađene kod papilarnog karcinoma pa su dobile naziv RET/PTC.

Točkasta mutacija protoonkogen *RET* rezultira nereguliranom aktivacijom receptora. Somatske i gametske mutacije protoonkogen *RET* imaju važnu ulogu u razvoju obiteljskih i sporadičnih oblika medularnog karcinoma (Younis, 2017).

Ekspresija protoonkogen *RET* regulirana je faktorima koji se vežu na DNA i reguliraju bazalnu transkripciju (npr. SPI, SP3 i EGR1) i/ili reguliraju ekspresiju u određenim tkivima (npr. SOX10, PAX3, NKX2-1 i HOXB5) vezanjem uzvodnih promotorskih i pojačivačkih sekvenci. Razine transkripta se modulira pojačivačima i elementima koji vežu nuklearne receptore unutar introna gena *RET* te pomoću mikroRNA (miRNA) (Mulligan, 2014).

### 2.3.1.1. Mutacije protoonkogeno *RET*

Mehanizam aktivacije protoonkogeno *RET* se razlikuje i specifičan je za određeni tip karcinoma. MTC sadrži točkaste mutacije, dok su kromosomska preuređenja karakteristična za PTC. Ovaj dvostruki mehanizam aktivacije onkogeno je vidljiv i kod drugih gena koji su povezani s nastankom karcinoma štitnjače (npr. *BRAF*) (Romei i sur., 2016).

1993. godine otkriveno je da točkasta mutacija u protoonkogeno *RET* uzrokuje MTC. Od tada je opisano nekoliko mutacija koje uzrokuju MEN2 (Luzon-Toro i sur., 2019). Multipla endokrina neoplazija tipa 2 (MEN2) autosomni je dominantni nasljedni sindrom karcinoma kojeg uzrokuje missense mutacija u protoonkogeno *RET*. Često se pojavljuje u MTC i postoji u dvije varijante: MEN2A i MEN2B. Kod pacijenata s MEN2A identificirano je preko 100 različitih točkastih mutacija, duplikacija, insercija, delecija i fuzija protoonkogeno *RET* dok su kod pacijenata s MEN2B identificirane samo dvije točkaste mutacije (kodoni 918 i 883) (Raue i Frank-Raue, 2018).

#### 2.3.1.1.1. Mutacije u stanicama zametnih linija

Iako je većina poznatih nasljednih predispozicija za neoplaziju uzrokovana mutacijama gubitka funkcije u genima za supresiju tumora, *RET* mutacije predstavljaju mutacije dobitka funkcije *RET* protoonkogeno u stanicama zametnih linija. One su u MEN2A sindromu većinom posljedica mutacija u domeni bogatoj cisteinom (Larouche i sur., 2019). Supstitucije cisteina (C609, C611, C618, C620, C630 i C634) za bilo koju aminokiselinu pronađene su kod više od 95 % pacijenata koji boluju od MEN2A i česte su u FMTC. Ove supstitucije dovode do pojave nesparenog cisteinskog ostatka koji može formirati intramolekulske veze i inducirati dimerizaciju receptora neovisnu o ligandu te *RET* signalizaciju. Supstitucije C634 povezane su s visokim rizikom feokromocitoma i paratireoidne hiperplazije te se pojavljuju kod više od 85 % pacijenata koji boluju od MEN2A. U rijetkim slučajevima, mutacije povezane s ovim cisteinskim ostacima (C609, C611, C618 i C620) mogu uzrokovati i dobitak i gubitak funkcije te se nazivaju Janus mutacijama. Iako ove mutacije dovode do stalne aktivacije proteina *RET* i povezane su s fenotipovima MEN2A ili FMTC, mutirani proteini su slabo sazreli i manje se ekspimiraju na staničnoj površini. U tkivima koja zahtjevaju aktivaciju proteina *RET* pomoću GDNF, ove mutacije rezultiraju ekspresijom slabo sazrelog proteina *RET* što dovodi do mutacije gubitka funkcije koje se javljaju kod Hirschsprungove bolesti (Mulligan, 2014).

Mutacije intracelularnih tirozin kinaznih domena poput mutacija u egzonu 13 (kodon 768), egzonu 14 (kodon 804) i egzonu 15 (kodon 891) u stanicama zametnih linija dovode do

razvoja FMTC (obiteljski MTC). Mutacije u egzonu 13 (kodoni 790 i 791) dovode do razvoja MEN2A i FMTC (Larouche i sur., 2019). Ove mutacije imaju različite učinke. Na primjer, supstitucije u kodonu 804 utječu na vezanje ATP-a na RET protein, a supstitucije na kodonima 791 i 891 dovode do fosforilacije aktivnih RET monomera (Mulligan, 2014). Mutacija u intracelularnoj tirozin kinaznoj domeni na egzonu 16 (kodon 918) odgovorna je za više od 95 % slučajeva MEN2B s lošom prognozom. Mutacija na egzonu 15 (kodon 883) povezana je s malim brojem slučajeva MEN2B (Larouche i sur., 2019). Mutacija na kodonu 918 mijenja metionin u treonin, a mutacija na kodonu 883 mijenja alanin u fenilalanin. Ovi aminokiselinski ostatci okružuju aktivacijsku petlju RET kinaze i povezani su s konformacijskim promjenama proteina koje smanjuju autoinhibiciju, povećavaju kinaznu aktivnost i vezanje ATP-a te mijenjaju vezanje supstrata (Mulligan, 2014).

#### 2.3.1.1.2. Somatske mutacije

Somatska točkasta mutacija protoonkogeno *RET* (najčešće *RET* M918T mutacija) povezana je s nastankom sporadičnog MTC (Raue i Frank-Raue, 2018). Mutacija u kodonu 664 protoonkogeno *RET*, koja utječe na protein kinaznu domenu proteina RET zamjenom treonina u metionin, nađena je kod pacijenata koji boluju od MEN2B kao i u šest različitih tumora (Luzón-Toroi sur., 2019). Kada je riječ o medularnom karcinomu 75 % slučajeva su sporadične, a 43 – 65 % od tih slučajeva su somatske *RET* mutacije, obično u egzonu 16 (kodon 918) (Larouche i sur., 2019).

Nenasljedno somatsko preuređenje *RET* gena karakteristično je za PTC. Riječ je o inverziji s točkom loma u intronu 11 (Kouvaraki i sur., 2005). Ova preuređenja događaju se kada se C-terminalna kinazna domena proteina RET poveže s N-terminalnim krajem određenih genskih produkata. Tako *RET* dolazi pod kontrolu promotora gena s kojim je povezan i događa se nenormalna ekspresija proteina u folikularnim stanicama štitnjače (Abdullah i sur., 2019). Ova preuređenja otkrivena su 1987. godine kada su Fusco i koautori analizirali DNA koja je ekstrahirana iz pet papilarnih karcinoma i dvije metastaze. Tada je otkrivena RET/PTC1 fuzija, a nedugo zatim i RET/PTC3.

Proteini s kojima se RET povezuje sadrže domene sa zavijenim zavojnicama. Ove domene induciraju dimerizaciju i aktivaciju kinaznih domena. Zahvaljujući ovoj interakciji RET/PTC protein može stvarati dimere koji su potrebni za onkogenu aktivaciju. Međutim, za razliku od normalnog RET proteina koji je transmembranski protein povezan sa staničnom membranom, RET/PTC onkoproteini su smješteni u citosolnom dijelu (Romei i sur., 2016).

Postoji barem 13 različitih fuzija u PTC. Dvije najčešće su CCDC6-RET (RET/PTC1) i NCOA4-RET (RET/PTC3) koje su odgovorne za više od 90 % mutacija. Ostale RET fuzije u PTC su RET/PTC2, RET/PTC4 do RET/PTC9, ELKS-RET, PCM1-RET, RFP-RET i HOOK3-RET (Tablica 1). RET fuzije u MTC su rijetka pojava.

RET fuzije česte su kod pacijenata koji su bili izloženi radioaktivnom zračenju. RET preuređenja prisutna su u 84 % pacijenata s PTC i 45 % pacijenata s folikularnim adenomom. Dokazano je da je RET/PTC1 povezan s blažim simptomima, a RET/PTC3 s agresivnijim tumorskim ponašanjem (Li i sur., 2019). Osim radioaktivnog zračenja, bitan faktor je i dob. RET fuzije se češće pojavljuju kod djece nego kod odraslih. Tvari koje proizvode slobodne radikale također induciraju RET/PTC (npr. vodikov peroksid) (Romei i sur., 2016).

**Tablica 1.** RET/PTC onkoproteini povezani s karcinomom štitnjače (Luzón-Toroi sur., 2019)

| RET/PTC onkoprotein | Fuzijski partner   | Kromosomska promjena   |
|---------------------|--------------------|------------------------|
| RET/PTC1            | CCDC6              | inv10(q11.2;q21)       |
| RET/PTC2            | PRKAR1A            | t(10;17)(q11.2;q23)    |
| RET/PTC3            | NCOA4 (RFG, ARA70) | inv10(q11.2;q10)       |
| RET/PTC4            | NCOA4 (RFG, ARA70) | inv10(q11.2;q10)       |
| RET/PTC5            | RFG5 (GOLGA5)      | t(10;14)(q11.2;q32)    |
| RET/PTC6            | TRIM24             | t(7;10)(q32-q34;q11.2) |
| RET/PTC7            | RFG7 (TRIM33)      | t(1;10)(p13;q11.2)     |
| RET/PTC8            | KTN1               | t(10;14)(q11.2;q22.1)  |
| RET/PTC9            | RFG9               | t(10;18)(q11.2;q21-22) |
| RET/ELKS            | ELKS (RAB6IP2)     | t(10;12)(q11.2;p13.3)  |
| RET/PCM1            | PCM1               | t(8;10)(q21-22;q11.2)  |
| RET/RFP             | RFP (TRIM27)       | t(6;10)(p21;q11.2)     |
| RET/HOOK3           | HOOK3              | t(8;10)(p11.21;q11.2)  |

### 2.3.1.1.3. Detekcija RET fuzija

Postoje različite metode za detekciju RET fuzija poput florescentne hibridizacije *in situ* (FISH), real-time PCR i imunohistokemije (IHC). Međutim, sve ove metode ograničene su određenim faktorima (npr. broj gena koji se može detektirati). Sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *Next Generation Sequencing*; NGS) nudi istovremenu analizu više gena koja

rezultira detekcijom više mutacija, uključujući fuzije gena. Nedostatak ove metode je visoka cijena po uzorku. Rješenje je ciljano NGS, odnosno sekvenciranje određene skupine relevantnih gena. Osjetljivost ove metode je veća nego osjetljivost FISH metode. RNA sekvenciranje koristi se za detaljniju analizu preuređenja gena. Tako se mogu detektirati fuzije u jako dugačkim intronima koje je nemoguće detektirati pomoću sekvenciranja DNA. Ova metoda također dokazuje da se fuzionirani gen eksprimira u mRNA. Kao nova metoda detekcije spominje se tekuća biopsija (Li i sur., 2019).

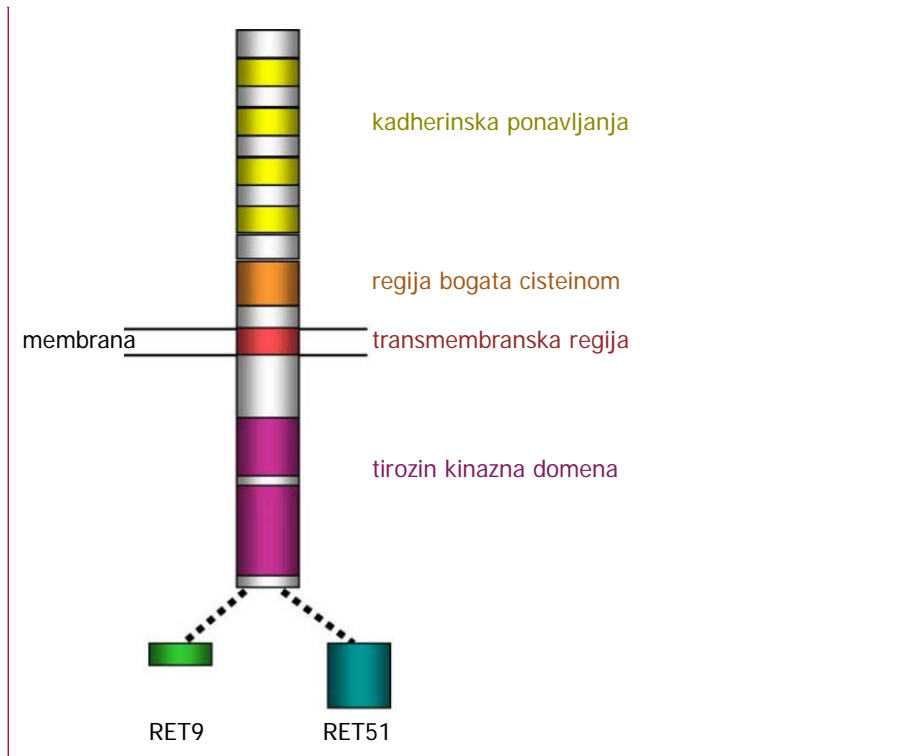
#### 2.3.1.1.4. RET/PTC u ostalim tumorima

Osim u PTC, RET fuzije pronađene su u mnogim drugim tumorima i drugim bolestima. Mnogobrojna RET/PTC preuređenja pronađena su kod pacijenata s Hashimotovim tireoiditisom, uglavnom koristeći visoko osjetljive metode poput PCR reverznog transkripta. RET/PTC preuređenja također su pronađena u folikularnom adenomu, a u rijetkim slučajevima i kod ATC te PDTC. Neočekivana fuzija između *RET* i *MYH13* gena uočena je kod jednog pacijenta koji boluje od MTC. RET/PTC preuređenja ustanovljena su u 3 od 15 (20 %) slučajeva primarnog peritonealnog karcinoma. Nekoliko slučajeva kromosomskih translokacija koje uzrokuju fuziju tirozin kinazne domene gena *RET* i *FGFR3* ili *BCR* gena opisani su kod hematopoetskih tumora. Kromosomska preuređenja gena *RET* pronađena su u 1 % slučajeva plućnih adenokarcinoma. Ti slučajevi većinom uključuju fuziju gena *RET* s *KIF5B* genom, ali i s *CCDC6*, *NCOA4*, *TRIM33*, *CUX1*, *KIAA1468* i *ACBD5* genima (Romei i sur., 2016).

#### 2.3.2. Protein RET

Proteinski produkt protoonkogena *RET* je transmembranski receptor. RET receptor sastoji se od ekstracelularne regije koja sadrži četiri kadherinska ponavljanja i regiju bogatu cisteinom, transmembranske regije i intracelularne regije koja sadrži dvije tirozin kinazne domene (Slika 2). Kadherini su proteini stanične adhezije ovisni o  $Ca^{2+}$  čija adhezivna svojstva ovise o ponovljenim modulima, odnosno kadherinskim domenama koje se sastoje od oko 110 ostataka u ekstracelularnoj regiji. Dvadeset i sedam od dvadeset i osam cisteinskih ostataka u regiji bogatoj cisteinom sačuvano je među vrstama što ukazuje na ključnu ulogu u formiranju točno određenih disulfidnih veza između tih ostataka. Ekstracelularna regija sadrži nekoliko glikolizacijskih mjesta. Sasvim glikolizirani RET protein veličine 170 kDa je zreli oblik receptora na staničnoj membrani. RET protein veličine 150 kDa je intermedijer kojem nedostaje glikolizacija i prisutan je samo u endoplazmatskom retikulumu. Alternativnim izrezivanjem

moгу nastati tri oblika proteina RET koji se razlikuju u duljini C-terminalnog kraja za 51, 43 i 9 aminokiselina (RET51, RET43 i RET9) (Arighi i sur., 2005).



**Commented [LS2]:** slika mora biti prevedena na hrvatski ubačena prevedena

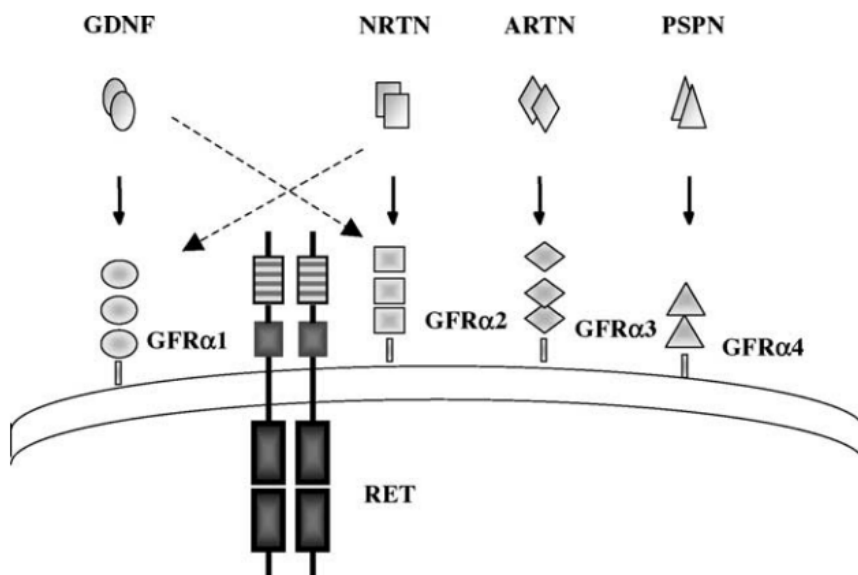
**Slika 2.** Struktura proteina RET (Arighi i sur., 2005)

### 2.3.3. Aktivacija proteina RET

RET je receptor za ligande iz porodice GDNF, odnosno GFL-ove (GDNF, neurturin (NRTN), artemin (ARTN) i persefin (PSPN)) (Baloh i sur., 2000). Aktivacija RET proteina započinje vezanjem GFL-ova u kompleks s koreceptorom glikozil-fosfatidilinozitolu (GPI). Koreceptori pripadaju GDNF receptor- $\alpha$  (GFR $\alpha$ ) obitelji proteina (GFR $\alpha$ 1-GFR $\alpha$ 4) (Airaksinen i sur., 1999). GFL tvori kompleks s GFR $\alpha$ . Taj kompleks spaja dvije molekule RET proteina i time pokreće trans-autofosforilaciju specifičnih tirozinskih ostataka (Tyr900, Tyr905, Tyr981, Tyr1015, Tyr1062 i Tyr1096) unutar tirozin kinazne domene svake RET molekule (Slika 3). Unutar aktivacijske petlje kinazne domene nalaze se Tyr900 i Tyr905 ostatci. Za njih se masenom spektrometrijem pokazalo da su mjesta za autofosforilaciju (Kawamoto i sur., 2004).



Fosforilacija Tyr905 ostatka stabilizira aktivnu konformaciju kinaze koja rezultira u autofosforilaciji ostalih tirozinskih ostataka koji su pretežno locirani u C-terminalnom dijelu molekule (Arighi i sur., 2005). Nakon autofosforilacije, RET dimer uključuje se u lipidne splavi (dio membrane bogat kolesterolima) gdje se adaptorski i signalni proteini vežu za tirozin kinazne domene. Tada se signalni proteini vežu za priključna mjesta, prvenstveno fosfotirozin 1062 (pY1062) i pY1096, što dovodi do aktivacije signalnih puteva (Li i sur., 2019). Ovi signali važni su za mnogo funkcija posredovanih RET receptorom, uključujući razvoj bubrega i živčanog sustava, opstanak neurona i diferencijaciju te održavanje matičnih stanica spermatogonija (Mulligan, 2014).



**Slika 3.** Ligandi iz porodice GDNF i njihovi receptori (Arighi i sur., 2005)

#### 2.3.4. Proteini u interakciji s RET receptorom

Fosforilirani tirozinski ostatci služe kao mjesta za vezanje adaptorskih i signalnih proteina. Tyr905, Tyr981, Tyr1015 i Tyr1096 su mjesta za vezanje GRB7/GRB10, SRC, fosfolipaze C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) i GRB2. Tyr1062 je mjesto za vezanje mnogih adaptorskih ili efektorskih proteina kao što su SHC, SHCC, FRS2, IRS1/2, DOK1, DOK4/5, DOK6, ENIGMA, PKC $\alpha$  i

SHANK3. Aktivacija PKC $\alpha$  negativno modulira aktivnost proteina RET. Nakon stimulacije ligandima se na fosforiliranom Tyr1062 preko SHC sastavljaju dva proteinska kompleksa, od kojih jedan dovodi do aktivacije MAPK pomoću GRB2/SOS, a drugi do aktivacije PI3K/Akt signalnog puta pomoću GRB2/GAB. Ovaj kompleks se također može sastaviti na fosforiliranom Tyr1096. Tako se PI3K aktivira alternativnim putem pomoću GDNF. Aktivacija MAPK i PI3K/Akt signalnih puteva preko Tyr1062 je važna za aktivaciju transkripcijskih faktora CREB i NF $\kappa$ B. BMK1 se također aktivira preko Tyr1062. Vežanje SHC, FRS2, IRS1/2 i DOK proteina na Tyr1062 ovisi o fosforilaciji ovog ostatka i posredovano je domenama proteina PTB ili SH2 koje vežu fosfotirozin. Nasuprot tome, ENIGMA i SHANK3 vežu Tyr1062 u RET9 bez obzira na fosforilaciju. Tyr752 i Tyr928 služe kao mjesta za vežanje STAT3. RET/PTC fosforilira i aktivira PDK1 i STAT1 (Arighi i sur., 2005).

Translokacija proteina RET u lipidne splavi potiče vežanje SRC kinaze i povećava mitogenezu i preživljavanje neurona. Aktivacija STAT3 je povezana s proliferacijom i transformacijom stanica. Protein kinaza A fosforilira RET u S696 što dovodi do aktivacije RAC1 GTPaze. Fosforilacija na ovom mjestu također ometa fosforilaciju na Y687 što smanjuje interakcije između RET i PTPN11 te utječe na sposobnost proteina RET da potakne diferencijaciju i preživljavanje živčanih stanica. RET također direktno veže i aktivira FAK preko njegove FERM domene i  $\beta$ -katenin interakcijom s njegovim armadillo ponavljanjima (Mulligan, 2014).

### **2.3.5. Signalni putevi**

RET aktivira nekoliko signalnih puteva među kojima su MAPK signalni put (kaskada protein kinaza aktiviranih mitogenom), PI3K/Akt signalni put te p38MAPK i JNK signalni putevi (Arighi i sur., 2005).

#### **2.3.5.1. Kaskada protein kinaza aktiviranih mitogenom (MAPK)**

Aktivacija MAPK signalnih puteva započinje aktivacijom receptora što dovodi do aktivacije proteina koji vežu GTP (G-proteini). Za to su potrebni proteinski adaptori vezani na receptor. Ova proteinska kaskada sadrži više razina protein kinaza (Slika 4). MAPKKKK

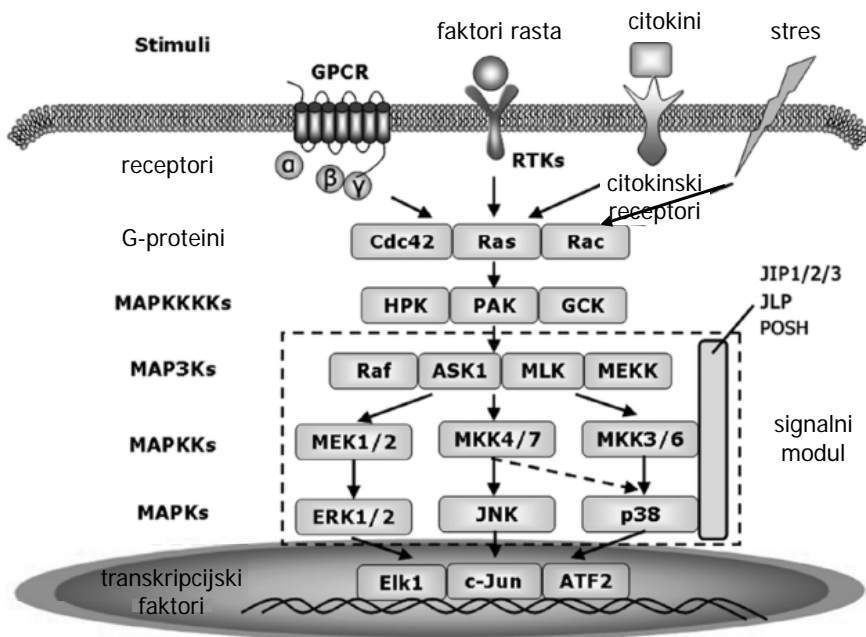
fosforiliraju i aktiviraju MAPKKK (MAP3K) koji fosforiliraju i aktiviraju MAPKK. MAPKK aktiviraju MAPK koji fosforiliraju svoje supstrate (Zhao i sur., 2015).

U tumorskoj stanici RET/PTC fuzija omogućava vezanje proteinskog adaptoru SHC na RET/PTC onkoprotein. Vezanje faktora rasta na RET/PTC onkoprotein dovodi do aktivacije kinaze Ras (Abdullah i sur., 2019). Ras aktivira velik broj molekula koje induciraju invazivna svojstva tumorskih stanica. Ras također aktivira Raf kinazu koja je ključni nizvodni citosolni Ras efektor. Aktivacija Raf kinaze uključuje seriju visoko reguliranih metaboličkih koraka, počevši od jačanja unutarnje stanične membrane pomoću Ras proteina. Kada je Raf aktiviran, može se povezati nizvodno s ostalim kinazama među kojima su i MEK-1 i MEK-2. Za aktivaciju Raf i Ras proteina potrebna je aktivacija enzima s protein fosfataznom aktivnosti koji se zove SRC-kinaza. Ona fosforilira ili defosforilira određene ostatke aminokiselina koje se nalaze unutar Raf zona i reguliraju njegovo aktivno/inaktivno stanje. Od tri izoforme Raf proteina, B-Raf predstavlja najveću aktivnost u usporedbi s A-Raf i C-Raf. B-Raf je također najjači aktivator MEK-1 kinaze koja je ERK efektor. MEK-1 protein je protein kinaza s dvostrukom aktivnošću jer može fosforilirati serinske i tirozinske ostatke. Kada B-Raf aktivira MEK-1 događa se nizvodna aktivacija ERK efektoru koji je serin/treonin kinaza koja fosforilira različite proteine. Hiperaktivacija signalne kaskade koja regulira ERK može dovesti do zaustavljanja staničnog ciklusa. Međutim, ako postoji odstupanje u bilo kojoj sekvenci signalne kaskade može se inducirati tumorska transformacija stanice. Ovaj signalni put se naziva RET/Ras/Raf/MEK/ERK signalni put (Slika 4) (Mondragon-Teran i sur., 2016).

JNK pripada protein kinazama koje se aktiviraju stresom (UV zračenje, vrućina, toksini), ali se također može aktivirati i pomoću faktora rasta. Kod sisavaca, tri gena kodiraju za JNK: JNK1, JNK2 i JNK3, a oni se nalaze na različitim kromosomima. Postoji najmanje deset izoformi ovog proteina: JNK1 kodira za četiri, JNK2 također za četiri i JNK3 za dvije izoforme. One nastaju alternativnim izrezivanjem mRNA. JNK pripada MAPK skupini i aktiviraju ga dva uzvodna MAPKK proteina: MKK4 i MKK7. Oni fosforiliraju JNK na tirozinskim i treoninskim ostacima što dovodi do njegove aktivacije. Njih aktiviraju Raf, ASK1, MLK i MEKK1/4 koji pripadaju skupini MAP3K. Obitelj Rho GTP-aza aktivira spomenute MAP3K. U tu obitelj se ubrajaju: CDC42, Rac, Ras i RhoA. Aktivirani JNK se transportira u jezgru i fosforilira različite transkripcijske faktore poput: c-Jun, JunB, JunD, ATF2, STAT3 i p53 (Slika 4). Ovaj signalni put ima dvije uloge: apoptoza i nastanak tumora (Zhao i sur., 2015).

p38a je bio prvi otkriveni član obitelji p38 MAPK (protein veličine 38 kDa). Nakon njega otkriveni su p38β, p38γ i p38δ. Aktivaciju ovih kinaza vrše MKK3 i MKK6. MKK6 može fosforilirati sva četiri člana obitelji p38 MAPK, a MKK3 aktivira sve osim p38β. MKK6 i MKK3

imaju visoku specifičnost za p38 MAPK. p38a se može fosforilirati i pomoću MKK4. MAP3K koje su uključene u ovaj signalni put (fosforiliraju MKK3 i MKK6) su: ASK1, DLK1, TAK1, TAO1 i 2, TPL2, MLK3, MEKK3 i 4 te ZAK1. Neke od MAP3K koje aktiviraju p38 MAPK signalni put također mogu aktivirati i JNK signalni put. Regulacija MAP3K kinaza uključuje fosforilaciju kinaza iz obitelji STE20 i vezanje G-proteina iz obitelji Rho te mehanizme ubikvitinacije (Cuadrado i Nebreda, 2010).



Slika 4. Kaskada protein kinaza aktiviranih mitogenom (MAPK) (Zhao i sur., 2015)

### 2.3.5.2. Signalni put fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K)

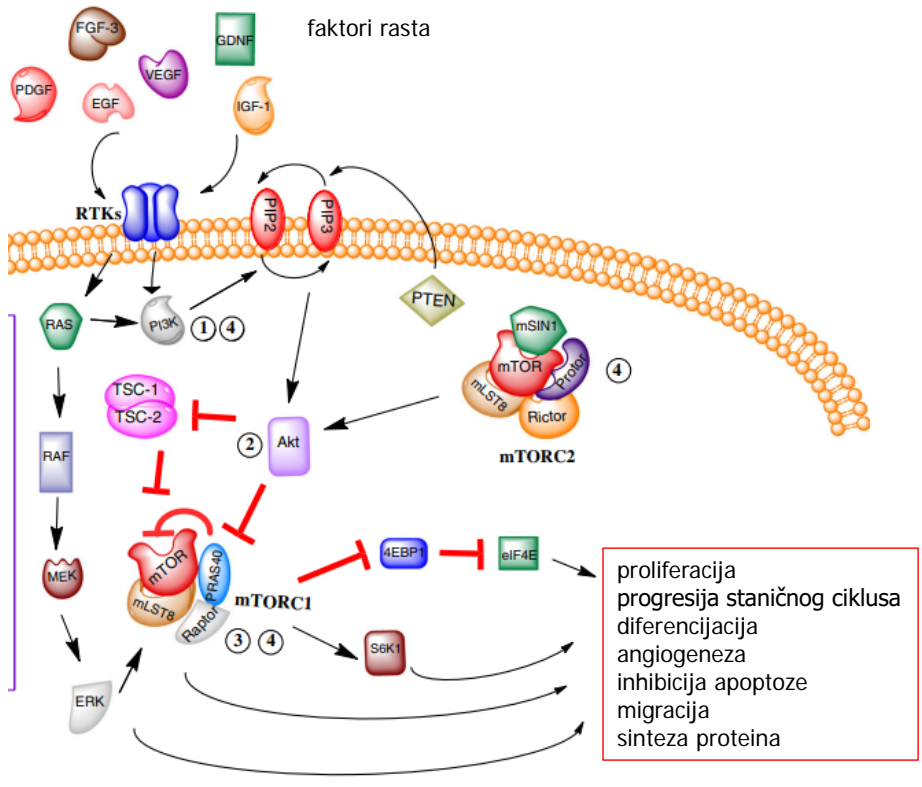
Ovaj signalni put također se aktivira stimulacijom receptor tirozin kinaza faktorima rasta. Aktivacijom receptora aktivira se PI3K i katalizira konverziju fosfatidilinozitol-4,5-difosfata (PIP2) u fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (PIP3) te aktivira Akt. Inaktivacija negativnih regulatora mTOR-a (TSC2 i PRAS40) mu omogućuje da provede svoje višestruke funkcije, a PTEN je negativni regulator koji inhibira Akt i time prevodi PIP3 u PIP2 (Slika 5).

mTOR postoji u dva multiproteinska kompleksa: mTOR kompleksi 1 i 2 (mTORC1 i mTORC2). Prvi kompleks sastoji se od mTOR, LST8 sisavaca (mLST8), PRAS40 i raptor.

Njegovom aktivacijom dolazi do fosforilacije 4EBP1 i S6K1. Oni su zaduženi za regulaciju transkripcije i translacije gena uključenih u stanični rast. 4EBP1 se veže na eukariotski inicijacijski faktor 4E (eIF4E) i time sprječava inicijaciju translacije mRNA. Fosforilirani 4EBP1 ima manji afinitet za eIF4E i time može doći do inicijacije translacije. Fosforilacija S6K1 također inducira translaciju mRNA fosforilacijom ili vezanjem proteina. Aktivacija mTORC1 omogućuje translaciju mRNA tumorskih gena što dovodi do napredovanja staničnog ciklusa, diferencijacije stanica, stanične smrti, angiogeneze i migracije (Slika 5).

mTORC2 sastoji se od mTOR, mLST8, mSIN1, proror i rictor. On fosforilira Ser473 ostatak Akt-a što dovodi do potpune aktivacije Akt-a i stimulacije mTORC1 te regulira fosforilaciju PKCa. Pretpostavlja se da kontrolira organizaciju citoskeleta, odvijanje staničnog ciklusa i preživljavanje stanica (Slika 5).

Iz navedenog možemo zaključiti da PI3K/Akt/mTOR signalni put kontrolira proliferaciju stanica, staničnu smrt i angiogenezu. Zbog toga neprikladna aktivacija ovog puta može izazvati karcinom (Manfredi i sur., 2014).



Slika 5. PI3K/Akt/mTOR signalni put (Manfredi i sur., 2014)

### 3. ZAKLJUČAK

Karcinom štitnjače najčešći je maligni endokrini tumor. Postoji nekoliko tipova karcinoma štitnjače među kojima su papilarni (PTC), folikularni (FTC), medularni (MTC), anaplastični (ATC) i slabo diferencirani karcinom štitnjače (PDTC). Od njih su najčešći papilarni i folikularni karcinom. Benigni tumor štitnjače naziva se folikularni adenom.

Postoji mnogo gena uključenih u razvoj karcinoma štitnjače, a jedan od njih je protoonkogen *RET*. Protoonkogen *RET* ima normalnu funkciju u stanicama, odnosno kodira za protein RET koji ima ulogu transmembranskog receptora, međutim ako mu se na neki način poremeti struktura, odnosno dođe do mutacije, on može biti odgovoran za razvoj karcinoma. Mutacije protoonkogena *RET* koje su odgovorne za razvoj karcinoma štitnjače mogu biti točkaste mutacije koje izazivaju MTC (mutacije u stanicama zametnih linija i somatskim stanicama)) i fuzije protoonkogena *RET* s drugim genima koje najčešće uzrokuju nastanak PTC, a u rijetkim slučajevima može doći i do nastanka MTC. Dvije najčešće fuzije su RET/PTC1 i RET/PTC3. Iako je normalni RET protein smješten na membrani, RET/PTC onkoprotein je smješten u citosolnom dijelu. Vežanje faktora rasta na mutirani RET protein uzrokuje nenormalnu aktivaciju signalnih puteva kao što su MAPK i PI3K/Akt/mTOR signalni put. Stalna aktivnost ovih puteva dovodi do nekontroliranog odvijanja staničnog ciklusa, proliferacije i inhibicije apoptoze.

Dijagnoza karcinoma štitnjače postavlja se opipom kvržice na štitnjači ili ultrazvukom, a liječenje se provodi operacijom, terapijom radioaktivnim jodom ili pomoću inhibitora tirozin kinaza (TKI). Danas su odobreni mnogi inhibitori tirozin kinaza poput vandetaniba, karbozantiniba i sorafeniba u svrhu liječenja spomenutih bolesti.

#### 4. POPIS LITERATURE

1. Abdullah M. I., Junit S. M., Ng K. L., Jayapalan J. J., Karikalan B., Hashim O. H. (2019) Papillary Thyroid Cancer: Genetic Alterations and Molecular Biomarker Investigations. *International Journal of Medical Sciences* **16**: 450 – 460
2. Airaksinen M. S., Titievsky A., Saarma M. (1999) GDNF Family Neurotrophic Factor Signaling: Four Masters, One Servant? *Molecular and Cellular Neuroscience* **13**: 313 – 325
3. Arighi E., Borrello M. G., Sariola H. (2005) RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **16**: 441 – 467
4. Baloh R. H., Enomoto H., Johnson E. M., Milbrandt J. (2000) The GDNF family ligands and receptors — implications for neural development. *Current Opinion in Neurobiology* **10**: 103 – 110
5. Beynon M. E., Pinneri, K. (2016) An Overview of the Thyroid Gland and Thyroid-Related Deaths for the Forensic Pathologist. *Academic Forensic Pathology* **6**: 217 – 236
6. Cuadrado A., Nebreda A. R. (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochemical Journal* **429**: 403 – 417
7. Grimm D. (2017) Current Knowledge in Thyroid Cancer-From Bench to Bedside. *International Journal of Molecular Sciences* **18**: 1529
8. Kawamoto Y., Takeda K., Okuno Y., Yamakawa Y., Ito Y., Taguchi R., Kato M., Suzuki H., Takahashi M., Nakashima I. (2004) Identification of RET Autophosphorylation Sites by Mass Spectrometry. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 14213 – 14224
9. Köhrle J. (2018) Thyroid Hormones and Derivatives: Endogenous Thyroid Hormones and Their Targets. *Thyroid Hormone Nuclear Receptor* 85 – 104
10. Kouvaraki M. A., Shapiro S. E., Perrier N. D., Cote G. J., Gagel R. F., Hoff A. O., Sherman S. I., Lee J. E., Evans D. B. (2005) RETProto-Oncogene: A Review and Update of Genotype–Phenotype Correlations in Hereditary Medullary Thyroid Cancer and Associated Endocrine Tumors. *Thyroid* **15**: 531 – 544
11. Larouche V., Akirov A., Thomas C. M., Krzyzanowska M. K., Ezzat S. (2019) A primer on the genetics of medullary thyroid cancer. *Current Oncology* **26**: 389 – 394
12. Li A. Y., McCusker M. G., Russo A., Scilla K. A., Gittens A., Arensmeyer K., Mehra R., Adamo V., Rolfo C. (2019) RET fusions in solid tumors. *Cancer Treatment Reviews* **81**: 101911



13. Luzón-Toro B., Fernández R.M., Villalba-Benito L., Torroglosa A., Antiñolo G., Borrego S. (2019) Influencers on Thyroid Cancer Onset: Molecular Genetic Basis. *Genes* **10**: 913
14. Manfredi G. I., Dicitore A., Gaudenzi G., Caraglia M., Persani L., Vitale G. (2014) PI3K/Akt/mTOR signaling in medullary thyroid cancer: a promising molecular target for cancer therapy. *Endocrine* **48**: 363 – 370
15. McHenry C. R., Phitayakorn R. (2011) Follicular Adenoma and Carcinoma of the Thyroid Gland. *The Oncologist* **16**: 585 – 593
16. Mondal S., Raja K., Schweizer U., Mugesh G. (2016) Chemistry and Biology in the Biosynthesis and Action of Thyroid Hormones. *Angewandte Chemie International Edition* **55**: 7606–7630
17. Mondragón-Terán P., López-Hernández L. B., Gutiérrez-Salinas J., Suárez-Cuenca J. A., Luna-Ceballos R. I., Erazo Valle-Solís, A. (2016) Intracellular signalling mechanisms in thyroid cancer. *Cirugía y Cirujanos (English Edition)* **84**: 434 – 443
18. Mulligan L. M. (2014) RET revisited: expanding the oncogenic portfolio. *Nature Reviews Cancer* **14**: 173 – 186
19. Nguyen Q. T., Lee E. J., Huang M. G., Park Y. I., Khullar A., Plodkowski R.A. (2015) Diagnosis and treatment of patients with thyroid cancer. *Am Health Drug Benefits* **8**: 30 – 40
20. Nowak R., Olech M., Nowacka N. (2014) Plant Polyphenols as Chemopreventive Agents. *Polyphenols in Human Health and Disease* 1289 – 1307
21. Ponder M. (2001) Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *International Journal of Experimental Pathology* **81**: 405 – 422
22. Raue F., Frank-Raue K. (2018) Update on Multiple Endocrine Neoplasia Type 2: Focus on Medullary Thyroid Carcinoma. *Journal of the Endocrine Society* **2**: 933 – 943
23. Romei C., Ciampi R., Elisei, R. (2016) A comprehensive overview of the role of the RET proto-oncogene in thyroid carcinoma. *Nature Reviews Endocrinology* **12**: 192 – 202
24. Younis E. (2017) Oncogenesis of Thyroid Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* **18**: 1191 – 1199
25. Zhao H.-F., Wang J., To S.-S. T. (2015) The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and c-Jun N-terminal kinase signaling in cancer: Alliance or contradiction? (Review). *International Journal of Oncology* **47**: 429 – 436

## 5. PRILOZI

### 5.1. Popis kratica

ASK1 - *apoptosis signal-regulating kinase 1*

ATP - adenosine triphosphate

Akt - *protein kinase B*

BRAF - *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*

CCDC6 - *coiled-coil domain-containing protein 6*

DNA - *deoxyribonucleic acid*

ERK - *extracellular signal-regulated kinase*

GDNF - *glial cell-derived neurotrophic factor*

GFL - *GDNF family of ligands*

GRB7 - *growth factor receptor-bound protein 7*

GTP - *guanosine triphosphate*

HRAS - *harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*

JNK - *c-Jun N-terminal kinase*

KRAS - *kristen rat sarcoma viral oncogene homolog*

MEK - *mitogen-activated protein kinase kinase*

MEKK - *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1*

MKK4 - *mitogen-activated protein kinase kinase 4*

MLK - *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11*

NCOA4 - *nuclear receptor coactivator 4*

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

PAX8 - *paired box gene 8*

PCR - *polymerase chain reaction*

PIK3CA - *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-3-kinase catalytic subunit alpha*

PPARG - *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

PTEN - *phosphatase and tensin homolog*

RAF - *rapidly accelerated fibrosarcoma*

RAS - *rat sarcoma viral oncogene homolog*

Rac - *Ras-related C3 botulinum toxin substrate*

SHC - *src* homology 2 domain containing

STAT3 - *signal transducer and activator of transcription 3*

mRNA - *messenger ribonucleic acid*

mTOR - *mammalian target of rapamycin*

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

*Andro Vuković*

ime i prezime studenta