



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО–МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ**

Јасмина Обрадовић

***ВАРИЈАНТЕ ГЕНА ЗА РЕЦЕПТОР ЕПИДЕРМАЛНОГ ФАКТОРА РАСТА КОД
ПАЦИЈЕНАТА ОБОЛЕЛИХ ОД НЕМИКРОЋЕЛИЈСКОГ ТУМОРА ПЛУЋА***

Докторска дисертација

Крагујевац, 2015.

I Аутор
Име и презиме: Јасмина Обрадовић
Датум и место рођења: 01.02.1981.
Садашње запослење: Институт за биологију и екологију, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, звање истраживач сарадник
II Докторска дисертација
Наслов: <i>Варијанте гена за рецептор епидермалног фактора раста код пацијената оболелих од немикроћелијског тумора плућа</i>
Број страница: 189
Број слика: слика-22, табела-11, графика-5
Број библиографских података: 332
Установа и место где је рад израђен: Институт за биологију и екологију, Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Биологија/ Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија 57/591.1/577.2
Ментор: Проф. др Владимир Јуришић, редовни професор Факултета медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
III Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 11.12.2013.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: <ol style="list-style-type: none"> 1. Др Владимир Б. Јуришић, редовни професор на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Патолошка физиологија, и научни саветник - ужа научна област: Онкологија. (ментор) 2. Др Соња Павловић, научни саветник у Институту за молекуларну генетику и генетско инжењерство, Универзитет у Београду, ужа научна област: Молекуларна биологија. 3. Др Бранка Огњановић, ванредни професор на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња, човека и молекуларна биологија. 4. Др Наташа Ђорђевић, ванредни професор на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Фармакологија и токсикологија. 5. Др Радмила Глишић, доцент на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Биологија ћелије и ткива.
Комисија за оцену докторске дисертације: <ol style="list-style-type: none"> 1. Др Владимир Б. Јуришић, редовни професор на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Патолошка физиологија, и научни саветник - ужа научна област: Онкологија. (ментор) 2. Др Соња Павловић, научни саветник у Институту за молекуларну генетику и генетско инжењерство, Универзитет у Београду, ужа научна област: Молекуларна биологија. 3. Др Бранка Огњановић, ванредни професор на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња, човека и молекуларна биологија. 4. Др Наташа Ђорђевић, ванредни професор на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Фармакологија и токсикологија. 5. Др Радмила Глишић, доцент на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Биологија ћелије и ткива.
Датум одбране докторске дисертације:

Захвалница

Израда ове тезе је омогућена захваљујући експерименталном раду у следећим институцијама: на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, у Институту за молекуларну генетику и генетско инжењерство, Универзитета у Београду, у Институту за онкологију и радиологију Србије у Београду, у Институту за хуману генетику Медицинског факултета Универзитета у Београду и у Институту за хуману генетику Стоматолошког факултета Универзитета у Београду и зато се срдечно захваљујем свим истраживачима који су ми у томе помогли.

Велико хвала ментору, др Владимиру Б. Јуришићу, редовном професору на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, на свеукупном залагању, идејама, корисним стручним саветима, подстицају и стрпљењу.

Изражавам захвалност уваженој др Соњи Павловић, научном саветнику у Институту за молекуларну генетику и генетско инжењерство у Београду и целом њеном тиму, а посебно, Наташи Тошић научном сараднику и Биљани Станковић, истраживачу сараднику.

Др Бранки Огњановић, ванредном професору на Природно-математичком факултету у Крагујевцу хвала на корисним саветима и труду приликом прегледа и оцене ове дисертације.

Била ми је част да сарађујем са др Наташом Ђорђевић, ванредним професором Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Хвала на пруженом знању, стручним саветима, колегијалности и доброти.

Др Радмили Глишић, доценту на Природно-математичком факултету у Крагујевцу хвала на разумевању, лепој сарадњи, на правовременим саветима и несебичној помоћи приликом процеса израде и рецензије ове тезе.

Хвала Слађани Димитријевић, доценту Института за математику и информатику Природно-математичког факултета у Крагујевцу за сугестије око статистичке обраде података.

Господину Драгом Ивићу, писцу и директору Центра за културу у Пожаревцу, хвала на саветима у вези са правописом.

Хвала на великом срцу професорице биологије, Бисерке Јовановић из Средње медицинске школе „Дулић др Војислав“ у Пожаревцу, која ми је улила љубав према

биологији и тиме утицала на моје професионално опредељење. Такође хвала и професорици биологије Снежани Трифуновић из Средње медицинске школе „Дулић др Војислав“ у Пожаревцу, која ме је учила професионализму, прецизности и одговорности сопственим примером.

Захвална сам свим пријатељима и колегама који су допринели на било који начин да се реализује ова теза.

Хвала целој породици, а најтоплије хвала мајци Горици, сестри Славици, сину Јакову и супругу Владану за љубав, разумевање и подршку.

Скраћенице и акроними

AdH*: Additional methods to dHPLC: one or more than one; додатне методе dHPLC-у, једна или више

AdH: Additional methods to dHPLC, like DS; додатне методе dHPLC-у попут директног секвенцирања

ADS: Additional methods to DS: one or more than one; додатне методе директним секвенцирању, једна или више

AI: Additional methods to IHC, like: and/or D.S + and/or PCR + an or fluorescence in situ hybridization (FISH) + and/or chromogenic in situ hybridization (CISH); додатне методе имунохистохемијским анализама попут и/или директног секвенцирања+ и/или PCR+ и/или FISH+ и/или CISH

ALK: anaplastic lymphoma kinase, анапластична лимфом киназа

ASPCR: Allele-specific PCR, познат и као *amplification refractory mutation system* (ARMS) или *PCR with sequence-specific primers* (PCR-SSP), врста PCR-а

АТФ: аденозин трифосфат

BAD: BCL2 antagonist of cell death, BCL2 антагонист ћелијске смрти

Bax, Bad и **Bcl-xs**: агонисти апоптозе

Bcl-2: фамилија гена регулатора апоптозе

Bcl-2 и **Bcl-x1**: антагонисти апоптозе

bp: base pair, базни пар

BSA: bovine serum albumin, говеђи серум албумин

CA-SSR: CA simple sequence repeat, цитозин-аденин, CA, тандемски поновак

CDK: cyclin dependent kinase, циклин зависне киназе

CDKI: cyclin dependent kinase inhibitors, инхибитор циклин зависних киназа

сDNA: комплементарни ланац DNA

CISH: chromogenic in situ hybridization; хромогена in situ хибридизација

СрG: „острва“ „—C—phosphate—G—“, или цитозин 5'гуанин, линеарна веза цитозина и гуанозина у DNA секвенци

CSF: Colony Stimulating Factors-фактори који стимулишу раст колонија

ddNTP: dideoxynucleotides, di-deoxynucleosidetriphosphates

2',3' дидезоксинуклеотиди (ddGTP, ddATP, ddTTP and ddCTP)

del: делеција

DHPLC: Denaturing high performance liquid chromatography, денатурациона течна хроматографија

DMSO: dimethyl sulfoxide, диметил-сулфоксид

DNA: deoxyribonucleic acid, дезоксирибо-нуклеинска киселина

dNTP: deoxynucleotide, deoxynucleosidetriphosphates, нуклеотиди АТФ, СТП, ГТП, ТТП

DS: Direct DNA sequencing; директно DNA секвенцирање

E2F1, E2F2, и E2F3: транскрипциони фактори

EGF: Epidermal Growth Factor, епидермални фактор раста

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor, рецептор епидермалног фактора раста

Egr-1: early growth response factor 1 - Egr-1 фактор узрокован хипоксијом

ERDBP-1: epidermal growth factor (EGF) responsive DNA-binding protein, EGF протеин везан за DNA као одзив на EGF

ERK 1/2: extracellular signal-regulated kinases 1/2, екстрацелуларне сигнал-регулишуће киназе 1/2

ETF: EGFR-specific transcription factor, EGFR-специфични транскрипциони фактор

ETR: a cis-acting EGF receptor transcriptional repressor, cis EGFR транскрипциони репресор

FF: Fresh Frozen свеже замрзнуто (ткиво)

FFPE: Fresh Frozen Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, (ткиво) фиксирано формалином и прожето парафином

FGF: fibroblast growth factor, фактор раста фибробласта

FISH: fluorescence *in situ* hybridization; флуоресцентна *in situ* хибридизација

FOXO-FKHR: (Forkhead family) of transcription factors, FOXO- FKHR транскрипциони фактори

GC: гуанозин цитозин базни пар

GCF: GC-binding factor, GC везујући фактор

Grb2: growth factor receptor-bound protein 2, адапторни протеин

GTP: guanosine three phosphate, гуанозин три фосфат

GWAS: genome-wide association (studies), обимне студије асоцијације генома

HB-EGF: Heparin binding EGF-like Growth Factor- хепарин везујући фактор раста сличан EGF,

IFIs: Inducible Feedback Inhibitors, индуцибилни повратни инхибитори

IGF: Insulin like Growth Factor, инсулину сличан фактор раста,

IHC: Immunohistochemical analysis; имунохистохемијске анализе

INK: inhibitor of kinase, инхибитор протеин киназе

iRNA: информациона рибонуклеинска киселина

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry, Међународна унија за чисту и примењену хемију

Jun: транскрипциони фактори

LD: linkage disequilibrium, везана неравнотежа

L858R: супституција леуцина аргинином у кодону 858

МАРК: mitogen-activated protein kinases, митоген активирани протеин киназе

МЕК1/2: mitogen-activated protein kinase kinase 1/2; митоген активирани протеин киназе 1/2

MET: mesenchymal epithelial transition factor, мезенхимално епитлни транзициони фактор

miRNA: micro-RNA, микро RNA

mutp53: mutant tp53, мутитрани протеини p53

NCBI: National Center for Biotechnology Information, национални центар за биотехнолошке информације

NGF: nerve growth factor, нервни фактор раста,

NSCLC: Non Small Cell Lung Cancer, немикроћелијски канцер плућа

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man, каталог гена код људи и генетичких поремећаја, развијен од стране NCBI. База садржи текстуалне информације и референце, линкове ка бази „Medline“, за EGFR <http://www.metalife.com/OMIM/131550>

PCR: Polymerase chain reaction, ланчана реакција полимеразе

PCR-RFLP: polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism, ланчана реакција полимеразе-рестрикциона реакција PCR производа

PCR-SSCP: Polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism, врста PCR методе

PDGF: platelet-derived growth factor, фактор раста тромбоцита

pDHPLC: partially denaturing HPLC, делимично денатуришућа хроматографија

PEG: polyethylene glycol, полиетилен-гликол

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinases, фосфатидил инозитол 3-киназе

PIK3CA: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha, фосфатидилинозитол-3-кинази, каталитички алфа полипептидним ген

PNA-LNA PCR clamp: Peptide nucleic acid-locked nucleic acid PNA-LNA PCR clamp, врста PCR методе.

PTPs: Protein Tyrosine Phosphatases, тирозин фосфатазе

Real time PCR: PCR у реалном времену

RNA: Ribonucleic acid, рибонуклеинска киселина

rs: Reference SNP number, референтни број за полиморфизам појединачног нуклеотида

RTK: Tyrosine Kinase Receptor, тирозин киназни рецептор

RT-PCR: Reverse Transcription PCR, PCR са реверзном транскриптазом

SCLC: Small Cell Lung Cancer, ситноћелијски канцер плућа

SNP(s): Single nucleotide polymorphism(s), полиморфизми појединачних нуклеотида

SOS: son of sevenless, адаптрони протеин

Sp1: транскрипциони фактор

SSCP: single-sequence (strand) conformation polymorphism, полиморфизам једноланчане конфрмације

SSLP: Simple sequence length polymorphism, једноланчани полиморфизам

STAT: signal transducer and activator of transcription, спроводилац сигнала и активатор транскрипције

STRs: Short tandem repeats, кратки тандемски поновци

TGF- β / TGF- α : transforming growth factor beta, β / - α alpha, трансформишући фактор раста-бета/-алфа

TK: тирозин киназа

TKI(s): Tyrosine kinase inhibitor (s), тирозин киназни инхибитор(и)

Tm: Melting temperature, температура топљења прајмера

TP53: Tumor Protein *P53*, тумор протеин *P53*

VEGF: Vascular endothelial growth factor, Васкуларни ендотелни фактор раста,

VNTR: Variable number of tandem repeats, различит број тандемских поновака

WHO: The World Health Organization; Geneva, Switzerland, Светска здравствена организација

wt *TP53*: дивљи тип гена *TP53*

Списак табела, слика и графикана

Слика 1. Структура EGFR-а.

Слика 2. Сигнални пут епидермалног фактора раста.

Слика 3. Дијаграм часописа који су укључени, односно искључени из анализе.

Слика 4. Промоторни регион *EGFR-а* (А) процентуални садржај GC парова и CpG нуклеотидни састав од 660 bp (Б).

Слика 5. Резултати директног секвенцирања PCR продуката употребом “forward” (А) и “reverse” (Б) PCR прајмера.

Слика 6. Ефекти температуре везивања прајмера на PCR амплификацију.

Слика 7. Ефекти концентрације DNA узорка на PCR амплификацију.

Слика 8. Ефекти MgCl₂ на PCR амплификацију.

Слика 9. Ефекти DMSO на PCR амплификацију.

Слика 10. Поређење PCR амплификације са додатим 5% DMSO и PCR амплификацијом без додатих адитива.

Слика 11. Ефекти различитих концентрација глицерола на амплификацију секвенце контролне DNA дужине 197bp на 2% агарозном гелу.

Слика 12. Ефекти различитих концентрација глицерола на амплификацију секвенце дужине 197bp на 2% агарозном гелу са DNA узорком из замрзнутог ткива (енгл. fresh frozen, FF).

Слика 13. Ефекти различитих концентрација глицерола на амплификацију секвенце дужине 197bp на 2% агарозном гелу са DNA узорком из ткива фиксираног формалином и прожетог парафином (енгл. formalin fixed and paraffin embedded, FFPE).

Слика 14. Ефекти различитих концентрација глицерола на рестрикцију PCR продуката помоћу ензима Cfr42I за полиморфизам -191C/A на 3% агарозном гелу на DNA узорцима изолованим на три различита начина.

Слика 15. Ефекти различитих концентрација глицерола на рестрикцију PCR продуката помоћу ензима BseRI на 8% поклиякриламидном гелу за полиморфизам -216 G/T са DNA изолованом на три различита начина.

Слика 16. Ефекти различитих концентрација бетаина на амплификацију секвенце контролне DNA дужине 197bp на 2% агарозном гелу.

Слика 17. Ефекти различитих концентрација бетаина на амплификацију секвенце DNA дужине 197bp на 2% агарозном гелу са DNA узорком из замрзнутог ткива (енгл. fresh frozen, FF).

Слика 18. Ефекти различитих концентрација бетаина на амплификацију секвенце DNA дужине 197bp са DNA узорком изолованом из парафинизованог ткива (енгл. formalin fixed and paraffin embedded, FFPE) на 2% агарозном гелу.

Слика 19. Ефекти различитих концентрација бетаина на ензимску рестрикцију PCR продуката ензимом Cfr42I за полиморфизам -191C/A на 3% агарозном гелу на DNA узорцима изолованим на три различита начина.

Слика 20. Ефекти различитих концентрација бетаина на рестрикцију PCR продуката помоћу ензима *BseRI* на 8% поклиякриламидном гелу за полиморфизам -216 G/T са DNA изолованом на три различита начина.

Слика 21. Одређивање оптималних концентрација тестираних адитива TWEEN 20 и TRITON X-100 на PCR амплификацију на 2% агарозном гелу.

Слика 22. Одређивање оптималних концентрација тестираних адитива, формамида, PEG и BSA на PCR амплификацију на 2% агарозном гелу.

Табела 1. Приказ тестираних адитива и њихових основних карактеристика.

Табела 2. Карактеристике SNP-ова: позиција, функционални значај, прајмери коришћени за генотипизацију, температура топљења, рестрикциони ензими.

Табела 3. Тестирани опсег концентрација свих адитива.

Табела 4. Демографски подаци за контроле и оболеле од канцера плућа.

Табела 5. Фреквенције генотипа и алела за оболеле и контроле.

Табела 6. Дистрибуција генотипа за -191C>A складу са демографским карактеристикама.

Табела 7. Дистрибуција генотипа за -216G>T складу са демографским карактеристикама.

Табела 8. Дистрибуција генотипа за 181946 G>A (D994D) складу са демографским карактеристикама.

Табела 9. Просечне фреквенције генотипова.

Табела 10. Фреквенција хаплотипова за полиморфизме -191C>A и -216G>T и LD анализа.

Табела 11. Комбинације хаплотипова у групи оболелих и здравих испитаника.

График 1. Број објављених часописа о методама за откривање мутација EGFR-а код NSCLC пацијената током година.

График 2. Процентуална заступљеност метода за откривање мутација EGFR-а код NSCLC пацијената.

График 3. Опсег тестираних концентрација DNA пацијената.

График 4. Одређивање сензитивности и специфичности PCR методе.

График 5. Дистрибуција година за оболеле (А) и контроле (Б)

**ВАРИЈАНТЕ ГЕНА ЗА РЕЦЕПТОР ЕПИДЕРМАЛНОГ ФАКТОРА РАСТА КОД ПАЦИЈЕНАТА
ОБОЛЕЛИХ ОД НЕМИКРОЋЕЛИЈСКОГ ТУМОРА ПЛУЋА**

Канцер плућа је тешко излечива болест и водећи узрок смртности, који поприма размере пандемије при чему је немикроћелијски канцер плућа (енгл. Non-small-cell lung cancer, NSCLC) најчешћи тип канцера плућа. Трансмемрански рецептор епидермалног фактора раста (енгл. epidermal growth factor receptor, EGFR) који је кључни молекул у каскадном преносу сигнала коришћен је као погодан биомаркер за развој и примену циљне терапије код NSCLC-а и то тирозин киназних инхибитора и моноклоналних антитела који спречавају пренос измењених сигнала. Пошто је примећено да не реагују сви NSCLC пацијенти подједнако на терапију, сугерисано је да полиморфизми могу да представљају узрок ових разлика, јер могу да утичу на регулацију гена EGFR-а. Показано је да полиморфизми појединачних нуклеотида (енгл. single nucleotide polymorphisms SNP(s)) и то -216G>T (rs712829) и -191C>A (rs712830) смештених у промоторном региону и 181946C>T (D994D) (rs2293347) у екзону 25, могу да регулишу активност гена EGFR-а, а њихове дистрибуције су показале етничке разлике.

На основу секвенцирања нечијег генома није могуће одредити којој етничкој групи припада, али су примећене интеретничке разлике у дистрибуцији полиморфизма гена EGFR-а, дистрибуцији мутација, али такође и у одговору на дејство лекова, тако да све ове разлике указују да постоје различити ризици између етничких група за развој болести. Осим генетичких фактора и фактори спољашње средине, попут конзумације дувана, могу да имају удела у пријемчивости за канцер плућа. Познато је да пушење може да буде узрок преране смрти, а Србија заузима високо место у годишњој смртности у Европи од канцера плућа. Један од циљева ове студије је био да се покаже фреквенца *EGFR* полиморфизама у популацији испитаника са територије Републике Србије и да се одреде потенцијални фактори ризика за настанак канцерозног фенотипа. Извршена је генотипизација ових полиморфизама и према нашим сазнањима, по први пут је приказана њихова фреквенција за пацијенте NSCLC са територије Републике Србије.

За ову процедуру генотипизације, а и за будућа истраживања је потребна сензитивна, специфична и оптимизирана метода. Коришћена је ланчана реакција полимеразе праћена дејством рестрикционих ендонуклеаза (енгл. polymerase chain reaction-restriction length polymorphism, PCR-RFLP), која је погодна зато што дозвољава разне модификације мада када треба да се код

компликованих узорака изврши амплификација, као што су били у овој студији, може да буде и временски и финансијски захтевна. Постоје два главна узрока која отежавају ову процедуру за одређивање два полиморфизма код пацијената оболелих од NSCLC-а и то -216G>T и -191C>A. Наиме, ова промоторска секвенца гена EGFR-а има изузетно велики садржај гуанина и цитозина који могу да ометају амплификацију PCR-а. Други разлог је коришћење DNA изоловане из ткива плућа фиксираног формалином и прожетог парафином који може да оштети DNA за време припреме ткива. Међутим, ова ограничења су превазиђена успешном и оптимизованом PCR методом у овој студији.

Ова ретроспективна студија је обухватила 90 DNA узорка добијена од 47 оболела и 43 здрава контролна испитаника. Контролни испитаници су били добровољни даваоци крви, насумично одабрани и нису били у сродству. Клинички и патохистолошки подаци су добијени са Института за плућне болести Војводине, Клинике за пулмонарну онкологију, Медицинског факултета, Универзитета у Новом Саду из Сремске Каменице. Ова студија је одобрена од стране локалног етничког комитета.

За екстракцију DNA из ткива фиксираног формалином и прожетог парафином, а и за екстракцију контролних узорака DNA коришћени су комерцијални китови. PCR-RFLP анализе су спроведене након оптимизоване процедуре. Секвенце су потврђене директним секвенцирањем.

Ова процедура оптимизације је укључила подешавање адекватне температуре везивања прајмера, а за оптимизацију су биле потребне и адекватне концентрације DNA и MgCl₂. Такође, тестирано је осам адитива за амплификацију EGFR промоторног региона са високим садржајем GC (гуанин-цитозинских) парова. Сваки од ових тестираних адитива је додаван у одвојеним реакцијама са различитим концентрацијама: глицерол (5%, 10%, 15%, 20% и 25%), формаид (1.25%, 2.5%, 5%, 7.5% и 10%), Tween 20 (0.1%, 0.5%, 1% и 2%), Triton X-100 (0.1%, 0.5%, 1% и 2%), BSA (0.1 ug/ul, 0.5 ug/ul, 0.8 ug/ul и 1 ug/ul), бетаин (0.5M, 1M, 1.5M, 2M и 2.5M), диметил сулфоксид (DMSO) (1%, 3% и 5%) и PEG (2.5%, 5%, 10%, 15% и 20%). PCR продукти су детектовани помоћу 2% агарозне гел електрофорезе, а рестрикциони фрагменти су одређени на 8% полиакриламидном и 3% агарозном гелу.

Додавање глицерола у одвојеним реакцијама у концентрацијама од 15-20%, 1M-2M бетаина и 5% диметилсулфоксида, значајно је повећало принос и специфичност PCR-а, док су други испитивани адитиви били неефикасни.

Резултати су показали да су неопходне концентрације DNA од најмање 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ за успешну PCR амплификацију. У складу са високим садржајем GC парова, оптимална температура анилинга је била 63°C, што је 7°C више него прорачунато, док су адекватне концентрације MgCl_2 износиле од 1,5 до 2,0 mM.

Статистичке анализе су изведене коришћењем програмског пакета SPSS-17 software (SPSS, Inc.). Све p вредности мање од 0,05 су сматране статистички значајним. Табеле контингенције и Хи квадрат тест (или Фишеров тест, када је било неопходно) су примењени да би се добио однос фреквенција генотипа између контрола и оболелих за сваки полиморфизам. Демографски подаци су поређени кроз генотипове, такође Хи квадрат тест тестом. На основу анализа литературних података по којима је пушење главни узрок обољевања од канцера плућа примењен је модел бинарне логистичке регресије само у оквиру пушача. Испитиване су дистрибуције генотипа између оболелих и контрола за сваки SNP користећи доминантни и рецесивни генетички модел и рачунајући количник шансе (енгл. odds ratios, OR) и 95% интервал поверења (confidence intervals, CI). Сва три SNP-а су тестирана помоћу Харди-Вајнбергове равнотеже. Сензитивност и специфичност су рачунати помоћу ROC криве.

Резултати статистичких анализа су показали да постоји јак доказ повезаности између пушења и обољевања од канцера плућа (Pearson Chi square=28,594, df=1, $p<0,001$). Односи између здравих и оболелих испитаника нису били статистички значајно различити ($p>0,05$), што је у корелацији са другим студијама. Мада је у овој студији било више мушкараца пушача (63,3%) него жена пушача (47,1%), није било зависности између пола и пушачког статуса у укупној популацији (Pearson Chi square=2,612, df=2, $p=0,271$). Показало се да су старије особе чешћи пацијенти од канцера плућа ($p<0,05$), што је у корелацији са литературним подацима. Није било одступања од Харди-Вајнбергове равнотеже ($p>0,05$) за полиморфизме 216 G/T и 181946 G/A, што указује да су дистрибуције алела биле једнаке у групи контрола и у групи оболелих. За -191 C/A, примећено је одступање од Харди-Вајнбергове равнотеже, што је вероватно повезано са малим бројем испитаника.

Постојала је јасна веза између контрола и оболелих под доминантним генетичким моделом за -216 G>T (GG vs. GT + TT) на основу Хи квадрат теста $p=0.012$. Користећи бинарну логистичку регресију нађено је да су носиоци -216 G>T полиморфизма, (тачније носиоци GG генотипа) имали веће шансе (OR=3.5435, 95% CI 1.0710-11.7244, $p=0.038$), него они који су носиоци GT и TT генотипа за развој немикроћелијског канцера плућа, када је подешавање укључило пушачки статус.

Показано је овом студијом да је комбинација GG генотипа EGFR полиморфизма -216G/T (rs712829), код оних носилаца који су пушачи, потенцијални фактор ризика да оболе од канцера плућа, тако да T алел може да има заштитну улогу. На основу ове студије фактор спољашње средине као што је конзумација дувана и генетичка пријемчивост су важни фактори ризика за обољевање од NSCLC-а у популацији испитаника са територије Републике Србије.

EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR GENE VARIANTS IN NON SMALL CELL LUNG CANCER PATIENTS

Lung cancer is poorly curable disease and leading cause of mortality, taking pandemic proportions worldwide and Non-small-cell lung cancer (NSCLC) is the most frequent lung cancer type. A transmembrane epidermal growth factor receptor (EGFR), receptor, a key molecule in signal transduction cascade was used as a potent biomarker for the development and implementation of NSCLC target therapy with tyrosine kinase inhibitors and monoclonal antibodies that block aberrant signals spreading. Still, it was noticed that not all of the NSCLC patients respond equally to therapy, so it was proposed that polymorphisms might be one of potential cause of these differences affecting EGFR gene regulation. It was shown that single nucleotide polymorphisms (SNPs), namely -216G>T (rs712829) and -191C>A (rs712830) located in promoter region and 181946C>T (D994D) (rs2293347) in exon 25, could regulate activity of *EGFR* and whose distributions showed ethnic differences.

Based on results of genome sequencing of ones DNA, it is not possible to categorize a person in any of ethnic group, but interethnic differences were evidenced in distribution of polymorphisms of *EGFR*, distribution of mutations, but also in drug response, so all of these differences implicate that there are different risks between ethnic groups for development a disease. Except genetic factors, environmental risks like tobacco smoking, indeed, are associated with susceptibility of lung cancer. Tobacco smoking is cause of premature death and Serbia takes high place in annual mortality in Europe from lung cancer. One of purposes of this study was to represent frequency of *EGFR* polymorphisms in population from Republic of Serbia and to identify potential risk factor for developing lung cancer phenotype. We have genotyped those SNPs and to our knowledge that was the first time to show their genotype frequencies for NSCLC patients in Republic of Serbia.

For this genotipisation procedure and for future investigations, sensitive, specific and optimized method was demanded. So we used polymerase chain reaction-restriction length polymorphism (PCR-RFLP), that is very convenient method, because it allows wide modifications, but when difficult templates need to be amplified, like in this study, it might be time and cost consuming. Two main causes hamper this optimization procedure in order to detect single nucleotide polymorphisms -216G>T and -191C>A in NSCLC patients. Namely, this EGFR promoter sequence is featuring an extremely high guanine-cytosine content that affected PCR amplification. Second was use of genomic DNA, extracted from formalin-fixed paraffin-embedded lung tumor tissue that might damage DNA during

preparation strategy, but all of those obstacles were overcome in optimized and successful PCR in this study, indeed.

This retrospective study included 90 DNA samples obtained from 47 cases and 43 healthy controls. Controls were volunteers, randomly chosen and not related. Clinical and pathophysiological data for NSCLC cancer patients were obtained from Institute for Pulmonary Diseases of Vojvodina, Clinic for Pulmonary Oncology, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Sremska Kamenica, Serbia. This study was approved by local Ethics Committees.

Commercial kits were used for extraction of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded lung tumor tissue and for control samples DNA were isolated from blood. PCR-RFLP analyses were performed under optimized procedures. Sequences were confirmed with direct sequencing.

This optimisation procedure included adjustments of annealing temperature, appropriate DNA concentration and $MgCl_2$ concentration, also were tested eight additives on amplification of difficult GC-rich *EGFR* gene promoter region. Each of the tested additives were included in the reaction separately at different concentrations, i.e. glycerol (5%, 10%, 15%, 20% and 25%), formamide (1.25%, 2.5%, 5%, 7.5% and 10%), Tween 20 (0.1%, 0.5%, 1% and 2%), Triton X-100 (0.1%, 0.5%, 1%, and 2%), BSA (0.1 $\mu g/ul$, 0.5 $\mu g/ul$, 0.8 $\mu g/ul$, and 1 $\mu g/ul$), betaine (0.5M, 1M, 1.5M, 2M and 2.5M) dimethyl sulfoxide (DMSO) (1%, 3% and 5%) and PEG (2.5%, 5%, 10%, 15%, and 20%). PCR products were detected by 2% agarose gel electrophoresis and restriction fragments on 8% polyacrilamide gel and 3% agarose gel.

Glycerol at concentration of 15-20%, 1M-2M betaine, and 5% DMSO, added in separate reactions, significantly enhanced yield and specificity of PCR reaction, other examined additives were ineffective. Results showed that DNA concentration in PCR reaction at least 2 $\mu g/ml$, were necessary for successful amplification. Due to high GC content, optimal annealing temperature was 63°C, which was 7°C higher than calculated, while adequate $MgCl_2$ concentration ranged from 1.5 to 2.0 mM.

Statistical analyses were performed using SPSS-17 software (SPSS, Inc.). All *p* values less than 0.05 were considered statistically significant. Contingency table analysis and Chi square test (or Fisher exact test, when necessary), were performed to assess the relationship of genotype frequencies between cases and controls for each polymorphism. Demographic data were compared across the genotype with Chi square test, as well. Using literature data that smoking is the main cause of NSCLC, we

performed analyses with binary logistic regression model just in between smokers. We have examined genotype distributions between cases and controls for each single SNP using dominant and recessive genetic model and calculating odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI). The three SNPs were tested for Hardy-Weinberg equilibrium. Sensitivity and specificity was calculated with ROC curve.

Result showed that there was very strong evidence of association between smoking and lung cancer (Pearson Chi square=28,594, df=1, $p<0,001$). Our findings correlate with findings of other studies that frequencies of polymorphisms between the healthy individuals and lung cancer patients were not significantly different ($p>0,05$). Although there were more male smokers (63,3%) than women (47,1%), in this study there was not evidence of a relationship between gender and smoking status in total Serbian population (Pearson Chi square=2,612, df=2, $p=0,271$). It was shown that older age individuals are more often lung cancer patients ($p<0,05$) that correlate with literature data. No deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was observed ($p>0,05$) for two polymorphisms 216 G/T and 181946 G/A which implies that allele distributions were similar in cases and controls. For -191 C/A we have observed deviation from HWE, which is probably due to small sample size. Based on the analysis of ROC curve, PCR method is highly specific and sensitive.

There was significant association between cases and controls under dominant genetic model for -216 G>T (GG vs. GT + TT) based on Pearson's Chi squared test $p=0.012$. With logistic regression model we have found that carriers of -216 G>T polymorphism, (particularly GG carriers) had higher odds (OR=3.5435, 95% CI 1.0710-11.7244, $p=0.038$), than non carriers (GT and TT) for developing non small cell lung cancer, when adjusted for the smoking history.

We have shown that GG genotype of EGFR polymorphisms -216G/T (rs712829), was a risk factor for smokers to develop non small call lung cancer, so T allele might have protective role. Based on this study, environmental factor like tobacco consumption and genetic susceptibility are potent risks for NSCLC patients in Republic of Serbia.

Садржај

Скраћенице и акроними.....	5
Списак табела, слика и графикона.....	9
Садржај.....	18
Увод.....	22
Опште карактеристике канцера.....	23
Тумори плућа.....	26
Немикрoћелијски канцер плућа.....	26
Учесталост и морталитет.....	26
Патогенеза.....	28
Патологија.....	28
Фактори ризика.....	29
Превенција.....	30
Молекуларна основа канцера.....	30
Протоонкогени и онкогени.....	31
Фактори раста и њихови рецептори.....	31
Преносиоци сигнала.....	32
Фактори који утичу на транскрипцију.....	32
Фактори који контролишу ћелијски циклус.....	33
Тумор супресорски гени.....	34
Апоптоза.....	36
Механизми поправке DNA.....	36
Епигенетичке промене код канцера.....	37
Метилација DNA.....	37
Епигетичке промене у хистонима.....	38
Микро RNA код канцера плућа.....	38
Рецептори.....	39
Рецептори тирозин киназа.....	39
Лиганди RTK.....	40
Рецептор епидермалног фактора раста и сигнални путеви.....	42
K-Ras пут.....	43
PI3K пут.....	44
STAT3 и STAT5.....	44
Генетичке варијанте.....	45
EGFR.....	47
Регулација EGFR-а.....	47
Инхибиција EGFR-а.....	48
Молекуларне карактеристике EGFR-а код NSCLC-а.....	48
EGFR полиморфизми.....	50
Преглед метода у детекцији мутација <i>EGFR-а</i>	52
Ланчана реакција полимеразе.....	54
Опште карактеристике.....	54

Фактори који утичу на успешност PCR-а.....	56
Адитиви.....	57
Врсте PCR-а.....	59
Циљеви.....	62
Материјал и методе.....	64
Испитаници.....	64
Селекција метода за детекцију мутација EGFR-а.....	64
Изолација DNA молекула.....	65
Изолација DNA из периферне крви.....	65
Изолација DNA из свежег замрзнутог ткива немикроћелијског тумора плућа.....	65
Изолација DNA из парафинизованих ткива немикроћелијског тумора плућа.....	66
Биоинформатичке анализе секвенце.....	67
Генотипизација.....	68
PCR-RFLP метода.....	70
Градијент PCR.....	70
„Touchdown“ PCR.....	70
Избор одговарајућег адитива за успешност PCR-а за полиморфизме -191C>A и -216G>T.....	71
Анализа DNA на агарозном гелу.....	71
Анализа DNA на полиакриламидном гелу.....	72
Бојење полиакриламидних гелова сребро-нитратом.....	72
Секвенцирање DNA.....	72
Откривање мутација у умноженим секвенцама TP53 применом PCR-SSCP методе.....	73
PCR-SSCP.....	73
Статистичка обрада резултата.....	75
Резултати.....	76
Резултати претраге Pub Med базе.....	76
Резултати анализе секвенце DNA узорка.....	79
Резултати директног секвенцирања.....	80
Резултати оптимизације PCR методе за EGFR полиморфизме.....	81
Резултати одређивања температуре везивања прајмера за PCR амплификацију.....	81
Резултати одређивања DNA концентрација код пацијената.....	82
Резултати одређивања специфичности и сензитивности PCR методе.....	84
Резултати одређивања оптималне концентрације MgCl ₂ за PCR амплификацију.....	85
Резултати одређивања оптималне концентрације DMSO за PCR амплификацију.....	86
Резултати PCR амплификације са додатим DMSO и амплификације без додатих адитива.....	87

Резултати одређивања оптималне концентрације глицерола на PCR амплификацију са контролним DNA узорком	88
Резултати одређивања оптималне концентрације глицерола на PCR амплификацију са DNA узорком изолованом из замрзнутог ткива...	89
Резултати одређивања оптималне концентрација глицерола на PCR амплификацију са DNA узорком изолованим из парафинизованог ткива.....	90
Резултати дејства различитих концентрација глицерола на рестрикционе реакције PCR продуката са DNA изолованом на три различита начина за полиморфизам -191 C/A.....	91
Резултати дејства различитих концентрација глицерола на рестрикционе реакције PCR продуката са DNA изолованом на три различита начина за полиморфизам -216 G/T.....	92
Резултати одређивања оптималне концентрације бетаина на PCR амплификацију са контролним DNA узорком	93
Резултати одређивања оптималне концентрације бетаина на PCR амплификацију са DNA узорком изолованим из замрзнутог ткива	94
Резултати одређивања оптималне концентрација бетаина на PCR амплификацију са DNA узорком изолованим из парафинизованог ткива	95
Резултати дејства различитих концентрација бетаина на рестрикционе реакције PCR продуката са DNA изолованом на три различита начина за полиморфизам -191 C/A.....	96
Резултати дејства различитих концентрација бетаина на рестрикционе реакције PCR продуката са DNA изолованом на три различита начина за полиморфизам -216 G/T.....	97
Резултати одређивања оптималних концентрација тестираних адитива на PCR амплификацију	98
Резултати одређивања варијанти гена EGFR код испитаника	100
Демографски подаци.....	100
Резултати дистрибуције година за контролну групу и групу оболелих од немикроћелијског канцера плућа са територије Републике Србије.....	102
Фреквенције генотипа и алела за оболеле и контроле	103
Дистрибуција генотипа за полиморфизам -191C>A	105
Дистрибуција генотипа за полиморфизам -216G>T	107
Дистрибуција генотипа за полиморфизам 181946C>T (D994D) тј. G>A.....	109
Резултати просечних фреквенција генотипова испитаника са територије Републике Србије.....	111
Резултати одређивања фреквенце хаплотипова и LD анализе	112
Резултати одређивања фактора ризика у групи пушача за обољевање од канцера плућа.....	114

Резултати одређивања мутација TP53.....	114
Дискусија	115
Оптимизација PCR-а.....	117
PCR услови: Температура везивања прајмера	117
Концентрација DNA узорка	118
Специфичност и сензитивност PCR методе.....	119
Концентрација магнезијумових јона.....	119
Адитиви	120
Диметил-сулфоксид.....	120
Глицерол	121
Бетаин.....	122
Tween-20 и Triton X-100.....	123
Формаид.....	124
Полиетилен-гликол	125
BSA	125
EGFR и његове варијанте	126
Експресија и амплификација EGFR-а.....	126
Фреквенца EGFR полиморфизама.....	127
Комбинације фактора ризика за обољевање од канцера плућа.....	132
Однос између TP53 и EGFR-а	137
Закључци:.....	139
Литература	141
Биографија.....	164
Библиографија	165

УВОД

Канцер плућа је био ретка болест почетком двадесетог века, да би у двадесет првом веку попримио размере пандемије. Немикроћелијски тумор плућа (енгл. Non Small Cell Lung Cancer, NSCLC) је најчешћи тип канцера плућа и данас је један од водећих узрока смртности у свету. Канцери су аутономне, атипичне и несврсисходне творевине, са неконтролисаним растом и тенденцијом инвазије других, обично удаљених места у телу. Канцер је генетичка болест, али и епигенетичке промене имају велики удео у канцерогенези. Рецептор епидермалног фактора раста (енгл. Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) је препознат као биомаркер за развој циљне терапије код NSCLC. Показано је да полиморфизми појединачних нуклеотида (енгл. Single nucleotide polymorphism, SNP) у *EGFR*¹-у могу да регулишу његову активност и то -216G>T и -191C>A, смештених у промоторној секвенци и 181946G>A у егзону 25, чије дистрибуције показују и етничке разлике. До сада нема података о дистрибуцији и фреквенцији ова три полиморфизма у популацији пацијената оболелих од NSCLC-а са територије Републике Србије, који се можда могу разматрати и као потенцијални нови биомаркери за примену терапије, због чега су били предмет истраживања ове студије.

Савремени трендови у третману канцера усмерени су ка персонализацији терапије NSCLC-а, услед сазнања да на досадашњу примењену терапију инхибиторима *EGFR*-а не реагују сви пацијенти подједнако чему потенцијално доприносе *EGFR* полиморфизми. Да би се применила оваква терапија код NSCLC-а, неопходно је извршити генотипизацију циљних полиморфизама и то брзим, поузданим и поновљивим методама. Поред бројних аутоматизованих и доступних, не постоји идеална и униформна метода за генотипизацију SNP-ова. Једна од најчешће примењиваних је PCR-RFLP метода, која захтева оптимизацију параметара, нарочито у случају региона богатих гуанином и цитозиним, какви су и код *EGFR*-а, који доводе до формирања стабилних секундарних структура у DNA молекулу и ометају извођење PCR-а. Највећа база за ретроспективна истраживања су колекције парафинизованих NSCLC ткива фиксираних формалином, који може додатно довести до деградације DNA и ометања PCR-а. Ово се превазилази успешном оптимизацијом параметара PCR-а за амплификацију два SNP-а од интереса, -216G>T и -191C>A, која је приказана у овој студији. На овај начин се пружа основа за даља истраживања, која би могла да укључе већу популацију пацијената, чак и различитог етничког порекла.

¹ EGFR-протеин, *EGFR*-ген

ОПШТЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ КАНЦЕРА

Људски организам је изграђен од агрегата ћелија специфичних по свом облику и величини, са строго контролисаном функцијом, које међусобно комуницирају и које се удружују у ткива, односно органе, чијим се непрекидним радом доприноси хомеостази организма.

Туморске² ћелије настају од нормалних ћелија, добијају условну самосталност и постају самоодрживе, најчешће током спорог и дугорајног процеса, што им омогућава да преживе у условима специфичне микросредине у којој су настале или у којој се накнадно нађу. Појава абнормалних ћелија са неконтролисаном пролиферацијом назива се још и **неоплазма**³, а првонастали тумор се назива и **примарни тумор**. Док год неопластичне ћелије остају груписане у јединствену целину, тумор се назива **бенигни**, који је спорорастући, односно **малигни**⁴, ако је агресиван и инвазиван. Инвазивност је особина која туморе сврстава у главне убице људске, а и многих животињских врста, односно то је способност да се одвоје од околног ткива и да га нападну, пробијајући неколико баријера, да уђу у крвне или лимфне судове и формирају **секундарне туморе**, такозване **метастазе** (Ruoslahti, 1996; Hanahan и Weinberg, 2000; Gupta и Massagué, 2006; Hanahan и Weinberg, 2011; Guo и сар., 2013).

Много је тема које се тичу канцера до данас расветљено, али ипак канцер заокупља пажњу широке научне јавности и предмет је непрекидних истраживања, зато што је још увек неизлечива у највећем броју случајева, а релативно честа болест. Канцер је генетичка болест и у раној онкогенези се запажају оштећења и DNA и хромозома, која воде ка генетичкој нестабилности и прогресији тумора, при чему оба имају исти задатак - опстанак. **Генетичка нестабилност** укључује измене у појединачним нуклеотидима, измене у броју хромозома, хромозомске транслокације и генетичке амплификације. Генетичка нестабилност ћелију природно води ка смрти, али се тај пут заобилази мутацијама које јој дају селективну предност. **Прогресија тумора** подразумева вишестепени процес који је базиран на кумулативном дејству мутација у многим генима, током дужег низа година, који доприноси развоју канцера (Loeb, 1991; Counter и сар., 1992; Lengauer и сар., 1998; Jurišić и Živančević Simonović, 2002; Lowe и сар., 2004; Bartkova и сар., 2005). Зато се већина

² tumor, lat.= оток, данас се за оток користи реч едем

³ neo plazma=нови раст, новотворина, користи се за туморски израштај

⁴ cancer, lat.= рак, општи назив за малигне туморе је канцер

канцера углавном јавља у **позном животном добу**, као последица споре акумулације бројних насумичних мутација у једној ћелијској линији. Канцер је последица соматских мутација, а наследни канцерозни синдроми су ретки и то свега 1% од свих пацијената оболелих од канцера (**Armitage и Doll, 1954; Fearon, 1997**).

Тако, данас је опште прихваћен став да већина канцера води порекло од појединачне аберантне ћелије, односно да су канцери **моноклоналног** порекла, а ако је туморска маса изграђена од серије генетички различитих субпопулација ћелија где нема индикације о заједничком пореклу, назива се **поликлонална** (**Cheng и сар., 2011; Parsons, 2011**).

Канцерозне ћелије за време свог развоја стичу нове особине и савлађују вишеструке баријере, као што су оне у екстрацелуларном матриксу, базалној мембрани, као и утицај реактивних врста кисеоника, реакцију имуног система, хипоксију и смањену количину нутријената. Када се нађу у таквом окружењу, код канцерозних ћелија се индукују генетички механизми који покрећу неоангиогенезу, гликолизу, избегавање апоптозе, избегавање скраћивања теломера, генетичку нестабилност, пролиферацију, колонизацију удаљених ткива, заправо, метастазу (**Ruoslahti, 1996; Counter и сар., 1992; Hanahan и Weinberg, 2000; Harris, 2002; Gupta и Massagué, 2006**) и генерално, воде ка једној патолошкој, условној бесмртности.

Тако опремљене туморске ћелије се одликују и **генетичким променама**, односно променама у секвенци DNA и/или **епигенетичким променама**, што подразумева промене које се тичу генске експресије, али без промене у генској секвенци за време развоја и пролиферације ћелија. Епигенетичке промене имају улогу у развоју неких канцера, али је већина иницирана генетичким променама (**Jaenisch и Bird 2003; Hoque и сар., 2010; Hassler и Egger, 2012**).

Наследни и фактори средине који доводе до појаве и развоја канцера се разликују међу популацијама људи, првенствено зато што различите популације могу да имају различите фреквенце алела пријемчивих за канцер, а такође и због еколошких утицаја и животних навика људи у погледу начина исхране, физичке активности, репродукције, односно хормонских фактора и коришћења дувана. Канцерогенеза је често повезана са мутагенезом, а чиниоци који доводе до канцера и узрокују генетичке промене сврставају се у четири класе: **хемијске канцерогене** (који формирају локалне промене у секвенци нуклеотида), **физичке** попут јонизујућег зрачења, X-зрака (који обично

узрокују прекиде хромозома и транслокације), **биолошке канцерогене**, нпр. вирусе (који уносе страну DNA у ћелију) и **ендогене факторе** (Peto, 2001; Schulz, 2005).

Класификација канцера је извршена на неколико начина, тако да према **месту настанка** обухвата нпр., канцер плућа, груди, колона, итд. Према **хистолошким карактеристикама** обухвата шест категорија (карциноме, саркоме, мијеломе, леукемије, лимфоме и помешане типове). Под **карциномом** се означава канцер епителних ћелија и обухвата **сквамозне** карциноме, који настају од епитела који формира заштитне ћелијске слојеве, као и **аденокарциноме** који настају од секреторног епитела. **Саркоми** обухватају оне канцере настале од везивног или потпорног типа укључујући везивно, мишићно, масно и коштано ткиво. **Мијеломи** потичу од плазма ћелија коштане сржи. **Леукемије** су, попут мијелома, тумори пореклом од крви. **Лимфоми** су пореклом од лимфног система и за разлику од оних који су пореклом од крви, ово су тзв. солидни тумори. **Помешани типови** тумора укључују два или више типова (нпр. карциносарком, тератосарком и др.). Постоји и разврставање канцера према ступњу, тзв. TNM систем, који се односи на величину, обим тумора и присуство метастаза: T (величина тумора), N (присуство *nodusa*, чворића) и M (присуствено удаљених метастаза). При томе „0“ означава одсуство, а рангирање од 1-4 указује на величину тумора, од 1-3 на број и локацију лимфних чворова и 1-присуство удаљених метастаза. Такође, постоји и тзв. разврставање тумора према степену од G1-G4, што се односи на њихову хистологију и на брзину раста и ширења по организму (**SEER Training Modules [Интернет]**; **National Cancer Institute, [Интернет]** а, б; **American Joint Committee on Cancer [Интернет]**).

ТУМОРИ ПЛУЋА

Светска здравствена организација (енгл. The World Health Organization; WHO Geneva, Switzerland, WHO) заједно са Интернационалном асоцијацијом за студије канцера плућа (енгл. International Association for the Study of Lung Cancer, Aurora Colorado) је објавила званичну класификацију тумора плућа 2004. године. Пораст информација о молекуларној биологији канцера плућа, нарочито о мутацијама, транслокацијама или другим променама кључних гена као што су *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *ERBB2 (HER2)*, *BRAF*, или *MET*, као и индивидуалне разлике у генетичким профилима тумора плућа, наметнуо је потребу за укључивањем молекуларних података у постојећу класификацију тумора плућа (**Golub и сар., 1999; Kerr, 2012**).

Генерално, канцери плућа се деле у две групе:

- **Микроћелијски** (ситноћелијски, микроцелуларни) је заступљен у мањем проценту (10-15% свих тумора плућа), али је веома агресиван неуроендокрини канцер, који брзо расте и даје бројне метастазе.
- **Немикроћелијски** (неситноћелијски, немикроцелуларни) је заступљен у већем проценту (око 80% свих тумора плућа) и обухвата аденокарциноме, сквамозне карциноме и карциноме великих ћелија (**Vaporciyan и сар., 2003; Spira и Ettinger, 2004**).

НЕМИКРОЋЕЛИЈСКИ КАНЦЕР ПЛУЋА

Немикроћелијски канцер плућа је било који тип епителијалног канцера плућа, који није ситноћелијски канцер плућа (енгл. Small Cell Lung Cancer, SCLC). Најпознатији типови су сквамозни карцином, крупноћелијски карцином и аденокарцином, али постоје и други типови, који се ређе јављају, али сви типови могу да се јаве у неуобичајеним хистолошким облицима. NSCLC су релативно неосетљиви на хемотерапију и радиотерапију у односу на SCLC, мада постоје и они који се могу оперисати (**PDQ Cancer Information Summaries [Интернет], 2014**).

Учесталост и морталитет

Почетком двадесетог века, канцер плућа је био ретка болест, да би у двадесет првом веку попримио размере пандемије (**Gibson и сар., 2013**).

Канцер плућа је један од најчешћих узрока обољевања и смрти у свету (**Siegel и сар., 2013; American Cancer Society, 2013; Ferlay и сар., 2015**). У свету је 2008. године, било око 1,38 милиона смртних случајева узрокованих овом болешћу, а од тога 376.000 само у Европи. Канцер плућа се обично открива у позним стадијумима, тако да излечење није могуће у више од 90%. У Европи петогодишње преживљавање за мушкарце износи 11,2%, а за жене 13,9%. Мушкарци чешће оболевају од жена широм света (1,1 милион наспрам 0,5 милиона случајева код жена), са већом стопом у централно-источној Европи, Северној Америци и источној Азији. У Уједињеном Краљевству, Финској и САД, где је епидемија конзумације дувана достигла свој пик средином двадесетог века, стопе оболевања од рака плућа опадају код мушкараца и достижу плато код жена. Иако су бројке мање за жене, канцер плућа је четврти најчешћи канцер код жена и други најчешћи узрок смрти код жена. Инциденца канцера варира и у различитим регионима једне исте земље. У Европи, бројка од 388.753 случаја канцера плућа у 2008. години, имала је следећу дистрибуцију: око 6% испод 50 година, 20% од 50-59 г., 29% од 60-69 г. и 44% изнад 70 година. По годишњој смртности од канцера плућа Србија је на трећем месту у Европи, иза Мађарске и Данске (**Gibson и сар., 2013**).

Према подацима америчког удружења за рак (енгл. American Cancer Society) (2013) број нових случајева (NSCLC-а и SCLC-а) у Сједињеним Америчким Државама за 2013. годину износи 228.190, а број умрлих 159.480, што износи око 27% свих смртних случајева од канцера. Стопа смртности код мушкараца је почела да опада у 1991. и од 2005-2009. је смањена на 2,8% годишње. Код жена, стопа смртности није почела да опада до 2003, а од 2005-2009., опада 1% годишње. Родне разлике у обрасцу смртности канцера плућа одражавају историјске разлике у узимању и редукацији конзумације дувана протеклих 50 година. Једногодишње релативно преживљавање за канцер плућа у САД је порасло са 37% у периоду од 1975-1979. на 44% у 2005-2008., добрим делом због побољшања у хируршким интервенцијама и комбинованој терапији. Петогодишња стопа преживљавања за све стадијуме је само 16%, за ситноћелијски канцер 6%, а за немикроћелијски 18%.

У централној Србији, 21,8% мушкараца оболи, а 30,2% умире од малигних тумора плућа и бронха. Код жена је обољевање у нешто мањем проценту 7,9%, односно умирање 13,9%. Тако, у Србији у 2010. је оболело око 4000 људи (3963), а умрло око 3500 (3497). Прецизније, број новооболелих од канцера плућа и бронха за мушкарце у централној Србији за 2010. износи 2.969, а за жене 994, односно број умрлих за мушкарце износи 2.602, а за жене 895 (**Cancer registry**

of central Serbia, Belgrade, 2012; Health statistical yearbook of Republic of Serbia, 2013).

Патогенеза

Карциногенеза везана за пушачки статус је вишестепени процес (**Miller, 2005**). Пре него што тумор постане инвазиван, епител плућа мора да прође кроз низ морфолошких промена. Уопштено, локализован повећан број ћелија у једном ткиву се означава као **хиперплазија**. Када се на њу надовежу промене које обухватају ћелије са измењеном диференцијацијом, то се означава као **дисплазија**. Дисплазија је обично бенигна промена са тенденцијом преласка у малигни тумор, и таква промена се означава као **пренеопластична промена**. Следеће промене укључују додатне измене у структури ткива, а способност инвазије дефинише се као **малигни тумор** (**Schulz, 2005**). Дисплазија и карцином се сматрају премалигним лезијама зато што је вероватније да ће да прерасту у инвазивни канцер, него да се спонтано повуку. Додатно, код оперисаних пацијентата у 1% до 2% годишње, постоји ризик за појаву секундарног канцера (**PDQ Cancer Information Summaries [Интернет], 2014**).

Патологија

NSCLC настаје из епителних ћелија плућа од централног бронха до терминалних алвеола. Сквамозни карцином настаје у близини централног бронха. Аденокарцином и бронхоалвеоларни карцином настају од периферног плућног ткива (**PDQ Cancer Information Summaries [Интернет], 2014**). NSCLC је хетерогени агрегат и обухвата неколико хистолошких типова. Ови хистолошки типови се обично класификују заједно, зато што су исти приступи дијагнози, стадијумима, прогнози и лечењу:

- **Аденокарциноми** се јављају на периферији плућа и њихов раст је пропорционалан. Хистолошки, показују формирање жлезда и продукцију мукуса. Чешћи су код жена него код мушкараца. Метастазирају обично у лимфне чворове или у удаљена места, попут мозга.
- **Сквамозни карциноми**: Јављају се у централном бронху, расту полако и мања је вероватноћа удаљеног ширења. Хистолошки ови тумори показују формирање кератина.
- **Карцином великих ћелија**: Хистолошки се карактерише великим ћелијама, са великим једром и истакнутим нуклеолусом. Варијанта

карцинома великих ћелија је карцином вретенастих ћелија, неуроендокрини карцином великих ћелија, који има изражени малигнитет (**Vaporciyan и сар., 2003; Spira и Ettinger, 2004**).

Фактори ризика

Најчешће су канцерогени уједно и мутагени, али међу њима постоје и канцерогени и тзв., *коканцерогени*. Никотин, нпр. није канцероген, већ коканцероген. То је алкалоид који делује не само у нервном систему, већ узрокује и ћелијску сигнализацију и ћелијске интеракције и у дисајним путевима и у плућима. Упркос бројним епидемиолошким студијама и јасној вези канцерогена и канцера ипак је тешко објаснити тачан механизам дејства канцерогена, зато што се разликује међу популацијама, а те разлике су у интеракцијама канцерогена и коканцерогена са генетичким профилем дате популације (**Schulz, 2005**). Фактори ризика, односно канцерогени обухватају:

Хемијске канцерогене (никал, кадмијум, арсеник, хром, трихлороетилен, ариламинe, бензопирене, афлатоксине, реактивне врсте кисеоника, хлорметил-етре, полицикличне ароматичне хидрокарбонате, неке врсте лекова нпр. цитостатике, циклофосфамид, платину, потом хормоне или хормонима сличне компоненте из природних или фармацеутских извора).

Физичке канцерогене (UV зрачење, нарочито UVB, јонизујуће зрачење, радијациону терапију).

Биолошке канцерогене (папилома вирусе код људи, Епштејн-Бар вирусе, хепатитис вирус В, *Helicobacter pylori*, *Schistosoma mansoni*).

Ендогене процесе (DNA репликацију, метаболичке реакције које генеришу реактивне врсте кисеоника, хроничну упалу, прележану туберколозу, наследне факторе, нарочито код оних који рано оболе).

Наравно у факторе ризика убрајају се они који потичу од психо-социјалних и економских, односно фактора спољашње средине, попут конзумације дувана, загађивача ваздуха, издувних гасова, професионалних обољења (код радника у фабрикама гуме, фарби и лакова, оџачара, као и оних који раде на асфалтирању, оних који раде са азбестом (нарочито код пушача), оних који су изложени радону...). (**Schulz, 2005; American Cancer Society, 2013**).

Најпознатији и најутицајнији фактор ризика за развој канцера плућа је пушење. За пушаче ризик од настанка канцера плућа је десет пута већи у односу на непушаче. Ризик расте са количином попушених цигарета, пушачким стажем и почетком конзумације дувана. Престанком пушења долази до смањења преканцерозних лезија и редукције ризика од развоја канцера плућа. Бивши пушачи имају повећан ризик од развоја канцера плућа дужи низ година након престанка пушења (**PDQ Cancer Information Summaries [Интернет], 2014**).

Превенција

Канцер се лечи хируршким интервенцијама, хемотерапијом, радијацијом, хормонском терапијом и циљном терапијом, мада има заговорника нових метода лечења канцера плућа попут лечења вакцинама (**Mellstedt и сар., 2011; PDQ Cancer Information Summaries [Интернет], 2014; Sui и сар., 2014**). Постоји постоперативна (енгл. *adjuvant*) хемотерапија и зрачење, и тзв. индукциона (енгл. *neoadjuvant*) терапија, када се даје хемотерапија пре хируршке интервенције да смањи величину тумора. Наравно, канцер се лечи и имунотерапијом, као и генетичком терапијом која је још увек експериментална терапија (**Schulz, 2005**). Елиминација фактора ризика попут конзумације дувана, било да је реч о активним или пасивним пушачима, је ефикасна превентивна мера. Рана детекција канцера плућа доводи до мање обимног лечења, бољег исхода и смањења смртности. Она се може спровести и мање инвазивним техникама, нарочито у случају полиморфизама појединачних нуклеотида који су наследна својства, па се могу детектовати молекуларним анализама на DNA пореклом из крви (**PDQ Cancer Information Summaries [Интернет], 2014**).

Национални институт здравља у САД процењује да су годишњи трошкови у 2008. били 201,5 милијарди долара и то 77,4 милијарди за директне медицинске трошкове (укупно свих здравствених расхода) и 124 милијарде за трошкове индиректног морталитета (трошкови смањене продуктивности услед преране смрти) (**American Cancer Society, 2013**).

МОЛЕКУЛАРНА ОСНОВА КАНЦЕРА

Протоонкогени су претече, односно гени који имају потенцијал да постану **онкогени**. Онкогени су мутиране, претерано активне форме протоонкогена. Мутације које погађају протоонкогене имају доминантан ефекат, односно, фаталне измене само у једном од оба алела доводе до пораста

функције гена. **Тумор супресорски гени** спречавају настанак тумора. Рецесивне мутације оба алела доводе до настанка аберантне форме гена са смањеном или обустављеном функцијом. Активација онкогена и тумор супресорских гена води ка канцерогенези (**Bishop, 1991; McCormick, 1999; McCormick, 2011**).

ПРОТООНКОГЕНИ И ОНКОГЕНИ

Протеински производи протоонкогена контролишу ћелијски раст, деобу и диференцијацију. Да би ћелија ушла у пролиферацију, неопходни су фактори раста, који се најчешће везују за екстрацелуларне домене трансмембранских рецептора, а порука се преноси даље од ћелијске мембране, кроз цитоплазму до једра. Класификација протоонкогена је извршена на основу њихових протеинских продуката, тј. места стварања и начина њиховог деловања. Онкогени кодирају синтезу онкопротеина, који могу да индукују малигни раст, када су присутни у абнормалној количини или форми. Генетичке промене које претварају протоонкогене у онкогене су: делеција или тачкаста мутација у кодирајућој секвенци, генетичка амплификација и хромозомски реаранжмани. Протоонкогени се могу поделити на: **факторе раста, рецепторе фактора раста, преносиоце сигнала, факторе који утичу на транскрипцију и регулаторе ћелијског циклуса** (**Cantley и сар., 1991; Weinberg, 1994; Брашанац и Васиљевић, 2003; Barros-Núñez и сар., 2013**).

Фактори раста и њихови рецептори

Фактори раста се везују за своје рецепторе, имају широк спектар дејства у нормалном развоју, одржавању ткива, ангиогенези, доводе до зарастања рана, штите неуроне од пропадања, али имају учешћа и у канцерогенези. Фактори раста обухватају:

- **Фамилију епидермалног фактора раста**
 - епидермални фактор раста, енгл. Epidermal Growth Factor-EGF,
 - трансформишући фактор раста алфа, енгл. Transforming Growth Factor alpha-TGF- α ,
 - хепарин везујући фактор раста сличан EGF, енгл. Heparin binding EGF-like Growth Factor-HB-EGF,
- **Тромбоцитни фактор раста**, Platelet derived Growth Factor-PDGF,
- **Факторе раста фибробласта**, енгл. Fibroblast Growth Factors-FGF,

- **Васкуларни ендотелни фактор раста**, енгл. Vascular Endothelial Growth Factor –VEGF,
- **Трансформишући фактор раста бета**, енгл. Transforming Growth Factor beta- TGF- β ,
- **Нервни фактор раста**, Nerve Growth Factor-NGF,
- **Инсулину сличан фактор раста**, енгл. Insulin like Growth Factor – IGF,
- **Факторе који стимулишу раст колонија**, енгл. Colony Stimulating Factors- CSF, и др.

Поједини фактори раста делују циљано на специфичне ћелије, док други делују на више типова ћелија. Има индикација да фактори раста могу да делују и интра и екстрацелуларно и због тога имају онкогени потенцијал (**Cross и Dexter, 1991**). Најчешће не циркулишу, осим тромбоцитног фактора раста, односно могу да делују аутокринно и паракринно (**Varpaciyan и сар., 2003**). Фактори раста поред тога што често имају митогена својства и стимулишу нпр. ћелијску пролиферацију и диференцијацију, могу и да инхибирају раст (TGF- β), ремоделирају ткива (TGF- α), а неки од њих су и продукти онкогена (FGF3-6) (**Cross и Dexter, 1991; Vafico и Aaronson, 2003; Газибара, 2003**).

Преносиоци сигнала

Ras онкогени

Онкогени *Ras* фамилије имају три члана лоцирана на различитим хромозомима, односно *H-ras*, *K-ras* и *N-ras*, који су најчешће активирани онкогени у канцерима код људи. Ras имају своју активну форму када су везани за GTP, односно неактивну када су везани за GDP. Након везивања лиганда за рецепторе тирозин киназа долази до активације Ras-а, међутим, код константно активiranог Ras-а, ћелијски одговор се јавља и без везивања лиганда. Ras протеини су у балансу између активне и неактивне форме, а услед тачкастих мутација код људи, долази до настанка хиперактивног Ras-а и до континуираног преноса сигнала за ћелијску пролиферацију (**Bar-Sagi и Hall, 2000; Varpaciyan и сар., 2003; Cox и Der, 2010**).

Фактори који утичу на транскрипцију

Протоонкогени који стварају нуклеусне онкопротеине укључују *myc*, *myb*, *fos*, *jun*, *ski*, *cbl*, *erbA*, чланове фамилије *ets* и др. Структурне или регулаторне

промене *mys*, *myb* и *fos* онкогена, доводе до стварања онкопротеинских продукта који могу да утичу на појаву малигне трансформације ћелије, преносом сигнала у једру и контролом ћелијске пролиферације или диференцијације (Kiefer и сар., 1987; Lee и сар., 1987; Luscher и Eisenman, 1990).

Мус протоонкоген

Мус протоонкоген фамилија обухвата *с-мус*, *Н-мус* и *Л-мус* и ови гени индукују синтезу протеина који контролишу раст ћелије и апоптозу. У нормалним здравим ћелијама експресија овог гена вазана је за ембриогенезу, односно његов протеински продукт се понаша у нуклеусу као сигнал за **ћелијску пролиферацију**. Прекомерне количине *мус* могу да узрокују ћелијску пролиферацију у условима у којима нормална ћелија не би пролиферисала. Ови гени су чешће амплификовани код микроћелијског, него код немикроћелијског тумора плућа, а показано је да тзв. *с-мус* индукује метастазе код немикроћелијског тумора плућа. Новија истраживања расветљавају везу између *мус* и miRNA, наиме претерана експресија *мус* удружена са репресивним дејством на miRNA има велики онкогени потенцијал (Pelengaris и сар., 2002; Nilsson и Cleveland, 2003; Maston и сар., 2006; Brambilla и Gazdar, 2009; Rapp и сар., 2009; Вуи и Joshua, 2010; Тао и сар., 2014).

Фактори који контролишу ћелијски циклус

Нормалан ћелијски циклус је контролисан од стране три главне групе регулаторних протеина: **циклин зависних киназа** (од CDK1-CDK9), **циклина** (тренутно 15 познатих, од А до Т) и **инхибитора циклин зависних киназа** (CDKI). У канцерозним ћелијама мутацијама могу да буду погођени гени све три групе и да доведу до амплификације или претеране експресије гена. Активација CDK је строго контролисана и добро регулисана, спречавајући сталну ћелијску репликацију. CDK су холоензими који имају каталитичку јединицу за коју се везује регулаторна јединица-циклин, при чему се сваки циклин синтетише на одређеном ступњу ћелијског циклуса и то као реакција која је индукована одређеним фактором раста. Генерално CDK су активне само када су фосфорилисане. Инхибитори ових киназа **CDKI** су протеини који делују на специфичним местима у ћелијском циклусу која се означавају као места провере и обухватају **CIP/KIP** (p21^{CIP1}, познат као дивљи тип активiranог p53, p27^{KIP1} и p57^{KIP2}) и **INK** (енгл. inhibitor of kinase) (p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C} и p19^{INK4D}). Након ћелијске трауме или оштећења DNA, нпр. експресија p21 је

индукована преко TP53 и тако се зауставља ћелијски циклус до спровођења DNA поправке. (Sherr и Roberts, 1999; Harper и Adams, 2001; Andreeff и сар., 2003; Брашанац и Васиљевић, 2003; Vermeulen и сар., 2003; Schulz, 2005).

ТУМОР СУПРЕСОРСКИ ГЕНИ

Тумор супресорски гени контролишу, снижавају, односно инхибирају ћелијску пролиферацију. Њиховом инактивацијом долази до појаве неопластичне трансформације. Заправо постоји пет класа протеина кодираних тумор-супресорским генима (Weinberg, 1994; Lodish и сар., 2000, а):

- *интрацелуларни протеини*, попут p16 циклин киназног инхибитора, који регулише, односно инхибира раст на специфичном месту ћелијског циклуса,
- *рецептори за хормоне који инхибирају ћелијску пролиферацију* (нпр. туморски фактор раста β),
- *протеини који контролишу и заустављају ћелијски циклус*, ако је DNA оштећена или су хромозоми абнормални,
- *протеини који доводе до апоптозе*,
- *ензими који поправљају DNA*.

Rb

Rb (ген) кодира синтезу протеина (Rb) који је веома важан **регулатор ћелијског циклуса**, пролиферације, диференцијације и развоја, а његов губитак се сматра кључним за настанак канцера. Rb је увек фосфорилисан, тако да варира између хипер- и хипофосфорилисаног стања. Rb спречава улазак у S фазу ћелијског циклуса, везујући се за регулаторне протеине (транскрипционе факторе, E2F1, E2F2, или E2F3) важне за експресију гена чији су производи неопходни за одвијање ћелијског циклуса. Кад се он хиперфосфорилише, односно инактивира, ћелија улази у S фазу, а хиперфосфорилација се одвија помоћу два комплекса циклина и циклин киназа, CDK4/CyclinD и CDK2/Cyclin E. Сматра се да има одређене регулаторне функције за време постсинтетичке фазе и митозе, а након митозе се хипофосфорилише. Односно он делује као једна од главних препрека у одвијању ћелијске деобе, и губитак *Rb-a* у смислу делеције или губитка функције, доводи ћелију до тога на неадекватно уђе у ћелијску деобу. Код неких тумора долази се до истог циља мутацијама у другим компонентама Rb регулаторног пута (Hong и сар., 1989; Wiman, 1993; Khidr и Chen, 2006).

p16(INK) протеин који се производи кад је ћелија под стресом, инхибира одвијање ћелијског циклуса спречавајући формирање активног циклин комплекса-D1-CDK4. Делеција или инактивација *p16* је заједничка за многе форме канцера код људи. Код канцера где није инактивиран мутацијом, овај ген је често утишан метилацијом, нарочито код пушача (**Blanco и сар., 2007; Iwakawa и сар., 2008; Ye и сар., 2009**).

TP53

Један од кључних гена, назван „чувар људског генома“ је **TP53** (познат и као енгл. Tumor Protein *P53*, *TP53*) јер учествује у регулацији ћелијског циклуса, апоптозе и одржавања генетичке стабилности. *TP53* (MIM# 191170) се убраја у тумор супресоре, мада има индиција и за његова проонкогена својства (**Freed-Pastor и Prives, 2012**). У протекле три деценије објављено је више од 50.000 научних радова о овом гену и његовом протеину. Установљено је да је ово један мултифункционални транскрипциони фактор који регулише експресију више од 2500 циљних гена, па тако регулише поред наведеног и старење и дуговечност, метаболизам, ангиогенезу, ћелијску диференцијацију, имуни одговор, и др. (**Green и Kroemer, 2009; Nigro, 2014**). Више од 28000 соматских мутација *TP53* је евидентирано у интернационалној агенцији за истраживање канцера, где се генеришу подаци о мутацијама овог гена још од 1989. године (енгл. International Agency For Research on Cancer, IARC) (<http://www-p53.iarc.fr/>), (*TP53* база података верзија R17 <http://p53.iarc.fr/DevelopmentHistory.aspx>).

Постоје докази који указују да *TP53* нема много утицаја на нормалан развој, већ да се активира у посебним околностима или пак само повремено, када треба да ограничи штетна дејства, јер је веома нестабилан и лако се деградира. У зависности од оштећења, мутирану ћелију уводи у апоптозу, или активира механизам који спречава ћелијску деобу онолико дуго колико је потребно да се оштећење исправи. Када је *TP53* мутиран, генетички оштећене ћелије настављају пролиферацију акумулирајући још више генетичких оштећења која воде ка канцеру, доводећи чак и до инвазије, миграције и метастазе (**Muller и сар., 2011; Freed-Pastor и Prives, 2012; Nigro, 2014**).

Постоји јака асоцијација између експресија EGFR-а и *TP53* (**Abusail и сар., 2013**). Наиме, потврђено је да мутације *TP53* у езонима од 5-8 и то њихове мутиране форме 143A, 175H, 248W, 273H и 281G *TP53* повећавају експресију EGFR-а (**Ludes-Meyers и сар., 1996; Sheikh и сар., 1997**).

Апоптоза

Апоптоза је важна за одржавање баланса између рођења и смрти ћелија, а по дефиницији подразумева програмирану ћелијску смрт. Апоптоза има значај код оштећених ћелија и код оних код којих је опасно оштећена DNA. Једна од карактеристика малигних ћелија је избегавање апоптозе, која им омогућава увећање броја и преживљавање у ситуацијама кад не би требало да преживе (**Jurišić и сар., 2004; Popović и сар., 2007; Jurišić, 2011**).

Гени регулатори апоптозе

Контрола апоптозе се остварује комплексним ванћелијским и унутарћелијским механизмима. **Bcl-2** фамилија има проапоптотичне и антиапоптотичне чланове који одржавају баланс при регулацији апоптозе. Постоје гени који инхибирају апоптозу или **антагонисти** апоптозе-**Bcl-2** и **Bcl-x1** и други гени који стимулишу апоптозу, **агонисти** апоптозе **Bax, Bad** и **Bcl-xs**. Активност **Bcl-2** представља крајњу тачку каскаде низа молекуларних догађаја који воде ка смрти ћелије. **Bcl-2** фамилија протеина регулише активацију протеолитичких ензима званих **каспазе**. Отпуштање цитохрома **C** од стране митохондрија води ка апоптози, а једна од функција цитохрома **C** је активација каспазе **9**. **Bcl-2** је локализован на спољашњој митохондријалној мембрани и верује се да он регулише излазак цитохрома **C** из митохондрија у цитоплазму. Претпоставља се да **Bax** формира отворе у митохондријалној мембрани који дозвољавају излазак цитохрома **C**, а тиме и апоптозу. Фактори који регулишу транскрипцију фамилије **Bcl-2**, могу да утичу на апоптозу (**Popović и сар., 2007; Vuletić и сар., 2010; Karan-Djurašević и сар., 2013**).

МЕХАНИЗМИ ПОПРАВКЕ DNA

Када се измени ген тачкастим мутацијама, делецијама/инсерцијама или помоћу хромозомских транслокација, као последица грешака у DNA репликацији или дејства мутагена, активирају се механизми поправке или „репер“ механизми односно ензими поправке (енгл. DNA-repair enzymes). Ови ензими могу да отклоне грешке пре или после репликације. У зависности од оштећења, покрећу се сигнали који ће препознати оштећење, укључити и друге протеине за поправку оштећења (енгл., repair proteins) и коначно отклонити грешку. Уколико су оштећења и сувише велика иницира се ћелијска смрт. Међутим, ако постоје оштећења и самих механизма за поправку, ћелија са оштећеном DNA ће наставити пролиферацију, што може да доведе до

реаранжмана и мутација у будућим генерацијама ћелија при чему и активација онкогена, попут EGFR-а може да доведе до развоја канцера. Генерално, постоје четири механизма поправке: директна поправка, поправка погрешно спарених база, поправке исецањем база и поправке дволанчаних прекида (**Матић, 1997; Brown, 2002**).

ЕПИГЕНИЧКЕ ПРОМЕНЕ КОД КАНЦЕРА

Епигенетичке промене су наследне промене у генској експресији, које се не односе ни на какву измену у DNA секвенци (**Jaenisch и Bird, 2003**), а то укључује следеће молекуларне механизме: измену у метилационом статусу DNA у CpG острвима, ковалентну модификацију хистонских репова и генетичку регулацију преко микро RNA (енгл. Micro RNA, miRNA).

Метилација DNA

Метилација DNA се јавља као нормална физиолошка функција и утиче на хроматински материјал помоћу модификација у структури хистона. Ране ембрионске ћелије немају метилацију, али је она важна за развој и регулацију генетичке експресије. Три форме абнормалне метилације могу да имају улогу у канцерогенези, укључујући глобалну **хипометилацију**, **хиперметилацију тумор супресорских гена** и **метилацију која регулише експресију неких микро RNA**. DNA метилација је ограничена на цитозине који су усходно од гуанина (CpG места). У људском геному промотор и понекад 5' крај приближно 50% гена су богати тзв. CpG острвима. У експримираним генима CpG острва су обично неметилована, док је у другим регионима генома већи део CpG острва метилован. Губитак метилације у некодирајућим деловима генома је најчешћи у туморима и води ка генској нестабилности. У туморима, метилација се дешава на мноштву CpG острва доводећи до губитка експресије тумор супресорских гена. Више од хиљаду гена је метиловано код канцера плућа и тако доводи до „утишавања“ промотора метилацијом. Метилација почиње рано за време патогенезе тумора плућа, и може се рано открити у спутуму пушача са дисплазијом. Поред метилације и инхибитори деацетилаза хистона су у сфери истраживања код канцера плућа (**Zöchbauer-Müller и сар., 2002; Kondo и Issa, 2010; Akhavan-Niaki и Samadani, 2013**).

Епигенетичке промене у хистонима

Хистони (H1, H2A, H2B, H3 и H4) су протеини који чине комплекс са DNA, односно формирају језгро, тзв. нуклеозом, око кога се DNA савија. У састав нуклеозома улазе сви осим H1, који контролише везу и позицију DNA и хистона. Различите аминокиселине, које чине примарну структуру хистона могу бити ацетилизоване, метилисане, фосфорилисане, убиквитизирани, итд. Модификације хистона су углавном ковалентне, најчешће су резервисане за дуге "репове" ових протеина (tzv. „histone tails“) и неопходне су за прецизну регулацију експресије гена. Ацетилација доприноси активнијој, убрзаној транскрипцији гена, док је метилација одговорна за инхибицију, „утишавање“ генетичке експресије. Статус ацетилације и метилације специфичних остатака аминокиселина у репу хистона нуклеозомалног језгра, има важну улогу у регулацији паковања хроматина, нуклеарној архитектури, генској експресији и геномској стабилности. Многи научници су заговорници хипотезе о хистонском коду, тј. потенцијалном новом регулаторном механизму, који одређује процесе и у здравој и у болесној ћелији (Turner, 2000; Jenuwein и Allis, 2001; Rice и Allis, 2001; Brambilla и Gazdar, 2009).

Микро RNA код канцера плућа

Микро RNA су класа малих, некодирајућих молекула које регулишу важне механизме у нормалном развоју, у регулацији ћелијског циклуса, диференцијацији, апоптози, али и у почетним фазама канцерогенезе. Утичу на експресију гена мењајући активност специфичних iRNA преко директних спаривања база. Многе miRNA имају поремећене обрасце експресије у разним канцерима укључујући и канцер плућа, а често је њихова регулација под контролом епигенетичких механизма. Показано је да су важан ткивни биомаркер, јер се ослобађају у крвоток од стране туморских ћелија, а могу се наћи и у урину. Око 500 људских miRNA су описане, а могу да функционишу и као онкогени и као тумор супресорски гени (Yanaihara и сар., 2006; He и сар., 2007; Garzon и Calin, 2009; Lee и Dutta, 2009; Mishra, 2014).

РЕЦЕПТОРИ

Рецептори су пријемници информација најчешће из ванћелијске средине које процесуирају преко низа сигналних молекула у унутрашњост ћелије. На основу механизма преноса сигнала који долазе из ванћелијске средине преко рецептора, а и на основу молекулске структуре рецептори се деле на:

- **Рецепторе јонских канала**- трансмембрански протеини који граде јонске канале; Након везивања лиганда мењају своју конформацију и омогућавају транспорт одговарајућих јона у ћелију кроз отворен јонски канал. Пролаз јона изазива промену у електричном потенцијалу мембране. Пример је ацетилхолински рецептор.
- **Рецепторе везане за G-протеин**- везивањем лиганда активира се G-протеин, који даље активира или инхибира ензиме који покрећу специфичан секундарни гласник или врше промену на јонским каналима, што доводи до промене у мембранском потенцијалу. Рецептори за адреналин, серотонин и глукагон припадају овој класи.
- **Рецепторе са унутарћелијском ензимском активношћу**. Неколико типова рецептора поседује унутарћелијску каталитичку активност која се активира везивањем лиганда. Као пример могу послужити рецептори за стероидне и тиреоидне хормоне.
- **Рецепторе тирозин киназа**- трансмембрански рецептори који се активирају образовањем димера или олигомера након везивања лиганда за екстрацелуларни домен, што доводи до аутофосфорилације тирозинских остатака на интрацелуларном домену активацијом једне или више цитозолних тирозин киназа. Рецептори многих цитокина, интерферона, и фактора раста припадају овој класи (**Lodish и сар., 2000, б**).

РЕЦЕПТОРИ ТИРОЗИН КИНАЗА

Рецептор епидермалног фактора раста (енгл. Epidermal Growth Factor Receptor; EGFR, има и друге синониме: V-Erb-B avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog, oncogene ERBB, ERBB1, HER1, Species Antigen 7; SA7) припада класи рецептора тирозин киназа (енгл. Receptor Tyrosine Kinase, RTK) и код

људи постоје 58 тирозин киназа, које се могу класификовати у 20 структурних субфамилија (**Lemmon и Schlessinger, 2010**).

Њихова молекуларна архитектура је иста, са лиганд везујућим екстрацелуларним доменом, једним хеликсом у трансмембранском домену и цитоплазматским делом који садржи конзервативни тирозин киназни домен (ТК) и додатне регулаторне домене у којима се дешавају аутофосфорилација, као и фосфо/дефосфорилација од стране других протеин киназа или протеин фосфатаза. Лиганд везујући домен и тирозин киназни домен су делови једног истог протеина (**слика 1**) (**Krauss, 2001**).

Након везивања лиганада механизми димеризације, као и механизми активације њиховог интрацелуларног домена се разликују. Грађа RTK, механизми њихове активације и кључне компоненте унутарћелијске сигналне мреже су високо еволутивно конзервативни од нематода до човека. Генетичке промене које мењају њихову активност, бројност, ћелијску дистрибуцију и регулацију се често срећу код канцера (**Lemmon и Schlessinger, 2010**).

ERBB фамилија онкопротеина обухвата четири структурно сродна тирозин киназна рецептора: HER1/ERBB-1, HER2/ERBB-2, HER3/ERBB-3 и HER4/ERBB-4. Код ове фамилије екстрацелуларни домен рецептора се састоји од четири субдомена: два богата цистеином (субдомени II и IV) и два задужена за везивање лиганада (субдомени I и III) (**Reiter, 2010**).

Лиганди RTK

Лиганди RTK су растворљиви или мембрански везани пептидни/протеински хормони који обухватају нервни фактор раста (енгл. Nerve Growth Factor, NGF), фактор раста тромбоцита (енгл. Platelet-derived Growth Factor, PDGF), фактор раста фибробласта (енгл. Fibroblast Growth Factor, FGF), епидермални фактор раста (енгл. Epidermal Growth Factor, EGF) и инсулин. Везивање лиганада за рецепторе доводи до појачане тирозин киназне активности рецептора, које последично стимулише каскаду реакција, доводећи до промена у ћелијској физиологији и/или обрасцима генетичке експресије. RTK сигнални путеви имају широк спектар функција укључујући регулацију ћелијске пролиферације и диференцијације, промовишу преживљавање ћелије и модулацију ћелијског метаболизма. Неке мутиране форме рецептора фактора раста код канцера људи, довеле су до пролиферативног сигнала чак и у

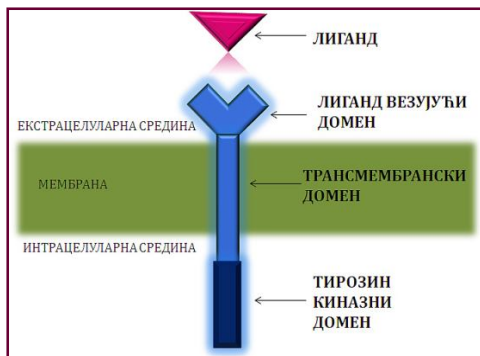
одсутству лигананда (Cross и Dexter, 1991; Bafico и Aaronson, 2003; Газибара, 2003).

Везивање различитих лиганда за рецепторе тирозин киназа доводи до тога да рецептор формира димере или олигомере, након чега унакрсно фосфорилише многобројне тирозине на својим цитоплазматским доменима. Односно, протеин киназа сваког рецепторног мономера фосфорилише одређену групу тирозинских остатака на цитосолном домену свог димерног партнера, тј. долази до *аутофосфорилације*, односно *трансфосфорилације*. Настали фосфотирозини служе као везујућа места за друге протеине у RTK посредованој сигналној трансдукцији (Lemmon и Schlessinger, 2010)

У случају мутација рецептора, могуће је да дође до константне активности тирозин киназног домена. Такође неки мутирани рецептори, са неактивним киназним доменом, могу нормално да димеризују, али не могу унакрсно да фосфорилишу нормалан рецептор у димеру. Из овог разлога, ако су мутирани рецептори присутни у вишку онемогућавају функционисање нормалних рецептора, тако што формирају неактивне димере са њима. Делеција у *EGFR*-у код неких тумора уклања део екстрацелуларног домена рецептора, па су ови мутирани рецептори способни да формирају активне димере, чак и у одсутству епидермалног фактора раста и тако стварају неадекватан стимулаторни сигнал (Liu W и сар., 2007; Kotsakis и Georgoulas, 2010; Han и сар., 2011).

РЕЦЕПТОР ЕПИДЕРМАЛНОГ ФАКТОРА РАСТА И СИГНАЛНИ ПУТЕВИ

Рецептор епидермалног фактора раста (MIM# 131550, <http://www.metalife.com/OMIM/131550>) се као и остали чланови фамилије рецептора тирозин киназа, састоји од N-терминалног екстрацелуларног,



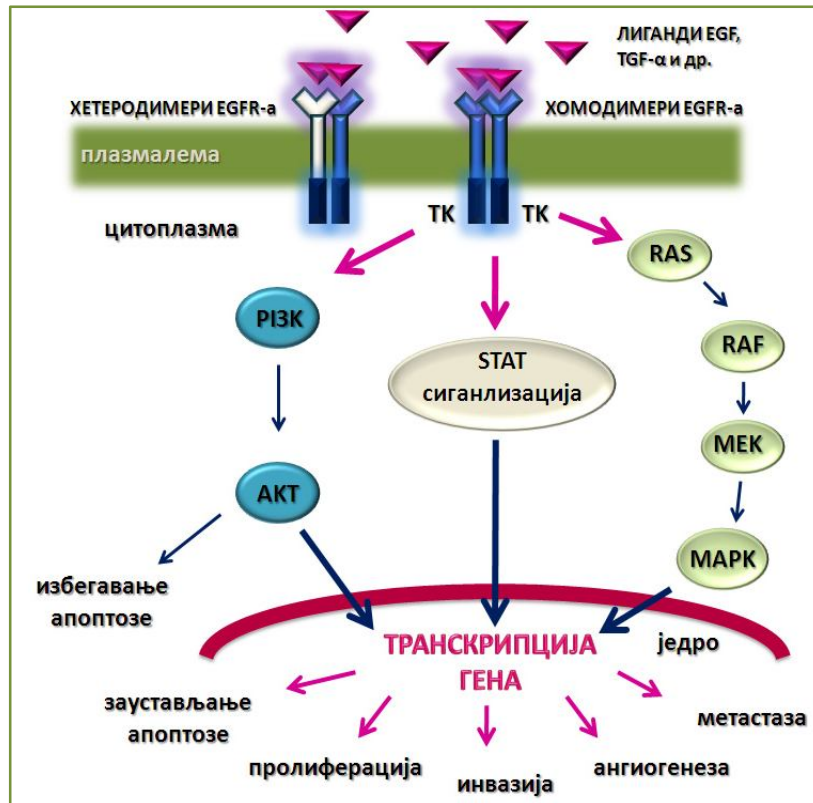
Слика 1. Структура EGFR-а.

лиганд-везујућег домена, трансмембранског липофилног сегмента и C-терминалног интрацелуларног региона, који садржи тирозин киназни домен (слика 1). Различити лиганеди могу да се везују за рецепторе и да их активирају индукујући аутофосфорилацију ТК домена, који је често погођен мутацијама. У нормалним, здравим ћелијама, чланови ове фамилије задужени су за регулацију бројних процеса у ћелији, али њихове аберантне измене доводе до низа интрацелуларних сигнала, који су усмерени ка пролиферацији канцера, редукцији апоптозе, инвазији, развоју метастаза и стимулацији тумором индуковане ангиогенезе (Sharma и сар, 2007).

Показано је да је EGFR хомолог ретровирусном онкогену v-erbB (Yamamoto и сар., 1983). Око 11 лиганеда може да активира EGFR, а неки од њих су: епидермални фактор раста, трансформишући фактор- α , амфирегулин и др. Након везивања лиганда долази до формирања хомодимера или хетеродимерских комплекса са неким од чланова ERBB фамилије, што даље води ка активацији ТК домена и унакрсној, тзв. трансфосфорилацији овог домена. Након тога долази до формирања места на ТК домену за везивање адапторских протеина, Grb2 и Sos-a, који активирају Ras и фосфатидилинозитол-3-киназу, (енгл. phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K), водећи ка три главна сигнална пута, Ras/MAPK; PI3K/Akt и JAK/STAT (слика 2). Они између осталог доводе и до пролиферације, ангиогенезе и заустављања апоптозе (Kim и сар., 2014).

Паралелно са активацијом рецептора отпочиње и његово рециклирање помоћу клатринских везикула и упућивање ка мембрани, или разградња помоћу лизозома. Поред активације ових сигналних каскада, примећено је да EGFR може да се транслоцира у нуклеус где потпомаже транскрипцију, везује се за циклине D и E, и потпомаже везивање транскрипционог фактора STAT5. Такође је показано да овај нуклеусни EGFR, може да утиче на механизме за

поправку оштећења DNA насталих прекидима оба ланца (Nyati и сар., 2006; Szumiel, 2006).



Слика 2. Сигнални пут епидермалног фактора раста.

K-Ras нум

Фосфорилисани тирозини EGFR-а активирају Ras преко адапторних протеина Grb2 (енгл., growth factor receptor-bound protein 2) и Sos1 (енгл., son of sevenless1), а потом се Ras везује за Raf и цео комплекс се везује за ћелијску мембрану где посредује у преносу сигнала преко MAPK пута (енгл., mitogen-activated protein kinase). Фосфорилисани MAPK формира димере који могу да се транслоцирају до нуклеуса где могу да стимулишу транскрипционе факторе као што су Jun, Fos и E2F који доводе до аберантне транскрипције мноштва гена и потенцијално до онкогенезе. Мутације *K-Ras* су честе код NSCLC-а, а њихова фреквенца показује и интернетичке разлике (Cox и Der, 2010; Ganti, 2010; D’Arcangelo и Cappuzzo, 2012).

PI3K пут

Други пут активације је посредован преко фосфатидилинозитол-3-киназе. EGFR активира PI3K тако што фосфорилише фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат, да би формирао фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат који тада активира Akt. Фосфорилисани Akt има неколико ефеката, и у цитоплазми и у једру, који укључује инхибицију проапоптотичких фактора, попут BAD (енгл. Bcl2 Antagonist Of Cell Death), прокаспазе-9 и Foxo фамилију транскрипционих фактора (енгл. Forkhead (FKHR) Family Of Transcription Factors) (Nyati и сар., 2006). PI3K су важни молекули јер учествују у бројним процесима као што су раст, пролиферација, миграција и преживљавање (Cantley и сар., 2002), а заједно са Ras молекулима бивају често погођени мутацијама код разних тумора људи (Downward, 2008).

STAT3 и STAT5

Сигнални пут JAK-STAT обично почиње од цитокинских рецептора, који омогућују различите путеве од мембране до нуклеуса користећи свега неколико елемената. Многи цитокини користе овај пут да доведу до брзе измене у транскрипцији специфичних гена (Krauss, 2001; Spasovski и сар., 2013). Фосфорилисани EGFR може директно или индиректно преко Src молекула да активира STAT протеине (енгл. signal transducer and activator of transcription, STAT1, STAT3 и STAT5) (Nyati и сар., 2006). Активирани EGFR фосфорилише STAT3 и STAT5, који формирају димере. Ови димери се транслоцирају у нуклеус где врше транскрипцију гена који промовишу пролиферацију, преживљавање и онкогенезу. Након активације, EGFR може да доведе и до настанка нових крвних судова неопходних за развој тумора, тзв. неоангиогенезу, такође и до покретљивости туморских ћелија, адхезије и инвазије *in vitro* ћелијских линија (Quesnelle и сар., 2007; Ganti, 2010; Konjević и сар., 2013).

ГЕНЕТИЧКЕ ВАРИЈАНТЕ

Наследни материјал може да се мења мутацијама и рекомбинацијама и то доводи до генетичке и фенотипске варијабилности. Генетичке варијације, односно разлике на нивоу гена, могу се проучавати у оквиру једне популације или између популација. Значај генетичке варијабилности је вишеструка, нарочито у контексту персонализације медицине, нпр. због различите предиспозиције појединаца за развој болести (**Ma и Lu, 2011**).

Када се посматрају гени, заправо одређени локуси у DNA секвенци, постоје они који имају само један облик, али и такви који могу имати више облика и означавају се као полиморфни гени. **Полиморфизам**, дословно значи више облика, односно два или више различитих нормалних облика истог гена (тзв. алела) који заузимају један генетички локус, од којих ни један није предоминантан, при чему је у популацији учесталост најмање фреквентног алела **већа од 1%**, (**Lander и сар., 2001**) те се та учесталост не сматра резултатом мутационог процеса. Измена свега само једне базе у нуклеотиду се означава као полиморфизам појединачног нуклеотида (енгл. Single Nucleotide Polymorphism, SNP) (**Passarge, 2001; Frazer и сар., 2009; Glubb и Innocenti, 2011**).

Мутације су по дефиницији „трајне наследне промене у генетичком материјалу које се остварују или на функционалном (генском) или на организационом (хромозомском) нивоу, па се зато најчешће и деле на генетичке и хромозомске“ (**Маринковић и сар., 1981**). Такође, то су промене у секвенци нуклеотида која се трајно задржава и преноси на следећу генерацију ћелија, али не и на цео организам, уколико је реч о соматским мутацијама или се преноси на потомство уколико је реч о мутацијама у полним ћелијама. Мутација општено има **мање од 1%** у популацији (**Schulz, 2005**).

Међутим, обзиром да номенклатура није усаглашена када је у питању композиција нуклеотида, према предлогу den Dunnen-а (2000) отворена је јавна дискусија (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>) о дефинисању основних појмова као што су између осталог и „мутације“ и „полиморфизми“, па постоји предлог да се због тих тумачења ове измене зову варијантама. Наиме у одређеним обласитма се под мутацијом подразумева *промена*, у другима је то *промена која је везана са болешћу*, даље, полиморфизам се тумачи као нешто што није мутација, односно *није промена која је у вези са болешћу*, тј. *промена које има више од 1% у популацији* (**den Dunnen и Antonarakis, 2000**); мада постоје одређени предлози

да се то питање реши (**Eilbeck и сар., 2005**), ипак није постигнут концензус и дискусија се и даље води. Има даље научника који у полиморфизме убрајају полиморфизме појединачних нуклеотида, инсерције-делеције и варијанте у броју копија (**Glubb и Innocenti, 2011**). Други пак приказују да **структурне варијанте** у ширем смислу обухватају све базне парове који се разликују између појединачна, а нису SNP-ови. У структурне варијанте убрајају инсерције-делеције (енгл. insertions - deletions, indels), блок субституције, инверзије и измене у копијама гена (**Frazer и сар., 2009**).

SNP може постојати унутар промоторског региона, егзона, интрона или интергенских региона, што доводи до различитих ефеката: некад изостанка било каквог ефекта, преко изостанка функционалног протеина, до оног са измењеном структуром и/или функцијом. Најчешће, измене не утичу на функцију протеина, већ само на његов аминокиселински састав. Данас је познато више од 62 милиона SNP-ова, односно, код човека има тачно: 62.680.572 SNP-а (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) (21.02.2014.). Испитивање SNP-ова се спроводи у оквиру великих пројеката што доприноси порасту информација о овим варијантама, тако да данас постоје поред приватних и јавне SNP базе података (**Sherry и сар, 2001; Kitts и Sherry, 2002; Church и сар., 2013**). Фреквенца и образац појаве SNP-а у геному нису униформни, односно познато је да се SNP-ови јављају на сваких 1000 база, али ово ипак зависи од дела генома. Фреквенција SNP-ова је различита међу кодирајућим и некодирајућим регионима DNA молекула, али показује и етничке разлике међу популацијама (**Broeckel и Hessner, 2006**).

Потреба изучавања SNP-ова огледа се у томе што могу да постану биомаркери за откривање, развој и примену циљне терапије, давање прецизне дијагнозе код оних код којих се болест развила, одређивање најчешћег сета полиморфизама код пацијената који су резистентни или који не реагују на терапију, односно укључивање генетичких особина у постојеће дијагностичке класификације (**Golub и сар., 1999; Ma и Lu, 2011**). Потреба за тестовима којима се могу идентификовати је велика, при чему они морају бити поуздани, доступни и лако изводљиви, што је важно за базична научна истраживања, али и за свакодневну медицинску праксу. Постоје SNP технологије које се користе за откривање нових полиморфизама и за генотипизацију нових алела већ познатих полиморфизама на циљним секвенцама. Ове технологије су еволуирале од временски и новчано захтевних, до аутоматизованих, ефикасних и релативно доступних метода. До данас не постоји идеалан и униформан метод за генотипизацију SNP-ова који би одговарао свим истраживачима.

RFLP (енгл. Restriction fragment length polymorphism) је била тешко изводљива метода у генотипизацији SNP-ова, пошто је откривена пре PCR методе (**Kwok и Chen, 2003**). Постала је врло применљива усавршавањем PCR методе и заснива се на PCR амплификацији жељеног фрагмента са одговарајућим паром прајмера, након чега се PCR продукти подвргавају дејству рестрикционих ензима, а након те дигестије, добијени RFLP продукти детектују помоћу гел електрофорезе. Могуће је да уопште не дође до дигестије PCR продуката или да буде непотпуна дигестија, што је ограничење ове методе (**Broeckel и Hessner, 2006**).

EGFR

EGFR је смештен на р краку хромозома 7p11.2, обухвата око 200 kb и садржи 28 егзона. Ген кодира синтезу протеина који се састоји од 464 аминокиселина, молекуларне тежине од 170 kDa, са високим афинитетом за EGF лиганд. Екстрацелуларни домен је кодиран егзонима 2–16 и два региона богата цистеином су кодирана егзонима 5–7 и 13–16. Трансмембрански домен је кодиран егзоном 17, тирозин киназни домен је кодиран егзонима 18–24 и карбокси-терминални регион је кодиран егзонима 25-28 (**Reiter и сар., 2010**).

СрG острва, односно секвенце богате цитозином и гуанином, су тешке за амплификацију због формирања стабилних секундарних структура (**Musso и сар., 2006; Sahdev и сар., 2007; Mamedov и сар., 2008; Jensen и сар., 2010; Farrell и Alexandre, 2012**). Идентификована су у промоторном региону и људских и мишијих гена који обухватају 2004 базна пара од нуклеотида -873 до +1131 у човечјем гену, и 1048 базних парова од нуклеотида -418 до 630 у секвенци код мишева (А из АТG иницијалног метионин кода је одређен +1). Ова „острва“ имају GC састав од 72% и 64% (**Reiter и сар., 2010**). DNA узорци NSCLC-а испитивани у овој студији, имали су висок GC садржај и то 75.45% G + C састава у секвенци од 660 базних парова (**Obrovčić и сар., 2013**).

Регулација EGFR-а

Још увек недовољно расветљена, регулација генетичке експресије *EGFR-а* је под утицајем различитих фактора. Код већине еукариота постоје „ТАТА“ и „СААТ“ секвенце од око 30-80 бр усходно од места иницијације транскрипције RNA, заправо регулаторни елементи за везивање хистона или транскрипционих фактора. *EGFR* 5' регион има мањак ових регулаторних елемената и висок GC саржај у промотору, због чега се разликује од већине 5'

региона еукариота односно, иницијација транскрипције RNA у *EGFR*-у се дешава на вишеструким старт транскрипционим местима (**Ishii и сар., 1985; Johnson и сар., 1988**). За активност *EGFR* промотора неопходан је транскрипциони фактор Sp1 и откривана су његова вишеструка везујућа места (**Ishii и сар., 1985; Kageyama и сар., 1988 а,б; Xu и сар., 1993; Grinstein и сар., 2002**). Сматра се да на регулацију транскрипције *EGFR*-а утичу и појачивачи који кооперативно стимулишу промоторску активност од којих је један локализован усходно, близу места иницијације транскрипције, а други је у интрону (**Maekawa и сар., 1989; McInerney и сар., 2001; Liu W и сар., 2005**).

Инхибиција *EGFR*-а

Постоје инхибитори *EGFR*-а који се везују за рецептор и спречавају преношење нисходних сигнала помоћу неколико механизма. Након тирозин киназне активације *EGFR*-а, одмах се активирају инхибиторни механизми који не захтевају *de novo* синтезу протеина, што укључује дефосфорилацију помоћу тирозин фосфатазе (енгл. Protein Tyrosine Phosphatases, PTPs) и ендоцитозу. Тако да је важно одржавање равнотеже између ТК-а и РТР-а, јер недостатак РТР-а има онкогени потенцијал. Важни *EGFR* инхибитори који су кодирани генима чија транскрипција почиње након активације *EGFR*-а су означени као индуцибилни повратни инхибитори (енгл. Inducible Feedback Inhibitors, IFIs). Постоје четири таква протеина код сисара и они се везују и инактивирају не само *EGFR* већ и све чланове ErbB фамилије, па се могу означити као негативни регулатори целе ErbB сигналне мреже (**Segatto и сар., 2011**).

Молекуларне карактеристике *EGFR*-а код NSCLC-а

EGFR могу да активирају различити типови лигананда и након активације се покреће много сигналних путева, где кључни молекули тог сигналног пута такође могу да буду погођени мутацијама (**Yarden, 2001**).

EGFR је био први молекул, који је одабран за развој циљне терапије због честих измена гена *EGFR* сигналног пута код NSCLC-а. Први приступи у лечењу укључивали су моноклонална антитела, cetuximab, која блокирају интеракцију лигананда и рецептора, а нови приступи користе мале молекуле, реверзибилне ТК инхибиторе (енгл., Tyrosine kinase inhibitor, TKI) и то „gefitinib“ (Iressa®; AstraZeneca, London, UK) и „erlotinib“ (Tarceva®; Roche, Basel, Switzerland) код напредног и рекурентног NSCLC-а (**Chan и сар., 2006; Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labels [Интернет]; Keedy и сар., 2011;**

Pirker и Filipits, 2011). Међутим, често се јавља резистенција након оваквог лечења и појава секундарних мутација (**Oxnard и сар., 2011**);

Гени EGFR сигналног пута мутирани су код NSCLC-а и веома ретко у другим туморима (**Chan и сар., 2006**). Код гена EGFR-а и његовог сигналног пута врши се идентификација мутација ради одређивања механизма осетљивости на лекове, примарне или стечене резистенције нпр. на киназне инхибиторе (**PDQ Cancer Information Summaries [Интернет], 2013**).

Постоје етничке разлике у појави мутација EGFR-а и чешће су код пацијената са аденокарциномима, источно-азијским етницитетом, непушачима и женског пола, и управо ова група пацијената је добро реаговала на TKI терапију (**Shigematsu и сар., 2005; Chan и сар., 2006**). У зависности од географског подручја најчешће су нађене мутације EGFR-а и KRAS-а код пацијената оболелих од NSCLC-а. KRAS мутације се јављају код аденокарцинома, чешће су код мушкараца и пушача, али су релативно ретке код источно-азијске популације. Међутим, постоје докази да се EGFR мутације и KRAS мутације код истог тумора међусобно искључују (**Пао и сар., 2005**). У новије време помињу се и други биомаркери поред EGFR, KRAS, и ALK, Met, ROS-1, и истиче потреба за молекуларним тестирањем NSCLC-а због тзв. онкогено пријемчивих мутација (**Weinstein, 2002**), које стварају карактеристичан онкогени фенотип (**Korpany и сар., 2014**).

Мутације које погађају критични регион ТК домена, задужен за пренос нисходних сигнала који је кодиран егзонима 18-21, су најчешће делеције, инсерције и тачкасте мутације. Ако се занемаре мутације, попут инсерција у егзону 20, које су у вези са резистенцијом, тачније, тачкаста мутација T790M (с.2369C>T, rs121434569) која је у асоцијацији са секундарном резистенцијом, главне су делеције секвенце од четири аминокиселине (del 746–750) у егзону 19 и супституција леуцина аргинином у кодону 858 (L858R) (с.2573T>G, rs121434568) у егзону 21 код NSCLC пацијената (**Liu W и сар., 2007; Liu G и сар., 2008; Kotsakis и Georgoulis, 2010**)(слика 7). Често је EGFR амплификован (**Hirsch и сар., 2003; Lynch и сар., 2004; Paez и сар., 2004; Cappuzzo и сар., 2005**) или је претерано експримиран (**Merlino и сар., 1985a; Merlino и сар., 1985 б; Hirsch и сар., 2003**).

Међутим, упркос постојећим мутацијама не реагују сви пацијенти исто на примењену терапију (**Ma и Lu, 2011**), па се наметнуло питање шта је то што одређује поменуте различитости. За одговор на то питање су регрутовани

полиморфизми *EGFR-a*, обзиром да имају показану улогу у његовој регулацији, све у циљу откривања других потенцијалних биомаркера, односно персонализацију терапије.

***EGFR* полиморфизми**

У *EGFR*-у је већ откривено много полиморфизама (**Lander и сар., 2001**) у оквиру пројеката мапирања људског генома (International HapMap Project, <http://www.hapmap.org/>) и (Environmental Genome Project, <http://egp.gs.washington.edu/>). Варијанте *EGFR-a* могу да измене функцију протеина и тако измене и одговор на дејство лекова. Код човека број SNP-ова за рецептор епидермалног фактора раста износи 4.635 (21.02.2014.), који се открићима нових SNP-ова *EGFR-a* стално увећава (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

EGFR се испољава у неколико епителијалних канцера, укључујући канцер плућа, дојке, бешике, простате и колоректални канцер и често је превише експримиран, што је често у вези са лошом прогнозом. Има важну улогу не само у карциногенези, већ и у третману канцера који укључује нпр. тирозин киназне инхибиторе. Код носилаца мутација *EGFR-a* са тумором плућа могуће је предвидети одговор на TKI, али се и амплификација *EGFR-a* наводи као фактор који може да предвиди овај одговор (**Cappuzzo и сар., 2005; Liu W и сар., 2007; Sweetman, 2009; Kotsakis и Georgoulas, 2010**). Међутим, пошто није увек јасна ова корелација, постоје и други фактори, попут полиморфизама, који могу да буду показатељи одговора на терапију и регулацију *EGFR-a*. Врло је вероватно да ће се открити све варијанте које утичу на експресију или функцију *EGFR-a* и да ће се испитати њихови ефекти на осетљивост према терапији.

Највише проучаван полиморфизам *EGFR-a* је једноставан цитозин-аденин, CA тандемски поновак (енгл. CA simple sequence repeat, CA-SSR) у интрону 1 *EGFR-a*, који се јавља у распону од 14-22 поновка, са најчешћим алелом од 16 поновака (**Liu G и сар., 2008**). Показане су интересне разлике у овом интронском локусу (**Liu W и сар., 2003**), као и да је CA тандемски поновак у асоцијацији са *EGFR* експресијом и да је њихова дужина у инверзном односу према количини *EGFR* iRNA и протеина, као и осетљивошћу према ерлотинибу *in vitro* (**Gebhardt и сар., 1999; Buerger и сар., 2000; Amador и сар., 2004; Nomura и сар., 2007; Liu G, и сар., 2008**). Показано је да транскрипциона активност *EGFR-a* опада са порастом броја CA динуклеотида и да је овај

полиморфизам повезан са ефикасношћу инхибитора EGFR-а (**Amador и сар., 2004; Etienne-Grimaldi и сар., 2005; Brandt и сар., 2006; Han и сар., 2011**).

Претходне студије су показале неколико полиморфизама појединачних нуклеотида у транскрипционом старт месту промотора EGFR-а, укључујући -216G>T (dbSNP-ID: rs712829) у Sp1, месту препознавања транскрипционих фактора и -191C>A (dbSNP-ID:rs712830) смештеног 4bp усходно од једног од транскрипционих старт места (**Liu W и сар., 2005; Rudin и сар., 2008**). Због локације у региону важном за транскрипцију, ови полиморфизми су испитивани и *in vitro* и *in vivo*, због њихове улоге у модификацији промоторске активности и одговору на EGFR-TKI терапију. Liu и сарадници (2005) су применили су трансекцију између људског канцера и примарних ћелијских линија, где су уочили значајно већу промоторску активност и EGFR-а експресију -216G у поређењу са -216T алелом. У две проспективне клиничке студије пацијената оболелих од канцера третираних ерлотинибом (**Rudin и сар., 2008**) или гефитинибом (**Liu G и сар., 2008**), -216G>T и -191C>A су биле у вези са већом фреквенцијом штетних реакција лекова као што су раш и диареја. Међутим носиоци -216T алела су имали боље преживљавање без погоршања болести за време примене гефитиниба (**Liu G и сар., 2008**). Сличне резултате објавили су Jung и сарадници (2012), и показали да је већа стопа одговора на лечење гефитинибом или ерлотинибом и дуже преживљавање без погоршања болести код пацијената са -216G/T генотипом у поређењу са онима који имају G/G генотип. У складу са овим подацима, не би било изненађујуће да ова два полиморфизма имају потенцијал да предвиде ефикасност и безбедност лечења канцера, што их номинује за могуће фармакогенетичке биомаркере за EGFR-TKI активности.

Полиморфизам 181946G>A ((D994D), rs2293347) је смештен у кодирајућем региону, али не долази до измене аминокиселинског састава протеина пошто је реч о синонимној промени. Постоји корелација између овог генотипа и одговора на TKI (гефитиниб). Показано је да се фреквенце генотипова 2293347G>A и најчешће испитиваног тандемског поновка, CA-SSR нису знатно мењале у односу на пол, године и хистолошки тип (**Ma и сар., 2009**). Дистрибуција генотипа 181946C>T се знатно разликовала између оболелих и здравих. Показано је такође, да овај полиморфизам може да буде маркер за подложност ка обољевању од канцера плућа (**Choi и сар., 2007**).

ПРЕГЛЕД МЕТОДА У ДЕТЕКЦИЈИ МУТАЦИЈА *EGFR*-А

Доступност података секвенционираниог људског генома из 2001. године (**Lander и сар., 2001**), као и стално усавршавање технологија омогућило је различите приступе у откривању промена у туморима, што укључује истраживања мутација, профилисање генетичке експресије, промене у копијама гена, хиперметилације CpG острва, откривања микро RNA и митохондријских мутација, тј. истраживања из области епигенетике, из домена протеомике итд. (**Осак и сар., 2009; Brambilla и Gazdar, 2009**). Значајност молекуларног тестирања пре отпочињања са првом линијом лечења оболелих од напредних облика NSCLC-а потврдили су резултати неколико студија. Иако није занемарљива резистенција на терапију гефинитибом и ерлотинибом, повећан број доказа указује да пацијенти са мутацијама *EGFR*-а имају знатно побољшање након третмана овим TKI, у односу на стандардну хемотерапију, док се супротан ефекат појављује код пацијаната са туморима, који немају мутације *EGFR*-а (**Lynch, и сар. 2004; Paez и сар. 2004; Pao и сар. 2004; Oxnard и сар., 2011**).

Поред метода које су коришћене раније, постоје и софистициране, високо специфичне методе, које могу да одреде присуство мутација и у веома малом узорку и обично су доступне за одређивање познатих, али не и нових мутација *EGFR*-а код NSCLC пацијената. Такође, доступне су само малом броју добро опремљених лабораторија, захтевају скупу опрему и реагенсе и ангажман уско специјализованих стручњака. Због широког спектра метода у употреби за детекцију варијанти *EGFR*-а, при чему одабир методе и њено подешавање зависи од специфичног случаја који се истражује, долази до разлика нпр. у интерпретацији интензитета експресије рецептора (**Scagliotti и сар., 2004**). У оквиру пројекта „*Molecular Assays in NSCLC Working Group*“ су препоручени молекуларни *EGFR* тестови за употребу и предложена су упутства за чување, руковање и обраду ткива (**Eberhard и сар., 2008**). Ипак не постоји дефинитиван закључак и препорука која је најбоља метода за откривање мутација односно варијанти *EGFR*-а код пацијената са немикроћелијским канцером плућа.

Једна од првих метода која је коришћена у одређивању нивоа експресије *EGFR* протеина и њихове модификације је имунохистохемија (енгл. Immunohistochemistry, ИHC). Предност ове методе је што може да очува морфологију тумора, а заснива се на везивању антитела обележених видљивим обележивачем за специфичне антигене у одређеним деловима ткива (**Ramos-Vara, 2005; Eberhard и сар., 2008**). FISH методом (енгл. Fluorescence In Situ Hybridization) се одређују бројне копије специфичног гена и локација циљних

секвенци помоћу флуоресцентног обележивача (**Varella-Garcia, 2006**). Главна препрека за рутинско извођење ове методе су недоступне молекуларне технике и недовољно искуства у раду са опремом за флуоресцентни микроскоп тамног поља (**Hirsch и сар., 2005; Eberhard и сар., 2008**). CISH (енгл. Chromogenic In Situ Hybridization) је алтернативна FISH метода која је прецизна, поновљива и користи микроскоп светлог поља да би показала број копија гена (**Sholl и сар., 2007; Eberhard и сар., 2008**).

Хроматографија (енгл. Denaturing high performance liquid chromatography DHPLC) је још једна метода којом се могу одредити наследне и соматске мутације (**Liu W и сар., 1998**). NSCLC узорци су анализирани овом методом коришћењем система Transgenomic WAVE HS (**Jänne и сар., 2006**), која је брза метода за откривање мутација *EGFR-a* са 100% осетљивости, без лажно негативних резултата. Генотипизација са овом техником може веома брзо да се уради, али јој недостаје капацитет да предвиди тачну природу мутација и неке, попут хомозиготних мутација, могу да буду неоткривене. Тако да је верификација директним секвенцирањем неопходна, да би се откриле мутације у позитивним случајевима (**Cohen и сар., 2006**). Делимично денатуришућа хроматографија (енгл. partially denaturing HPLC, pDHPLC) се користи да би се открио широк спектар варијанти са високом осетљивошћу, а нарочито је корисна за рутинско откривање *EGFR* варијанти (**Chin и сар., 2007**).

Директно DNA секвенцирање је засновано на *in vitro* синтези DNA са четири прекурзорна нуклеотида (енгл. deoxynucleotide, dNTP) и четири дидезоксинуклеотида (енгл. dideoxynucleotides, ddNTP) од којих је један обележен у четири PCR-а (**Sanger и сар., 1977**). Секвенцирање је данас аутоматизовано и реакције се изводе у једној туби која садржи све ddNTP-ове, при чему је сваки обележен другом бојом (**Innis и сар., 1988; Davis и сар., 2007**). Такође, постоје нове методе као што су пиросеквенцирање (**Ronaghi и сар., 1996; Dufort и сар., 2011**), хибридикационо секвенцирање (**Shendure и сар., 2004**), секвенцирање денатурацијом (**Chen и Huang, 2009**) итд. Финансијска и техничка ограничења, међутим, као и дужина извођења исте, ометају рутинско коришћење ове методе (**Sholl и сар., 2007, Nakamura и сар., 2010**). Она захтева и неколико корака (екстракцију DNA, PCR амплификацију, DNA секвенцирање, и интерпретацију секвенце). Осетљивост директног секвенцирања је субоптимална за клиничке узорке ткива јер мутирана DNA треба да обухвати више од 25% укупне DNA да би се лако детектовала (**Пао и сар., 2004**). Ипак се ова метода се и данас користи као „златни стандард“, нарочито приликом потврде секвенце тестиране неком од напредних метода.

Поред поменутих, најчешћа метода која се користи за генотипизацију варијанти *EGFR-a* је ланчана реакција полимеразе, јер се лако може прилагодити потребама истраживача у молекуларно-биолошким и другим истраживањима.

ЛАНЧАНА РЕАКЦИЈА ПОЛИМЕРАЗЕ

Опште карактеристике

Ланчана реакција полимеразе (енгл. Polymerase chain reaction, PCR) је ензиматска *in vitro* метода за експоненцијалну амплификацију специфичне и циљне секвенце DNA, приступачна и погодна за основна истраживања и различите клиничке примене (Gibbs, 1990; Powledge, 2004; Coleman и Tsongalis, 2006).

Научник Кери Малис (енгл. Kery Mullis) је 1983. године открио PCR методу због које је добио Нобелову награду (Mullis, 1993). Једна од предности PCR-а је и мала количина материјала, где је чак и један DNA молекул довољан за умножавање жељеног сегмента и више од милијарду пута, што је ефикасније за манипулацију и испитивања од употребе експерименталних животиња. Од иницијалних облика методе, па до данас, PCR је еволуирала, као и PCR уређаји и захваљујући својој прилагодљивости, има примену у откривању до сада непознатих гена, као и откривање нових мутација већ познатих гена, односно варијација гена, у откривању наследних и инфективних обољења у медицини; у одређивању таксономских категорија у еволуционој биологији; потом има примену у криминологији, у зоологији, екологији, археологији и палеонтологији итд. (Strachan и Read, 1999; Powledge, 2004).

Извођење PCR-а се заснива на имитацији процеса синтезе DNA који се дешава у живим организмима, односно на понављању синтезе DNA сегмента кроз циклусе у одговарајућем PCR уређају и то помоћу пара прајмера (пара супротно оријентисаних краћих низова нуклеотида, обично од 15-25 нуклеотида, комплементарних са ланцем матрицом, који ограничавају жељену, тзв. циљну секвенцу), термостабилног ензима DNA полимеразе, основних градивних елемената-нуклеотида (четири дезоксинуклеотид трифосфата: dATP, dCTP, dGTP и dTTP), у адекватном пуферу, уз додатак магнезијумових јона и по потреби адитива који побољшавају успешност PCR-а (Gibbs, 1990; Помац и сар., 1999; Strachan и Read, 1999; Powledge, 2004;).

Првобитни PCR експерименти извођени су са полимеразом изолованом из *Escherichiae coli* и захтевали су поново додавање ензима у PCR реакциону смешу после сваког циклуса умножавања DNA; разлог је био термолабилност ензима изнад 94°C, температуре која је потребна за иницијалну денатурацију DNA. Напредак у развоју PCR методе и њено извођење, какво се данас ради, омогућило је откриће термостабилне DNA-полимеразе, изоловане из бактерије *Thermophilus aquaticus* која је пронађена у топлим изворима и гејзерима (**Gibbs, 1990; Strachan и Read, 1999; Bartlett и Stirling, 2003; Powledge, 2004;**).

PCR се може разматрати у три сегмента и то: изолација DNA или RNA из узорка и припрема PCR смеше, затим извођење PCR-а и на крају идентификација PCR амплификованог продукта процесом електрофорезе на гелу. Додатно се може потврдити директним секвенцирањем да ли су производи специфични. PCR апарат обезбеђује аутоматизовану и прецизну промену температуре од 30 до 40 пута која је неопходна за извођење полимеризације у циклусима. Један циклус PCR-а чине фаза денатурације DNA матрице на 95°C током 3-5 минута, фаза хибридизације прајмера на 42°C до 65°C у интервалу од 20 секунди до 1 минута и фаза елонгације на 72°C, тако да се ова фаза изводи на тој температури у трајању од 20 секунди до 2 минута. После последњег циклуса, врши се инкубација 5-15 минута на 72°C и овај поступак се назива финална елонгација. Број циклуса зависи од почетне концентрације молекула DNA и требало би оптимизовати између 25-40. Веома важан је избор температуре топљења (enpl. Melting temperature, T_m). T_m се дефинише као температура на којој 50% молекула DNA дисоцира, при чему је за раскидање GC базних парова потребна већа температура у односу на AT парове (**Innis и Gelfand, 1990; Rychlik и сар., 1990; Gibbs, 1990; Meltzer, 1998; Miller и Cunningham, 1999; Strachan и Read, 1999; Kolmodin и Birch, 2002; Grunenwald, 2003; Powledge, 2004; Coleman и Tsongalis 2006; Lo и Chan, 2006; Roux, 2009**).

Температура топљења прајмера се може израчунати према формули $T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$ (**Grunenwald, 2003**), а температура везивања прајмера $T_a = 0.3 \times (T_m \text{ прајмера}) + 0.7 \times (T_m \text{ продукта}) - 25$ (**Rychlik и сар., 1990**). Међутим сваку израчунату температуру топљења треба узети као оквирну, јер на њу могу да утичу и други чиниоци као што су компоненте пуфера, концентрације узорка и прајмера итд. (**Roux, 2009**). Често се емпиријски подешавају температура и време хибридизације прајмера, као и температура фазе елонгације која зависи од ензима. **Специфичност** се односи на тачно везивање прајмера за циљну секвенцу и температура има велику улогу у овом процесу. **Сензитивност** PCR-а представља меру количине циљне секвенце која

се може открити мимо неспецифичних продуката. **Ефикасност** углавном зависи од концентрације и квалитета узорка као и од концентрација полимеразе (Gibbs, 1990).

Фактори који утичу на успешност PCR-а

Основна правила за извођење PCR-а обухватају поштовање принципа стерилног рада и спречавања свих могућих извора контаминације узорака, хемикалија и опреме. Пошто је PCR брза и ефикасна, али изузетно сензитивна, метода, веома је важно избећи контаминацију. Лабораторијски материјал, сваки реагенс, као и узорци могу бити контаминирани, па је потребно спровести мере превенције и елиминисати могућност контаминације. Извор контаминације могу осим DNA и PCR продуката, да буду и Taq полимераза, антитела, рестрикциони ензими, реверзна транскриптаза, желатин, BSA и други (Persing, 1991; Ромац и сар., 1999; Coleman и Tsongalis; 2006).

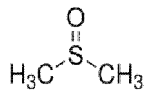
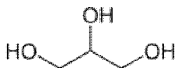
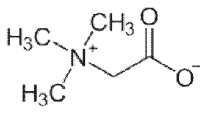
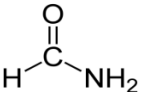
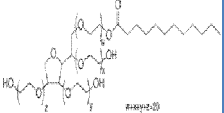
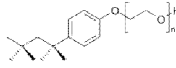
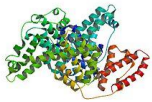
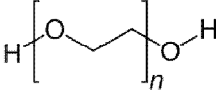
Параметри PCR технике који могу да утичу на њену тачност и ефикасност су бројни, укључујући концентрацију DNA узорка, концентрацију магнезијумових јона, PCR температурне услове, као и додатак и концентрацију PCR адитива (Grunenwald, 2003; Roux, 2009). Фактори инхибиције PCR-а су нпр. хепарин, ткиво фиксирано у формалину и прожето парафином, фенол и јонски детерџенти који инхибирају активност полимеразе, ксилен цијанол и многи други (Ромац и сар., 1999; Roux, 2009). На ефикасност PCR-а утичу фактори као што су концентрације: магнезијум хлорида, нуклеотида, полимеразе, али и број циклуса, температура хибридизације прајмера итд. Оптимална концентрација $MgCl_2$ варира од 0,5 mM до 5 mM. Оптимална концентрација dNTP зависи од дужине фрагмента који се амплификује, (најчешће се користе 10 mM dNTP), концентрације Mg^{+2} јона и концентрације прајмера. Вишак нуклеотида у смеши уклања слободни магнезијум чиме се смањује активност ензима и смањује ефикасност хибридизације прајмера, тако да је количина продуката амплификације мања. За PCR амплификацију треба користити парове прајмера, који имају сличан GC састав и дужину, односно сличну температуру топљења. Број циклуса се обично креће од 25 до 35 и не би требало да буде већи од 45, јер се повећавањем броја циклуса повећавају неспецифични продукти амплификације, а смањује количина циљног продукта, али ако је број циклуса мали, мањи је и принос PCR продуката. Када су остали параметри оптимални, број циклуса највише зависи од почетне концентрације молекула DNA (Kolmodin и Birch, 2002; Grunenwald, 2003; Powledge, 2004; Coleman и Tsongalis 2006; Lo и Chan, 2006; Roux, 2009).

PCR метода има бројне предности и већина лабораторија које се баве молекуларном биологијом, онкологијом, генетиком, фармакогенетиком и другим сродним областима примењује је у својим истраживањима. Мада у пракси, ово може да буде изузетно осетљива метода, јер бројни параметри се морају ускладити емпиријски, стално водећи рачуна о могућој контаминацији, па оптимизација услова реакције, да би се добили жељени резултати може да буде прави изазов (**Persing, 1991; Obradović и сар., 2013**), нарочито када треба умножити узорке који садрже велику количину гуанин-цитозин региона, као што је случај са промоторним регионом *EGFR-a* који има изузетно висок садржај GC парова, и виши од 88% (**Ishii и сар., 1985**). Наиме, GC региони теже да створе стабилне и комплексне секундарне структуре у DNA узорку, па могу да блокирају DNA полимеразу за време PCR-а и да воде у неефикасну амплификацију (**Usdin и Woodford, 1995; Woodford и сар., 1995; McDowell и сар., 1998; Hube и сар., 2005; Kang и сар., 2005**).

Адитиви

Успешност PCR-а зависи од неколико параметара и не постоји униформан сет параметара за све PCR методе, па се оптимизација услова постиже емпиријски што захтева утрошак времена и новца, нарочито ако су у питању региони богати гуанином и цитозином. Уобичајена стратегија у овим случајевима је додавање адитива или растварача у PCR смешу што побољшава услове и води ка амплификацији циљне секвенце (**Grunenwald, 2003; Pratyush и сар., 2012**). Адитиви који повећавају принос и специфичност PCR-а и њихов опсег дејства су глицерол (5–20%) (**Weissensteiner и Lanchbury, 1996**), формаид (**Sarkar и сар., 1990**), диметилсулфоксид (енгл. dimethyl sulfoxide, DMSO) (1-10%) (**Willhite и Katz, 1984; Jensen и сар., 2010**), нејонски детерџенти (Tween 20 и Triton X-100) (0,05–0,1%) (**Bachmann и сар., 1990; Varadaraj и Skinner, 1994**), полиетилен-гликол (енгл. polyethylene glycol, PEG) (5–15%) (**Kramer и Coen, 2001**) и говеђи серум албумин (енгл. bovine serum albumin, BSA) (0,1ug/ul-0,8ug/ul) (**Kreader, 1996, Abu Al-Soud и Radstrom, 2000**) и бетаин (0,5M-2,5M) (**Baskaran и сар., 1996; Henke и сар., 1997; Frackman и сар., 1998; Sahdev и сар., 2007**). Није познато сасвим како ови адитиви делују, али се претпоставља да утичу на температуру топљења прајмера или олакшавају хибридизацију прајмера мењајући секундарну структуру DNA матрице, заправо повећавају стабилност Taq полимеразе. (**Sarkar и сар., 1990; Weissensteiner и Lanchbury, 1996; Jensen и сар., 2010**).

Табела 1. Приказ тестираних адитива и њихових основних карактеристика.

Адитиви	
	<p>Диметил-сулфоксид (енгл., <i>dimethyl sulfoxide</i>, DMSO, IUPAC), молекулске формуле C₂H₆OS, моларне масе 78.13 gmol⁻¹, је безбојна течност добро растворљива у води као и у многим растварачима (Willhite и Katz, 1984).</p>
	<p>Глицерол, (<i>propane-1,2,3-triol</i>, IUPAC) молекулске формуле C₃H₈O₃ је безбојна, безмирисна и хигроскопна течност моларне масе 92.09382 gmol⁻¹ (PubChem, Open Chemistry Database, а).</p>
	<p>Бетаин (<i>2-(trimethylazaniumyl)acetate</i>, IUPAC), молекулске формуле (C₅H₁₁NO₂) познат као глицин бетаин или N,N,N-триметилглицин је органско једињење моларне масе 117,146 gmol⁻¹, беле боје, прашкасте конзистенције, растворљив у води (PubChem, Open Chemistry Database, б).</p>
	<p>Формаид (<i>formamide</i>, IUPAC) молекулске формуле (CH₃NO), познат и као метан амид, моларне масе 45.04 gmol⁻¹, је безбојна уљана течност (PubChem, Open Chemistry Database, в).</p>
	<p>Tween-20 (C₂₆H₅₀O₁₀), познат и као полиетилен гликол сорбитан монолаурат, односно (2-[2-[3,4-bis(2-hydroxyethoxy)oxolan-2-yl]-2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy]ethyl dodecanoate IUPAC), је прозирна, жућкаста или жућкасто-зеленкаста течност моларне масе 522.340 gmol⁻¹ (PubChem, Open Chemistry Database, г).</p>
	<p>Triton X-100 (C₁₆H₂₆O₂) је безбојна течност растворљива у води, моларне масе 250.376 gmol⁻¹. Ово је заправо нејонска мешавина сурфактанта која варира у броју етокси група (окси-1,2-етанедил) (PubChem, Open Chemistry Database, д).</p>
	<p>Говеђи серум албумин (енгл. <i>Bovine serum albumin</i>, BSA) је серумски протеин изолован из говеда, и то као пета фракција из процедуре пречишћавања што му је и други назив, „Фракција V“. Кристалисани BSA у чврстом агрегатном стању је беле боје, са кристалима различитог облика, 70,000 молекулске тежине мерено осмотским притиском (Bailey и Hawn, 1943).</p>
	<p>Полиетилен-гликол (енгл. <i>Polyethylene glycol</i>, PEG) поли (оксиетилен), припада полимерима етилен оксида и воде и његовим етрима. У зависности од молекуларне тежине, варирају у конзистенцији од течног до чврстог, молекуларне формуле (C₅₅H₁₁₂O₂₈), односно моларне масе 1220.734 gmol⁻¹ (PubChem, Open Chemistry Database, њ).</p>

Врсте PCR-а

PCR има широку примену у научним истраживањима, зато што може да се прилагоди различитим захтевима (Kahn и сар., 1991; Heid и сар., 1996; Ромац и сар., 1999). Овде ће бити приказан кратак преглед неких PCR метода.

Стандардни PCR се изводи уз коришћење једног пара прајмера који омогућава амплификацију циљне секвенце и служи само за детекцију њеног присуства или одсуства. Варијанте су **мултиплекс PCR** и **умрежени** (енгл. nested) **PCR**. Мултиплекс PCR представља симултану PCR амплификацију различитих секвенци DNA уз коришћење више парова прајмера. Умрежени PCR је двофазна ланчана реакција полимеризације, где се продукт амплификације прве фазе користи као матрица за умножавање мањег дела ампликона, тј. циљне секвенце садржане у том продукту помоћу другог пара прајмера који су комплементарни циљним секвенцама унутар ампликона (Gibbs, 1990).

RT-PCR (енгл. Reverse Transcription PCR) је адаптација PCR методе којом је омогућено изучавање молекула RNA. Пошто молекули RNA не могу да служе као матрица, јер Таq полимераза користи искључиво једноланчани молекул DNA као матрицу, процесом реверзне транскрипције код RT-PCR-а, RNA се конвертује у комплементарни ланац DNA (сDNA). Овом методом се помоћу ензима реверзне транскриптазе целокупна геномска изолована RNA преводи у DNA. Прајмери који се користе су специфични за циљну секвенцу на сDNA молекулу. Применом RT-PCR може се одредити и количина iRNA. То је искоришћено у сврху одређивања нивоа експресије гена, јер је управо количина iRNA показатељ степена активности неког гена и не захтева пост PCR ангажмане око ткива, спречавајући потенцијалне контаминације PCR продуката. Квантификација продуката PCR смеше врши се одређивањем количине уграђених обележених нуклеотида или прајмера (Myers и Gelfand, 1991; Bustin, 2002).

PCR *in situ* је метода која омогућава локализацију специфичних секвенци нуклеинских киселина са високом сензитивношћу у оквиру морфологије појединачних ћелија. Поред стандардног *in situ* PCR постоји и *in situ* RT-PCR, а сваки од њих може бити директни или индиректни. PCR *in situ* се може извести на било ком ткивном препарату (узорци ћелијских суспензија, размаз ћелија, пресек ткива) на микроскопској плочици која се поставља у PCR апарат (Ромац и сар., 1999).

Real time PCR, PCR у реалном времену (енгл. Quantitative PCR, qPCR, познатији и као Real-Time PCR) је прецизна метода коришћена за мерење квантитета PCR продуката у реалном времену, нпр. одређивање нивоа експресије одређеног гена. Користи се и за одређивање присуства DNA секвенце у узорку и број копија у узорку. Real-Time PCR користи флуоресцентне боје попут Sybr Green, EvaGreen и DNA пробе које садрже флуорофоре, као што су TaqMan да се измери количина амплификованог продукта у реалном времену (**Heid и сар., 1996; Valasek и Repa, 2005**).

Постоје усавршене PCR методе и ради илустрације приказан је опис неких од њих попут мутант PCR-а (енгл. **mutant-enriched PCR**). Ова метода може да открије EGFR мутације у различитим врстама клиничких узорака укључујући оне добијене биопсијама, плеуралне флуиде, и хируршки одстрањена ткива NSCLC пацијената. Може да открије најпознатије мутације, али не и минорне, јер у клиничком узорку се може наћи и мала фракција мутираних и велика количина гена дивљег типа (**Asano и сар., 2006**). Ипак, показано је да су многе мутације промакле директном секвенцирању, а да их је мутант PCR успешно детектовао (**Zhang и сар., 2008**).

PNA-LNA PCR clamp (енгл. Peptide nucleic acid-locked nucleic acid PNA-LNA PCR clamp) је осетљива метода чијом применом могу да се открију индивидуалне мутације EGFR-а у присуству 100 до 1000 дивљег типа EGFR молекула. Укратко, резултати неколико студија су указали да многе ћелијске линије имају субпопулације које садрже специфичне мутације (**Nagai и сар., 2005**). Када се користе PNA clamp прајмери амплификација секвенци дивљег типа је потиснута, али амплификација мутиране секвенце је повећана (**Kosaka и сар., 2004; Nagai и сар., 2005**).

Дволанчани PCR продукт мерени **Light Cycler** уређајем је метода чији је принцип мерење флуоресценције боје SYBR Green кад се инкорпорира у дволанчани DNA молекул за време PCR-а, тако да детектује дволанчане формације PCR продуката. Ова метода је и брза и смањује ризик од контаминације, а њена предност је избегавање бојења етидијум бромидом, који је потенцијални токсикант (**Sasaki и сар., 2005**).

PCR-SSCP (енгл. Polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism) је осетљивија метода од директног секвенцирања PCR продуката и дозвољава идентификацију мутација, кад су тешке или немогуће помоћу директног секвенцирања. Више од 90% мутација *EGFR-а* је одмах препознато

овом методом, без лажно позитивних или лажно негативних резулата и може да се примени на FFPE ткиву откривајући мутације и са минималним количинама (<1 µg) стартне DNA (**Marchetti и сар., 2005**). Ипак већина ових напредних метода користи директно секвенцирање као потврду специфичности добијених резултата.

ЦИЉЕВИ

Варијанте *EGFR-a* -216G>T (rs712829), -191C>A (rs712830) и 181946G>A (rs229334) имају утицаја у регулацији *EGFR-a* који је често амплификован или претерано експримиран код немикроћелијског канцера плућа.

Обзиром да постоји разлика у фреквенци полиморфизама -216G>T (rs712829), -191C>A (rs712830) и 181946G>A (rs229334) у различитим етничким групама и да до сада нема података о фреквенци алела ових испитиваних варијанти *EGFR-a* у популацији здравих и популацији оболелих од NSCLC-a са територије Републике Србије, значај резултата ове дисертације огледа се и у њиховом одређивању, тумачењу и утврђивању значајности односа генотипа и демографских параметара.

Њихово испитивање се спроводи PCR методом, која има широку примену, али је прави изазов подесити све параметре за њено успешно извођење, па је основни циљ ове студије подешавање услова PCR методе за одређивање полиморфизма појединачних нуклеотида -216G>T (rs712829) и -191C>A (rs712830) *EGFR-a*, што може имати рутинску примену у истраживачким и дијагностичким лабораторијама.

Циљеви истраживања су следећи:

- Оптимизација PCR услова за амплификацију секвенце промотора *EGFR-a* који обухвата два појединачна полиморфизма нуклеотида и то -216G>T и -191C>A. Оптимизација обухвата подешавање концентрације магнезијума, подешавање температуре везивања прајмера, одабир најповољније концентрације DNA узорка и адекватног адитива, који побољшава ефикасност PCR методе.
- Процена утицаја адекватног адитива на успешност PCR методе у зависности од начина изолације DNA узорка.

- Одређивање полиморфизама појединачних нуклеотида -216G>T (rs712829), -191C>A (rs712830) и 181946G>A (rs229334) *EGFR*-а у популацији здравих особа и оболелих од NSCLC-а.
- Одређивање учесталости алела сва три полиморфизма у популацији здравих особа и оболелих од NSCLC-а са територије Републике Србије.
- Дистрибуција генотипа сва три SNP-а у односу на параметре као што су: пол, пушачки статус и године старости.
- Процена фактора ризика за обољевање од NSCLC-а и идентификација генотипа са потенцијалном заштитном улогом.
- Одређивање мутација *TP53* и установљавања везе са варијантама *EGFR*-а.
- Разматрање SNP-ова као потенцијалних нових биомаркера, обзиром на то да утичу на регулацију *EGFR*-а, односно да могу да предвиде безбедност и ефикасност лечења оболелих од NSCLC-а.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Испитаници

Ова ретроспективна студија обухватила је 90 DNA узорка и то од 47 оболелих од немикроћелијског канцера плућа и од 43 здрава контролна узорка.

У контролној групи случајним одабиром су биле особе које нису биле у сродству, добровољни даваоци крви са Института за молекуларну генетику и генетско инжењерство, Универзитета у Београду и добровољни даваоци крви из Крагујевца. Просечна старост је била 41,33 (25-66) године што је у корелацији са средњом вредношћу у укупној популацији са територије Републике Србије (**Demographic Yearbook in the Republic of Serbia, 2014**). При томе су критеријуми за укључивање у студију били следећи: да нису имали повишену телесну температуру, да нису били под терапијом, да нису имали хроничне болести и да нису узимали опојне дроге. Просечна старост за пацијенте је била 60,76 година (36-78).

DNA узорци у контролној групи су изоловани из крви, а изолација DNA за оболеле је извршена из ткива фиксираног формалином и прожетог парафином (енгл. formalin fixed and paraffin embedded, FFPE). Клинички и патохистолошки подаци за NSCLC пацијенте су добијени из Института за плућне болести Војводине, Клиника за пулмонарну онкологију, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду, Сремска Каменица. При том је ова студија одобрена од стране локалног Етичког комитета.

Селекција метода за детекцију мутација EGFR-a

Ради увида у спектар метода за откривање мутација и одлучивања која је метода најповољнија за ова истраживања, извршена је претрага највеће базе научних радова – Паб Меда (енгл. Pub Med; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Фокус претраге је био на методама објављеним у радовима за откривање мутација гена рецептора епидермалног фактора раста код пацијената немикроћелијског тумора плућа, а такође и хронолошким приказом њихове употребе кроз десетогодишњи период и процентуалном заступљеношћу у научним радовима. Анализирани су и нове софистициране методе и представљен значај за рутински лабораторијски и клинички рад.

Pub Med база је претражена у периоду април-мај и 2012. године, за све радове објављене од 01. јануара 2000. године до 31. децембра 2011. године. У овој претрази кључне речи су биле следеће: “mutations (мутације)”, “epidermal growth factor receptor (епидермални фактор раста)”, “EGFR”, “non-small cell lung cancer (немикроћелијски тумор плућа)”, “NSCLC”, заправо “mutations epidermal growth factor receptor EGFR non-small cell lung cancer NSCLC (мутације епидермални фактор раста EGFR немикроћелијски тумор плућа NSCLC)” у појединачној претрази, са активираним ограничењима која су укључила “Humans (људи)”, “Cancer (канцер, тумор)” и “Publication Date (време објављивања)”. Искључени су ревијски чланци, извештаји (клиничка испитивања и извештаји случаја), упутства, уредништва (писма уреднику, новости, кореспонденције итд.), чланци који нису били на енглеском језику или они који нису били доступни, они који нису одговарали терминима претраге (чланци који говоре о другим протеинима сигналног пута, а не о EGFR-у, или нпр. о другим болестима) и коначно они који су објављени 2012. године.

Изолација DNA молекула

Изолација DNA из периферне крви

За изолацију DNA из крви здравих особа коришћених за контролне узорке је коришћен QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany).

На дно тубе сипано је 20 μ l протеиназе К (20 mg/ml), додато 200 μ l узорка, 200 μ l пуфера АL и промешано вортексовањем. Инкубирано је у воденом купатилу 10 min/56°C. Додато је 200 μ l 96-100% етанола и промешано вортексовањем. Овако припремљен узорак нанет је на QIAamp Mini spin колоницу и извршено је центрифугирање на 8 000 rpm/1 min. Колоница је испрана са 500 μ l пуфера AW1 и центрифугирана на 8 000 rpm/1 min. Колоница је испрана са 500 μ l пуфера AW2 и центрифугирана на 13 000 rpm/3 min. На крају је колоница пребачена у чисту тубу, додато је 200 μ l пуфера АЕ и центрифугирано на 8 000 rpm/1 min. Пречишћена DNA је стајала на -80°C до примене PCR методе.

Изолација DNA из свежег замрзнутог ткива немикроћелијског тумора плућа

Изолација DNA из ткива тумора плућа, које је након операције замрзнуто на -20 °C, вршена је у два дана. Првог дана исецкано је ткиво и пренето у епендорф. Додато је 500 μ l NE пуфера. Центрифугирано је у ултрацентрифуги 2 min на 13000 rpm. Одбачен је супернатант. Додато је 500 μ l NE пуфера, 10 μ l 10% SDS и 50 μ l

протеиназе К (шток 10 mg/ml). Вортексовано је, па инкубирано 24 h на 50 °C, па поново вортексовано.

Другог дана додато је 500 μ l смеше једнаких запремина фенол: хлороформ/изоамил алкохол, при чему су хлороформ/изоамил алкохол у односу 24:1. Смеша је добро промешана, центрифугирана 13000 rpm 3 min на +4°C, узет је супернатант и пребачен у нови епендорф. У воденом раствору је остала DNA, па се пажљиво пипетирало, да се не узме интерфаза са протеинима. Додато је потом, 500 μ l смеше хлороформ/изоамил алкохола (24:1), добро ресуспендовано, центрифугирано 13000 rpm 3 min на +4°C, узет супернатант и пребачен у нови епендорф. У воденом раствору је остала DNA, па се опет пажљиво пипетирало, да се не узме интерфаза са протеинима. Поновљен је поступак од додавања 500 μ l смеше хлороформ/изоамил алкохола.

Додато је: 1/10 волумена водене фазе 4 M NaCl и 2 волумена 96% етанола са -20°C. Промешано је, и уочило се да преципитира DNA у виду кончића. Центрифугирано је на 13000 rpm 5 min на +4 °C да се исталожи DNA. Одстрањен је етанол. Додато је 10 μ l 3 M Na-ацетата (који пречишћава DNA) + 300 μ l 96% етанола са -20°C. Промешано је и центрифугирано на 13000 rpm 10 min на +4 °C. Одстрањен је етанол из тубице. Додато је 70% етанола са -20°C. Центрифугирано је 13000 rpm 2 min на +4 °C. Одстрањен је етанол и осушен пелет. DNA је растворена у 100 μ l dH₂O. Пречишћена DNA је стајала на -20°C до примене PCR методе.

Изолација DNA из парафинизованих ткива немикроћелијског тумора плућа

DNA је изолована из ткива фиксираним формалином и прожетог парафином коришћењем кита PureLink™ Genomic DNA Kits (Invitrogen/ Life Technologies, Carlsbad, CA). Процедура је обухватила неколико корака. За сваки узорак је коришћено 8-10 пресека парафинизованог ткива тумора плућа дебљине 9 μ m. Процедура за екстракцију парафина је обухватила додавање 1 ml реагенса за екстракцију парафина CitriSolv™ Clearing Agent (Fisher cat. no. 22-143-975). Након тога је изведено центрифугирање на максималној брзини 3 min на собној температури. Након додавања 1 ml 96–100% етанола и вортексовања извршено је центрифугирање на максималној брзини 3 min на собној температури. Након понављања корака за екстракцију парафина, извршена је инкубација са отворним поклопцем на 37°C 10 min да би се одстранио сав преостали етанол.

Према препоруци произвођача, лизати су припремљени употребом 180 μL пуфера за дигестију (енгл., PureLink® Genomic Digestion Buffer) и 20 μL протеиназе К и (енгл., Proteinase K). Након инкубације на 50°C, 3 h, центрифугирања на максималној брзини 3 min на собној температури и пребацивања у стерилне тубе, додато је 20 μL RNase A, измешано вортексовањем и 2 min инкубирано на собној температури. Потом је додато 200 μL пуфера за лизирање/везивање (Lysis/Binding Buffer) вортексовано, и додато 200 μL 96–100% етанола у лизат, потом је вортексовано да би се добио хомоген раствор. Колоне (PureLink™ Spin columns) су пребачене у тубе за сакупљање (Collection Tube), додат је лизат и извршено је центрифугирање 10,000 x g 1 min на собној температури, након чега су колоне пребачене у нове тубе за сакупљање (PureLink® Collection Tube). Колоне су испране са 500 μL пуфера за испирање (Wash Buffer 1), извршено је центрифугирање на собној температури 10,000 x g 1 min, након чега су колоне пребачене у нове тубе за сакупљање (PureLink® Collection Tube); додато је 500 μL пуфера за испирање (Wash Buffer 2), центрифугирање је уследило потом на максималној брзини 3min на собној температури. Одстрањене су тубе за сакупљање и колоне стављене у 1,5-ml тубе. На крају је DNA елуирана два пута са 25 μl пуфера за елуцију (PureLink® Genomic Elution Buffer), при чему је након првог испирања извршено инкубирање на собној температури 1min и центрифугирање максималном брзином 1min на собној температури и пребацивање колоне у нове 1,5ml тубе. Након другог испирања извршено је центрифугирање максималном брзином 1,5 min на собној температури, и тек тада су одстрањене колоне и DNA је остала у туби од 1,5ml. Измерена је концентрација DNA помоћу флуорометра (Qubit® Fluorometer (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA). Пречишћена DNA је стајала на -80°C до примене PCR методе.

Биоинформатичке анализе секвенце

Температура топљења прајмера је израчуната као $T_m = 4x(G+C) + 2x(A+T)$ (Grunenwald, 2003), а температура анилинга је одређена по формули $T_a = 0.3x(T_m \text{ прајмера}) + 0.7x(T_m \text{ продукта}) - 25$ (Rychlik и сар., 1990). Садржај GC парова и CpG нуклеотида у узорку DNA су одређени и представљени коришћењем биоинформатичког инструмента "EMBOSS CpGPlot /CpGReport/Isochore" програма (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/>), при чему је анализирано 100 нуклеотида, са померајем од по једног нуклеотида.

Генотипизација

PCR продукти варијација -216G>T (rs712829), -191C>A (rs712830) и 181946G>A (rs229334) су детектовани помоћу 2% гел електрофорезе, а PCR-RFLP продукти на 3% агарозном гелу, уз употребу боје SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA) на уређају E-Gel® Safe Imager™ Real-time Transilluminator (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA). Сви реагенси коришћени за PCR амплификацију су купљени од Инвитроцена (енгл. Invitrogen, Carlsbad, CA).

Метода за генотипизацију варијација -216G>T (rs712829) и -191C>A (rs712830) представља адаптацију методе по Liu (**Liu G и сар., 2008**). Наиме, промотор регион *EGFR-a* од 197 базних парова, који обухвата оба полиморфизма појединачних нуклеотида је амплификован у PCR-у на уређају Techne Genius Thermocycler (Techne Ltd, Cambridge, UK). При томе су коришћени следећи прајмери 5`-CTC-CTC-CTC-CTC-TGC-TCC-TC-3` и 5`-GGG-GCT-AGC-TCG-GGA-CTC-3`. Реакциона мешавина је сачињена од 1 µl геномске DNA, 0,2 µM сваког прајмера, 0,25 mM сваког dNTPs и 0,625 U Taq DNA полимеразе, и изведена је у 1×PCR пуферу у укупној запремини од 25 µl. Концентрације MgCl₂ су тестиране од 0,5 mM до 2,5 mM, односно од 1% до 5% за DMSO. Иницијална денатурација је изведена на 94°C у трајању од 3 min, након чега је следило 45 циклуса денатурације на 94°C, 30 s, анилинг на 63°C, 30 s и екстензија на 72°C, 60 s; са финалном екстензијом на 72°C, 7 min.

EGFR полиморфизам 181946G>A (rs229334) је одређен по методи Ма и сар. (**Ма и сар., 2009**), у следећим условима: иницијална денатурација на 94°C, 3 min; 45 циклуса денатурације на 94°C, 30 s, анилинг на 55°C, 30 s, екстензија на 72°C, 60 s; са финалном екстензијом на 72°C, 7 min. При томе су коришћени прајмери: „Forward“ прајмер 5`- GAA-CCA-AGG-GGG-ATT-TCA-TT -3` и „Reverse“ прајмер 5`- ATG-AGG-TAC-TCG-TCG-GCA-TC -3`. PCR је изведен у укупној запремини од 25µl, са 1 µl геномске DNA, 0,25 µM сваког прајмера, 0,25 mM сваког dNTPs, 1,7 mM MgCl₂, и 0,625 U TaqDNK полимеразе у 1× PCR пуферу. PCR продукти за овај полиморфизам износили су 244 бр. PCR реакције за сва три полиморфизма, као и PCR-RFLP метода примењене су на FFPE DNA и на контролним DNA узорцима.

Карактеристике SNP-ова из ове студије, њихова локација у гену *EGFR*, функционални значај, прајмери коришћени за генотипизацију, температуре топљења у PCR-у, ензими коришћени за RFLP анализе приказани су на **табели 2**.

Табела 2. Карактеристике SNP-ова: позиција, функционални значај, прајмери коришћени за генотипизацију, температура топљења, рестрикциони ензими. Према: Ma F, и сар., (2009)

Бр.	dbSNP-ID	Замена база	Тачна локација у гену	Позиција	Улога	PCR прајмери	Tm	Ендонуклеаза
1.	rs712829	G>T	-216*	промотер	генетичка регулација	5'-CTCCTCCTCCTCTGCTCCTC-3'; 5'-GGGGCTAGCTCGGGACTC-3'	63°C	BseRI
2.	rs712830	C>A	-191*	промотер	генетичка регулација	5'-CTCCTCCTCCTCTGCTCCTC-3'; 5'-GGGGCTAGCTCGGGACTC-3'	63°C	Cfr42I (SacII)
3.	rs2293347	G>A	181946*(D994D)	егзон 25	синонимна варијанта	5'-ATGAGGTACTCGTCGGCATC-3'; 5'-GAACCAAGGGGATTTTCATT-3'	55°C	Tfi I

*Позиција нуклеотида почевши од ATG кода *EGFR*

dbSNP-ID-број SNP у бази података,

PCR-RFLP метода

PCR продукти за полиморфизме *EGFR*-а су одређени применом PCR-RFLP методе.

PCR продукти за полиморфизам 216G>Т су изложени дејству рестрикционог ензима BseRI (New England Biolabs, Ipswich, MA), односно за полиморфизам -191C>А дејству рестрикционог ензима Cfr42I (Sac II) (Fermentas/Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania). BseRI препознаје и исеца оба алела, показујући разлику између дивљег -216G и варијантног -216T типа као 159 bp и 156 bp (за -216G), насупротив 86 bp, 83 bp и 73 bp продуктима (за -216T). Са друге стране, Cfr42I сече само дивље алеле -191C на 165 bp и 32 bp продукте, док варијација -191A остаје непресечена. Дигестија за оба ензима је изведена у трајању од 60 min на 37°C.

PCR продукти од 244 bp за *EGFR* полиморфизам 181946G>А (rs229334) су излагани дејству рестрикционог ензима Fast digest TfiI (PfeI) (Fermentas/Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania), који препознаје и исеца варијантни 181946А алел на фрагменте од 171 bp и 73 bp, док дивљи тип 181946G остаје непресечен. Дигестија је изведена у трајању од 10 min на 37°C.

Градијент PCR

За полиморфизме -216G>Т (rs712829) и -191C>А (rs712830) градијент PCR је имао следећи температурни профил: иницијална денатурација је изведена на 94°C, 3 min; потом су следила 45 циклуса денатурације на 94°C, 30 s, анилинг у трајању од 20 s са повећањима од по два степена, на 61°C /63°C /65°C /67°C /69°C, екстензија на 72°C, 60 s; са финалном екстензијом на 72°C, 7 min.

„Touchdown“ PCR

Touch down PCR је примењена у овој студији, при чему је иницијална денатурација изведена на 94°C, 4 min; 2 циклуса денатурације на 94°C, 45 s, анилинг на 67°C/65°C /63°C /61°C 30 s, екстензија на 72°C, 90 s; са финалном екстензијом на 72°C, 10 min. Обе модификације Градијент PCR и Touch down PCR примењене су без додатака адитива.

Избор одговарајућег адитива за успешност PCR-а за полиморфизме -191C>A и -216G>T

У овој студији примењени су формаид, нејонски детерџенти - Tween 20 и Triton X 100, полиетилен гликол (PEG), глицерол, бетаин, (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) и BSA (Carl Roth GmbH BSA), ради одређивања најповољнијег адитива, односно његове најоптималније концентрације за успешно извођење PCR методе при чему је њихово тестирање спроведено на сва три типа изолованих DNA. Тестирани опсег концентрација адитива приказан је у **табели 3**.

При томе је коришћена КАРА Таq полимераза кита (КАРА Таq Hot Start PCR Kits Kapabiosystems, Boston, Massachusetts, United States) и према препоруци произвођача, примењен је следећи температурни профил, који се незнатно разликовао од првобитно оптимизованог: иницијална денатурација на 95°C, 5 min; 45 циклуса денатурације на 94°C, 30 s, анилинг на 63°C, 30 s, екстензија на 72°C, 60 s; са финалном екстензијом на 72°C, 7 min. PCR је изведен у укупној запремини од 25 µl, са 1 µl геномске DNA, 0,4 µM сваког прајмера, 0,2 mM сваког dNTPs и 1 U² ТаqDNK полимеразе у 1×PCR пуферу (BufferA), који је већ садржао 1,5mM MgCl₂. Приликом тестирања адитива PCR методе су спроведене у уређајима Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) и AB Applied Biosystems 2700 Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA).

Табела 3. Тестирани опсег концентрација свих адитива

Адитив	Пуно име адитива	Тестирани опсег концентрација
Glycerol	Глицерол	5-25%
DMSO	Диметил сулфоксид	1-10%
Tween 20	Нејонски детерџент	0,05-2%
Triton X-100	Нејонски детерџент	0,05-2%
PEG	Полиетилен гликол	2,5-25%
BSA	Говеђи серум албумин	0,1-1 µg/ml
Formamide	Формаид	1,25-15%
Betaine	Бетаин	0,5 M - 2,50 M

Анализа DNA на агарозном гелу

Анализа DNA при тестирању оптималних концентрација адитива је вршена на 2% хоризонталном агарозном гелу за PCR продукте, односно на 3% агарозном

гелу, за PCR-RFLP продукте. У гелове је пре полимеризације додаван етидијум бромид (5µg/ml). Електрофореза је текла у 1xTAE пуферу (40 mM Tris, 20 mM Na-acetat, 1 mM Na₂EDTA), при волтажи од 4-7 V/cm. DNA је визуализована осветљавањем гела UV светлом таласне дужине 266 nm. Трајни запис резултата добијен је фотографисањем гела CCD камером интегрисаном у систем за аутоматску дигиталну аквизицију слике, BioDocAnalyze системом. Величина фрагмената DNA одређена је помоћу адекватних комерцијалних маркера (Fermentas).

Анализа DNA на полиакриламидном гелу

Фрагменти варијације -216G>T (rs712829) су раздвајани на неденатуришућем 8% полиакриламидном гелу (Акриламид: N,N-метиленбисакриламид (29:1) (30% w/v), 100 mM Tris, 83 mM борна киселина, 1 mM EDTA pH 8; 0,1% (w/v) амонијум-персулфат, 0,01% (v/v) TEMED). Електрофореза је текла при напону од 10 V/cm у 1xTBE пуферу (100 mM Tris, 83 mM борна киселина, 1mM EDTA pH 8).

Бојење полиакриламидних гелова сребро-нитратом

Визуализација DNA на полиакриламидним геловима вршена је бојењем сребро-нитратом. Полиакриламидни гелови су, након електрофорезе, најпре фиксирани 30 минута у раствору 10% етанола и 0,5% сирћетне киселине. Након тога, гелови су бојени у 0,1% раствору сребро-нитрата 10 минута. Вишак сребра је уклањан испирањем најпре у бидестилованој води, а затим у развијачу, који је био следећег састава: 1,5% натријумхидроксида, 0,01% натријумборхидрида и 0,048% формалдехида. Гелови су у развијачу држани 20 минута. Фиксирање добијених трака вршено је потапањем гелова у 0,75% раствор натријум-бикарбоната. По завршетку електрофорезе, гелови су бојени сребро-нитратом и такође визуализовани и снимљени CCD камером.

Секвенцирање DNA

Да би се доказало да је добијени PCR продукт и жељени PCR продукт, а не неспецифични, примењено је директно секвенцирање PCR-а. Наиме, PCR продукти су пречишћени употребом кита QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) и директно секвенционирани на ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Анализе секвенцирања су спроведене коришћењем ABI PRISM® BigDye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit у оба правца („forward“ и „reverse“), користећи исте прајмере који су употребљени и за PCR амплификацију. Поређена

је жељена секвенца са референтном секвенцом *EGFR-a* (promoter region sequence, Gene accession No. M11234.1).

Откривање мутација у умноженим секвенцама TP53 применом PCR-SSCP методе

Ланчане реакције полимеразе су изведене у апарату Perkin Elmer Thermal Cycler 2400. PCR реакциону смешу су сачињавале следеће компоненте: 100 ng геномске FF DNA, 1xPCR пуфер, 2 mM MgCl₂, 100 ng 5' прајмера, 100 ng 3' прајмера, 1 mM dNTP, 1 U Taq полимеразе, H₂O до 25 µl. Температурни профил реакција је био следећи: почетна денатурација на 95°C 5 min; 35 циклуса: денатурације на 95°C, 30 s; хибридизација прајмера са циљним секвенцама DNA у трајању од 45 секунди на температури карактеристичној за сваки пар прајмера; екстензије на 72°C, 60 s; завршна екстензија на 72°C, 7 min. За егзон 5 коришћен је „Forward“ прајмер 5'-TTC-CTC-TTC-TCA-CAG-TAC-TC-3' и „Reverse“ прајмер 5'-GCA-AAT-TTC-CTT-CCA-CTC-GG-3', при чему је температура везивања прајмера износила 58°C, а величина продукта 325 bp. Егзон 6 је умножен „Forward“ прајмером 5'-ACC-ATG-AGC-GCT-GCT-CAG-AT-3' и „Reverse“ прајмером 5'-AGT-TGC-AAA-CCA-GAC-CTC-AG-3' на температури топљења прајмера 60°C, при чему је величина продукта била 230 bp.

Егзон 7 је умножен „Forward“ прајмером 5'-GTG-TTG-CCT-CCT-AGG-TTG-GC-3' и „Reverse“ прајмером 5'-CAA-GTG-GCT-CCT-GAC-CTG-GA-3' на температури топљења прајмера 58°C, при чему је величина продукта била 139 bp. Егзон 8 и 9 су уможавани истим паром прајмера „Forward“ 5'-CCT-ATC-CTG-AGT-AGT-GGT-AA-3' и „Reverse“ 5'-CCA-AGA-CTT-AGT-ACC-TGA-AG-3' на температури од 58°C непоходном за њихово везивање, при чему је добијен продукт величине 330 bp. Успешност PCR-а је проверавана електрофорезом продуката амплификације 45 min 250V на 8% полиакриламидном гелу и бојењем етидијум бромидом (20mg/ml).

PCR-SSCP

PCR-SSCP (енгл. Polymerase Chain Reaction Single-Strand Conformation Polymorphism) је метода која се заснива на денатурисању PCR продуката загревањем у PCR уређају и њиховим електрофоретским раздвајањем. Разлике у пређеном путу једноланчаних DNA кроз гел потичу од разлика у DNA секвенци, односно различитог тродимензионалног облика тих једноланчаних DNA (Marchetti и сар., 2005). SSCP метода се примењује за брзу и релативно једноставну детекцију мутација у ћелијским DNA секвенцама. Овом методом се може детектовати тачкаста мутација циљне DNA секвенце присутна код више од

10% ћелија анализираних узорка са поузданошћу од 80-90%. PCR-SSCP се заснива на електрофоретском раздвајању једноланчаних DNA секвенци које се разликују у једном или више базних парова и услед тога имају различиту просторну конформацију, која условљава различиту покретљивост на електрофоретском гелу. Једноланчана DNA у одсуству комплементарног DNA ланца подлеже интрамолекулском спаривању база и формирају се специфичне 3D структуре, које не зависе од њене дужине. Замена једног или више нуклеотида драстично утичу на 3D конформацију једноланчаног DNA молекула.

Пошто се анализирају једноланчани DNA молекули неопходно је да се ради електрофореза на нижим температурама. За оптималан резултат треба водити рачуна и о дужини анализираних DNA секвенци, јер превелика дужина, виша од 35 нуклеотида, смањује поузданост методе.

У 5 μ l PCR продуката додавано је 7 μ l 95% формамида који делује као денатуришући агенс. Смеша је после денатурације у PCR апарату (96°C, 5 min), стављана на лед и одмах наношена на 10% полиакриламидни гел.

Електрофореза је изведена на 700V, 8h (при чему уколико се дода глицерол у гел, незнатно се скраћује време трајања електрофорезе). По завршеној електрофорези, бојење гелова је извршено сребро-нитратом, који је осетљивији од етидијум бромида.

Статистичка обрада резултата

Статистичке анализе су изведене груписањем хомозигота и хетерозигота у три одвојене групе за сваки полиморфизам: -191 C/C, C/A, A/A; -216 G/G, G/T, T/T, 181946 G/G, G/A, AA. Варијабле су такође груписане као доминантни (дивљи тип хомозигота у поређењу са хетерозиготом+хомозигот мутант) и рецесивни генетички модел (дивљи тип хомозигота+хетерозигот у поређењу са хомозигот мутантом).

Пошто није било статистички значајне разлике између дистрибуције генотипа између контрола и оболелих ($p > 0,05$), генотипови здравих и оболелих су повезани у једну групу за сваки SNP појединачно у популацији испитаника са територије Републике Србије.

За поређење средњих вредности година у групи оболелих и групи здравих испитаника коришћен је Т тест независности.

Године су представљене као категоричка варијабла са следећим опсегом: мање од 41, 41-61 и више од 61.

Испитан је значај варијабли година, пола и пушачког статуса за обољевање од канцера плућа међу болесним и здравим испитаницима коришћењем модела бинарне логистичке регресије. Сензитивност и специфичност методе су одређени коришћењем анализа за ROC криве.

Три SNP-а су тестирана помоћу Харди-Вајнергове равнотеже. Фреквенце хаплотипова и везана неравнотежа су израчунати софтверским пакетом Arlequin ver.3.0 (доступно на: <http://anthropologie.unige.ch/arlequin>). Фреквенције хаплотипова између добијених и очекиваних су упоређене помоћу Хи квадрат теста.

Подаци су анализирани коришћењем програмског пакета SPSS-17 software (SPSS, Inc.). Све p вредности мање од 0,05 су сматране статистички значајним. Тест за табеле контингенције и Хи квадрат тест (или Фишеров тест, када је било потребно), су примењени да би се добила асоцијација фреквенце генотипа између оболелих и контрола за сваки полиморфизам. Демографски подаци су поређени кроз генотип истим тестовима.

РЕЗУЛТАТИ

Резултати претраге Pub Med базе

Претрагом *Pub Med* базе 2012. године добијено је 1270 чланака у којима су дати резултати истраживања мутација *EGFR*-а код NSCLC-а. Након активираних лимита у претрази, као и претходно поменуте селективне елиминације неподобне литературе добијена су 292 научна рада (слика 3). Када је поновљена претрага са истим кључним речима и активираним лимитима две године касније, добијен је скоро удвостручен број часописа (2011 чланака добијених у појединачној претрази, закључно са 08.08.2014.). На основу анализе доступних скрининг и специфичних циљаних метода извршена је селекција адекватне методе која је и примењена у овој студији и то PCR-RFLP метода за генотипизацију *EGFR* полиморфизама.



Слика 3. Дијаграм часописа који су укључени, односно искључени из анализе.

Резултати показују да су имунохистохемијске методе првобитно биле примењиване у испитивањима мутација *EGFR*-а код NSCLC-а почетком 2000. године (график 1). Појединачне или у комбинацији са другим, имунохистохемијске методе су најзаступљеније биле у периоду од 2007-2009.

године. Денатуришућа течна хроматографија у комбинацији са директним секвенцирањем или са другим методама, је такође примењивна, али знатно мање него што је директно секвенцирање у комбинацији најчешће примењивано са PCR методом. Од 2006. године појављују се унапређене PCR методе, а развијају се и софистициране нове методе од 2007. године са знатним порастом сваке године. Ипак свака од ових метода, иако је била високоефикасна и специфична, захтевала је потврду секвенце директним секвенцирањем.

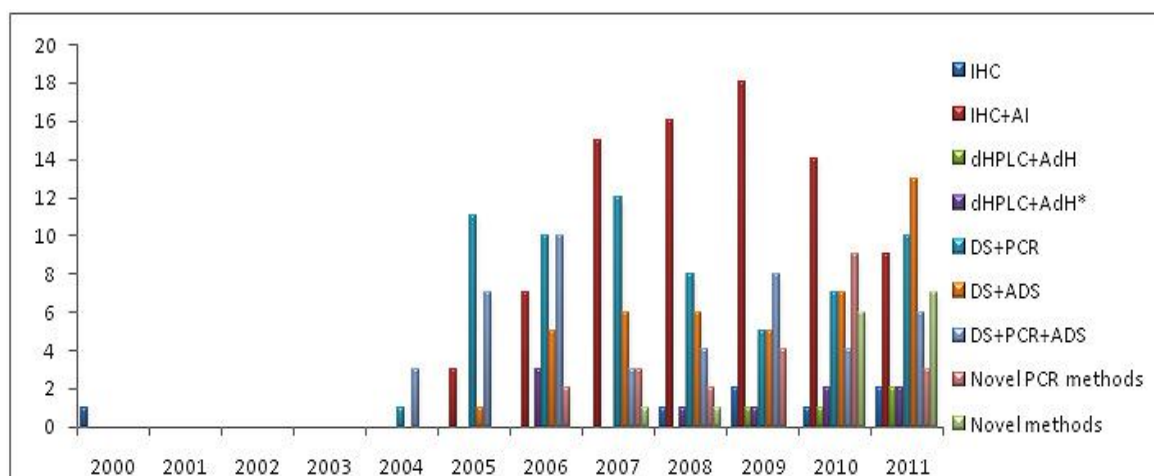


График 1. Број објављених часописа о методама за откривање мутација EGFR-а код NSCLC пацијената током година.

IHC=Immunohistochemical analysis-имунохистохемијске анализе, dHPLC=Denaturing high performance liquid chromatography-денатуришућа течна хроматографија, DS=Direct DNA sequencing-директно секвенцирање DNA, PCR=polymerase chain reaction-ланчана реакција полимеразе. AI= Additional methods to IHC-додатне методе IHC, као што су: у/или DS + у/или PCR + у/или FISH=fluorescence in situ hybridization-флуоресцентна in situ хибридизација + у/или CISH=chromogenic in situ hybridization-хромогена in situ хибридизација. AdH= Additional methods to dHPLC-додатне методе dHPLC као DS. AdH= Additional methods to dHPLC-додатне методе dHPLC : једна или више од једне. ADS= Additional methods to DS-додатне методе DS: једна или више од једне. Novel PCR methods-Нове PCR методе, Novel methods-Нове методе.*

Резултати показују да су процентуално најзаступљеније имунохистохемијске методе у комбинацији са директним секвенцирањем и/или PCR-ом, мада су оне коришћене раније (**график 2**). Директно секвенционрање, иако има извесна ограничења, остаје као „златни стандард“ у одређивању секвенце DNA и комбинује се са другим, али најчешће са PCR методама. Ниједна нова пласирана метода није примењена самостално, нити је било која друга метода, до директног секвенцирања, коришћена као контролна метода, тј., за

потврду секвенце. Тако да је комбинација директног секвенцирања и PCR-а примењена и у овој студији.

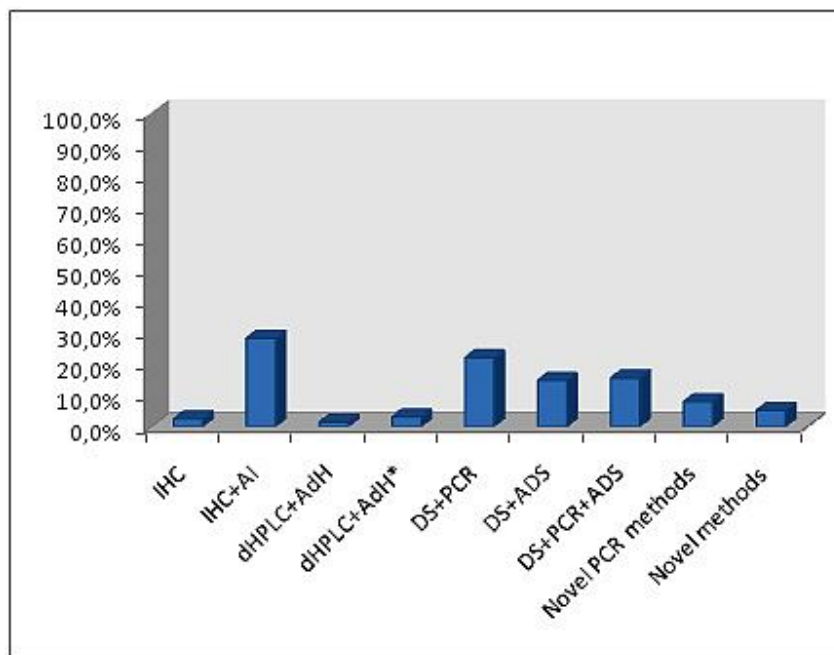
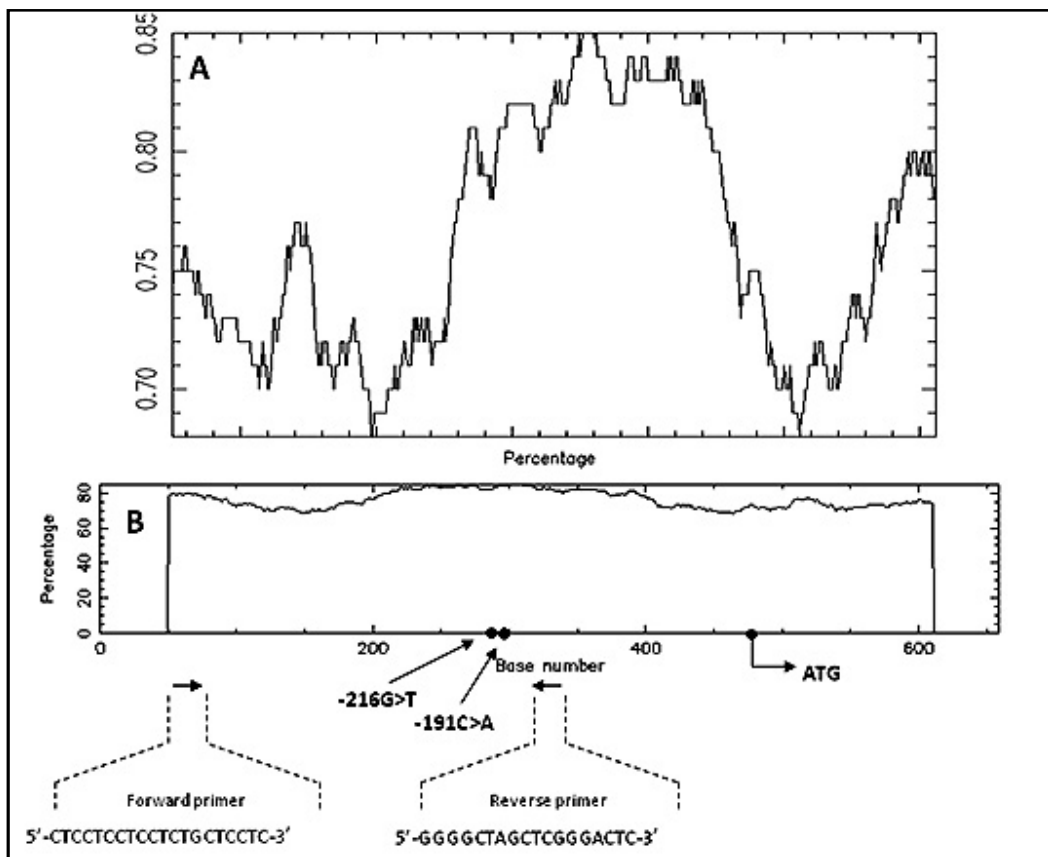


График 2. Процентуална заступљеност метода за откривање мутација EGFR-а код NSCLC пацијената.

Скраћенице: IHC=Immunohistochemical analysis-имунохистохемијске анализе, dHPLC=Denaturing high performance liquid chromatography-денатуришућа течна хроматографија, DS=Direct DNA sequencing-директно секвенцирање DNA, PCR=polymerase chain reaction-ланчана реакција полимеразе. AI= Additional methods to IHC-додатне методе IHC, као што су: и/или D.S + и/или PCR + и/или FISH=fluorescence in situ hybridization-флуоресцентна in situ хибридизација + и/или CISH=chromogenic in situ hybridization-хромогена in situ хибридизација. AdH= Additional methods to dHPLC-додатне методе dHPLC као DS. AdH*= Additional methods to dHPLC-додатне методе dHPLC : једна или више од једне. ADS= Additional methods to DS-додатне методе DS: једна или више од једне. Novel PCR methods-Нове PCR методе, Novel methods-Нове методе

Резултати анализе секвенце DNA узорка

Резултати анализе секвенце промоторног региона *EGFR-a*, коришћењем биоинформатичког инструмента "EMBOSS CpGPlot /CpGReport/Isochore" програм (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/>), показали су да регион има изузетно висок садржај GC парова, са 75.45% G + C садржајем у секвенци од 660 bp (sum C + G = 421) (слика 4). Испитивани регион садржи такозвана CpG острва који обухвата 558 bp (-450/ + 108 од стартног места транслације), са CpG односом 0,97. Резултатима анализе секвенце на слици 2 је показана позиција прајмера који су коришћени, позиција SNP-ова и ATG стартног места транскрипције.



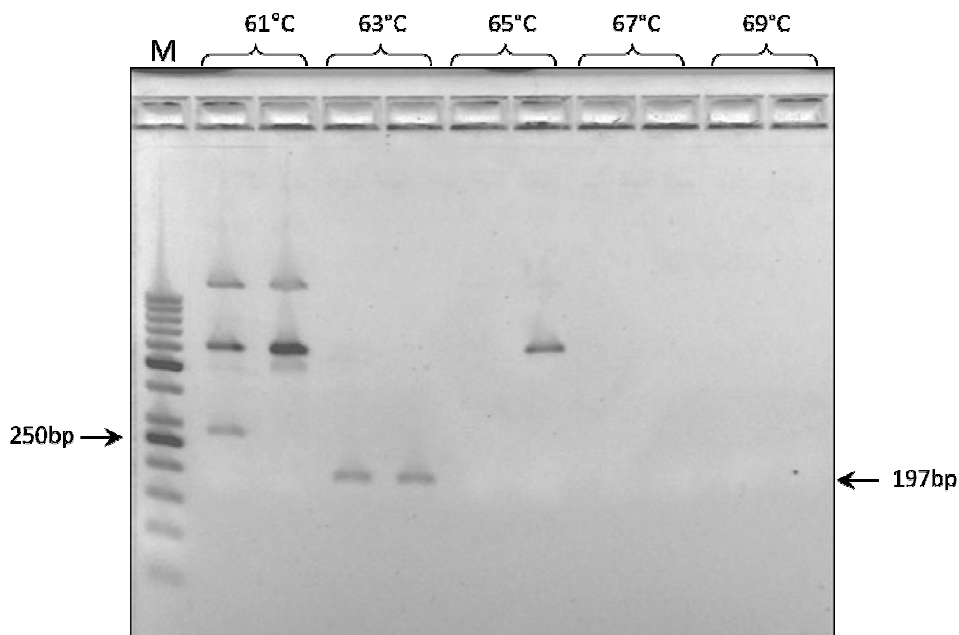
Слика 4. Промоторни регион *EGFR-a* (A) процентуални садржај GC парова и CpG нуклеотидни састав од 660 bp (B).

Резултати оптимизације PCR методе за EGFR полиморфизме

Резултати одређивања температуре везивања прајмера за PCR амплификацију

Након израчунате температуре топљења прајмера, израчуната је температура везивања прајмера (анилинга) и добијена је вредност од 56°C. У процесу оптимизације PCR-а, примењена је и тзв., *Touchdown PCR* која није дала резулте.

Користећи *Градијент PCR метод*, пет различитих температура анилинга је тестирано почевши од 61°C до 69°C. Резултати су показали да је најоптималнија температура анилинга 63°C (слика 6), иако је израчуната вредност температуре анилинга била 56°C, што показује неопходност емпиријског подешавања параметара важних за успешну PCR.



Слика 6. Ефекти температуре везивања прајмера на PCR амплификацију.

Колона М: 50bp DNA маркер

Резултати одређивања DNA концентрација код пацијената

Концентрације DNA пацијената, (изоловане из парафинизованих препарата) су износиле од 0,25 до 28,20 $\mu\text{g/ml}$ (**график 3**). Упркос вишеструким понављањима PCR-а најмања концентрација DNA узорка од 0,25 $\mu\text{g/ml}$, односно 0,01 $\mu\text{g/ml}$ у коначној запремини, није дала адекватне резултате. Концентрација DNA 0,0792 $\mu\text{g/ml}$ у коначној запремини, односно 1,98 $\mu\text{g/ml}$ геномске DNA, је обезбедила потпуне резултате и PCR амплификације и резултате рестрикције ендонуклеазама. Све DNA са мањом концентрацијом од поменуте, ако су имале успешне PCR амплификације, нису имале потпуне рестрикционе реакције за полиморфизме. Концентрације DNA контролне групе биле су задовољавајуће за успешну PCR амплификацију и рестрикционе реакције.

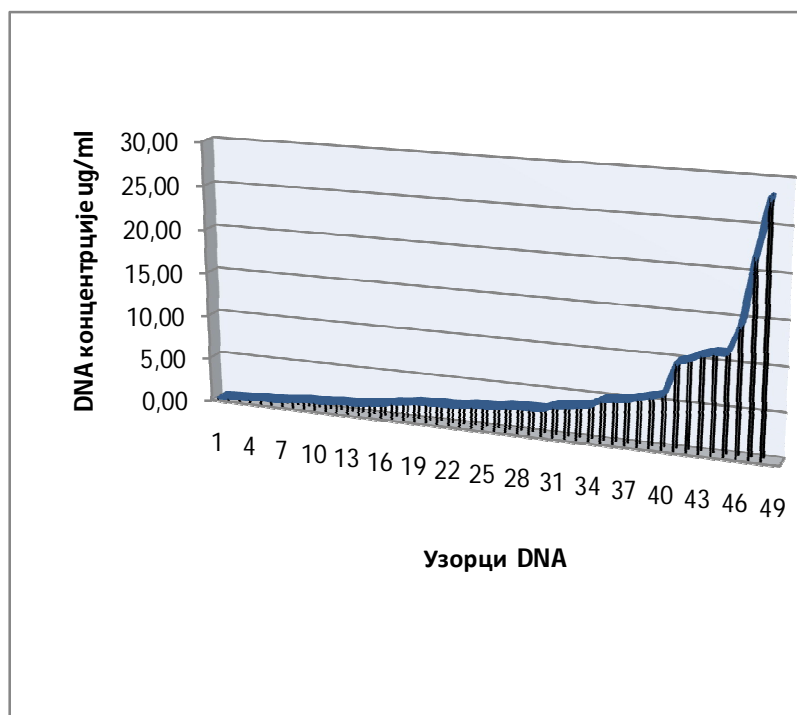
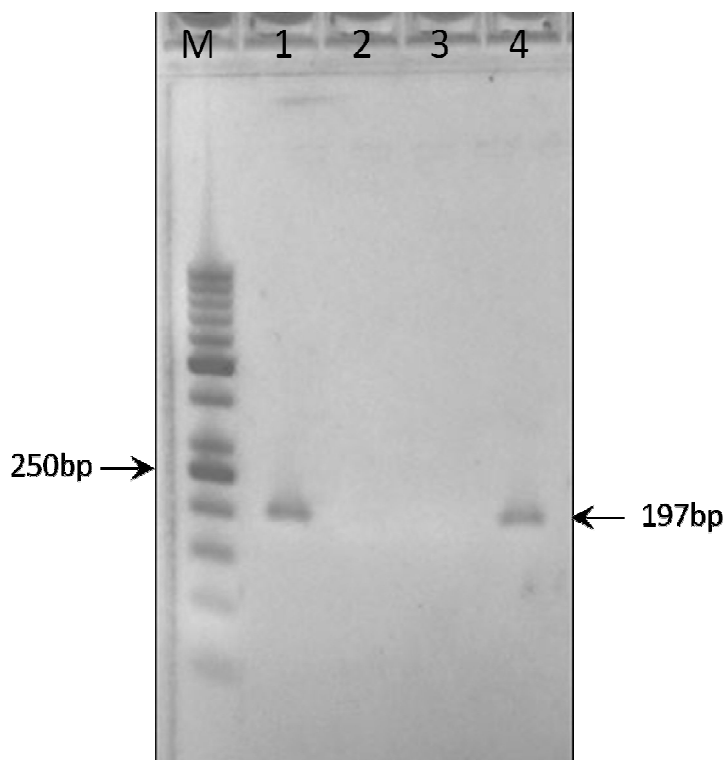


График 3. Опсег тестираних концентрација DNA пацијената.

Резултати одређивања оптималне концентрације DNA узорка за PCR амплификацију

Резултати показују да је под истим PCR условима, адекватна амплификација била код узорака са већом концентрацијом DNA, док узорци са мањим концентрацијама нису дали резултате PCR амплификације. Односно, на **слици 7** показани су резултати успешне амплификације са DNA узорцима адекватних концентрација, нпр., 5,7 $\mu\text{g/ml}$ и 11,3 $\mu\text{g/ml}$, односно 0,228 $\mu\text{g/ml}$ и 0,452 $\mu\text{g/ml}$ у коначној запремини. Док концентрације нпр., 1,0 $\mu\text{g/ml}$ и 1,4 $\mu\text{g/ml}$, односно 0,04 $\mu\text{g/ml}$ и 0,056 $\mu\text{g/ml}$ у коначној запремини нису довели до жељених амплификата величине 197bp.



Слика 7. Ефекти концентрације DNA узорка на PCR амплификацију.

Колона М: 50 bp DNA ladder; колона 1: 11,3 $\mu\text{g/ml}$; колона 2: 1,0 $\mu\text{g/ml}$;
колона 3: 1,4 $\mu\text{g/ml}$; колона 4: 5,7 $\mu\text{g/ml}$

Резултати одређивања специфичности и сензитивности PCR методе

Резултати одређивања специфичности и сензитивности PCR методе су добијени програмским пакетом SPSS-17 software (SPSS, Inc.). Показано је на основу вредности области испод ROC криве 0,998, да је PCR метода статистички значајно високо специфична и сензитивна ($p < 0,01$, са интервалом поверења 95% (0,993-1)). Односно, вредност концентрације DNA је пресудна за успешност PCR методе и препорука је да се користе концентрације веће од 1,255ug/ml да би метода била успешна (**график 4**).

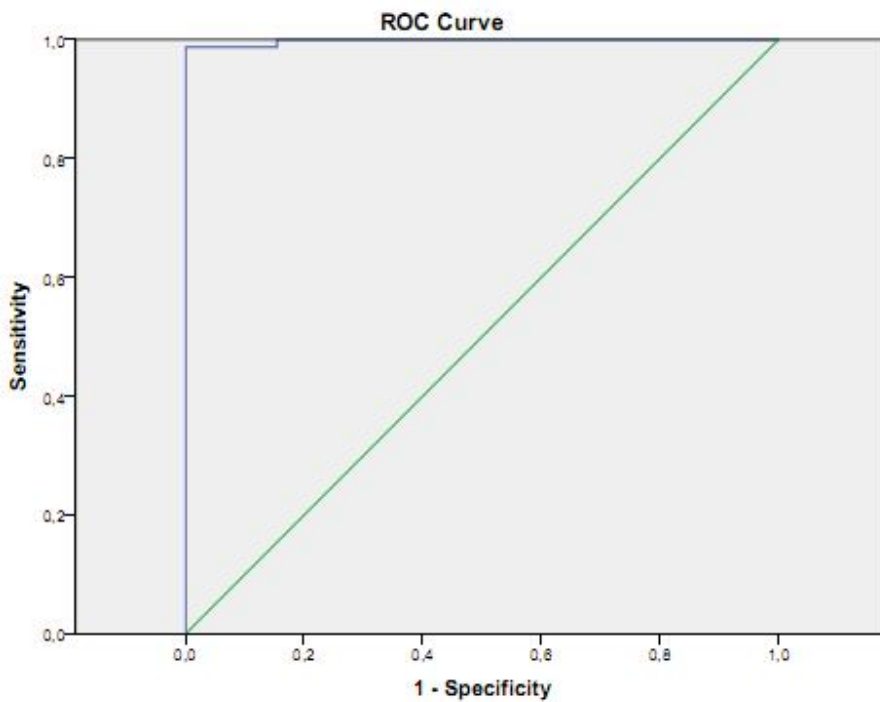
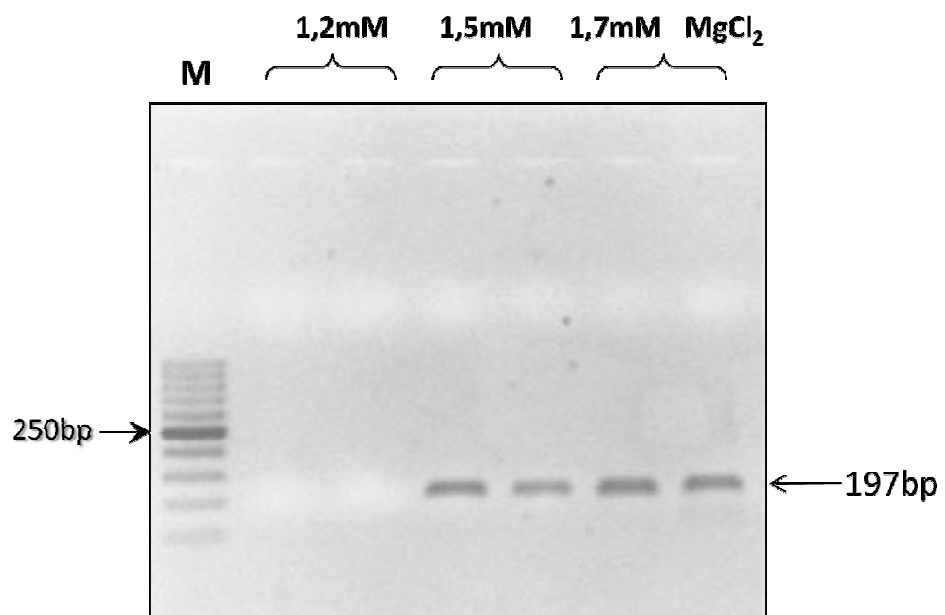


График 4. Одређивање сензитивности и специфичности PCR методе.

Резултати одређивања оптималне концентрације $MgCl_2$ за PCR амплификацију

Резултати показују да је оптимална концентрација $MgCl_2$ била 1,5 mM за успешну PCR амплификацију (слика 8). Тестиране су наине, концентрације у опсегу 0,5 до 2,5mM у дупликату. Показало се такође да је и концентрација $MgCl_2$ од 2mM довела до успешне амплификације, међутим, ометала је рестрикционе реакције које су уследиле.

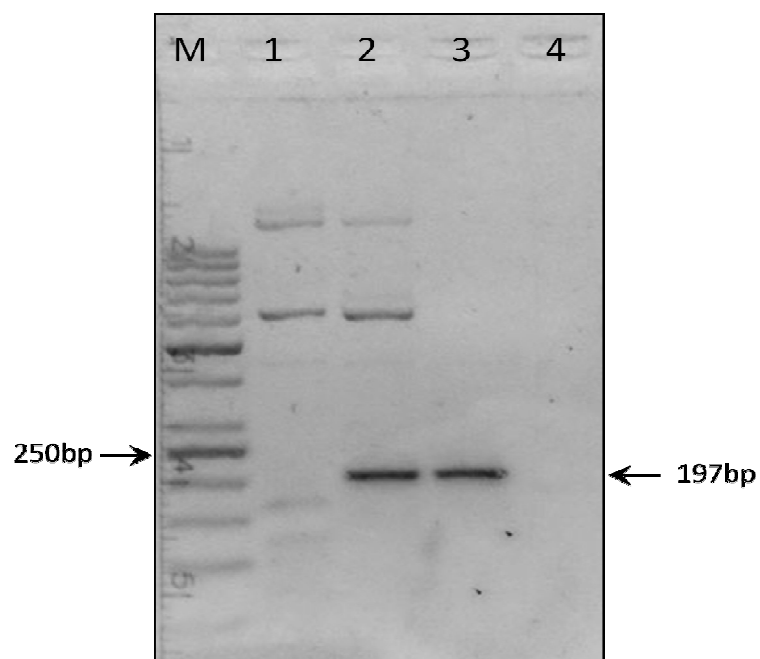


Слика 8. Ефекти $MgCl_2$ на PCR амплификацију.

Колона М: 100bp DNA маркер

Резултати одређивања оптималне концентрације DMSO за PCR амплификацију

Да би се одредила оптимална концентрација DMSO постављене су одвојене PCR са додатком 1%, 3% и 5% DMSO. Коначна концентрација од 5% DMSO је била једина која је омогућила жељени принос ампликона без неспецифичне амплификације (слика 9).

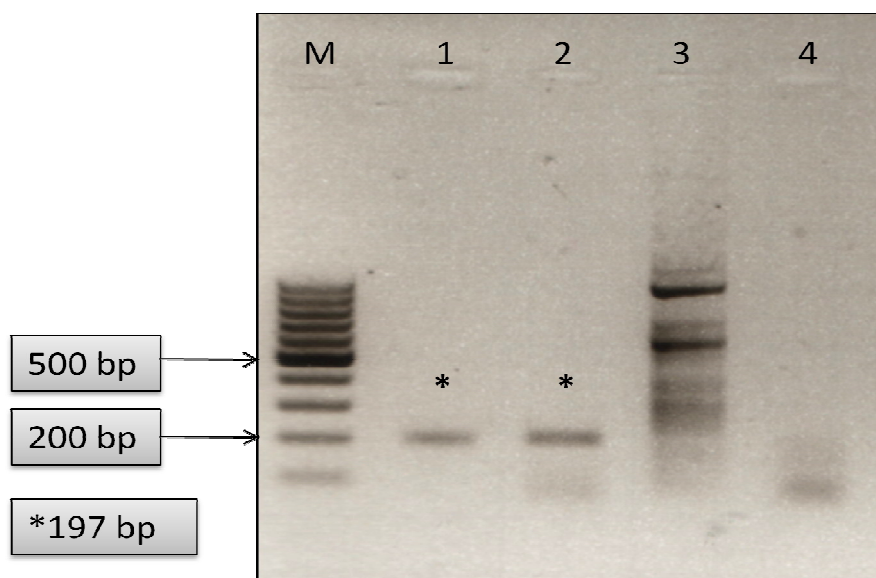


Слика 9. Ефекти DMSO на PCR амплификацију.

Колона М: 50bp DNA маркер; колона 1: 1% DMSO; колона 2: 3% DMSO; колона 3: 5% DMSO; колона 4: слепа проба, контрола без узорка DNA

Резултати PCR амплификације са додатим DMSO и амплификације без додатих адитива

Резултати показују да је DMSO неопходан адитив за успешну амплификацију. Прецизније, резултат PCR-а показује да додатком 5 % DMSO, долази до жељене амплификације фрагмената дужине 197bp са контролним DNA узорком и са DNA узорком изолованим из ткива фиксираним формалином и прожетог парафином, у односу на изостанак амплификације у случају недодавања 5 % DMSO са оба типа DNA узорака (слика 10).

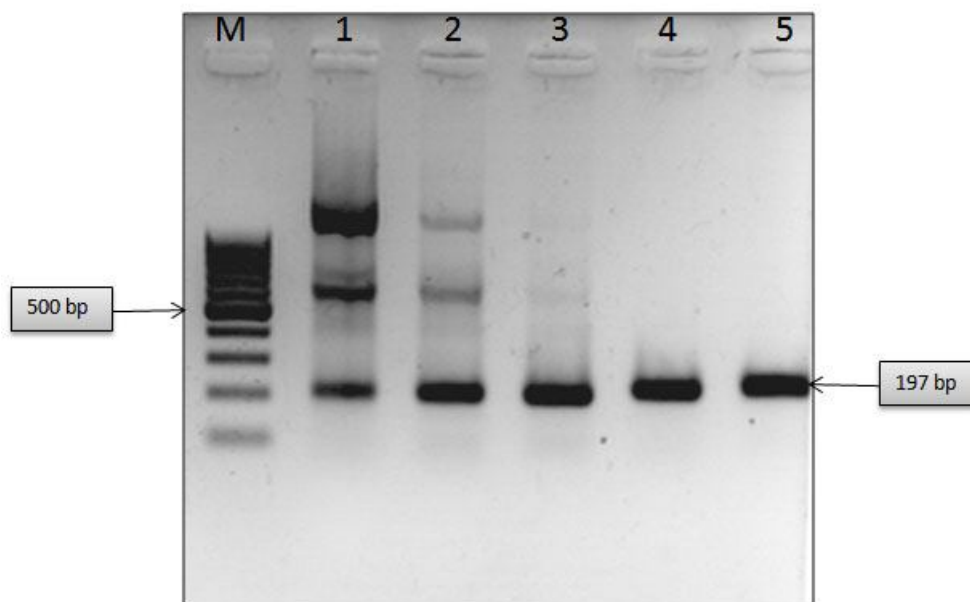


Слика 10. Поређење PCR амплификације са додатим 5 % DMSO и PCR амплификацијом без додатих адитива.

Колона М: маркер; колона 1: 5% DMSO у PCR амплификацији 197bp фрагмената са контролним DNA узорком; колона 2: 5% DMSO у PCR амплификацији 197bp фрагмената са DNA узорком из туморског ткива фиксираним формалином и прожетог парафином (FFPE); колона 3: PCR амплификација без додатих адитива са контролним DNA узорцима; колона 4: PCR амплификација без додатих адитива са DNA узорком из FFPE туморског ткива.

Резултати одређивања оптималне концентрације глицерола на PCR амплификацију са контролним DNA узорком

Резултати тестирања различитих концентрација глицерола на амплификацију секвенце контролне DNA на 2% агарозном гелу, показују да је са додатим 5% и 10% глицеролом у PCR-у примећено присуство неспецифичних амплификата поред жељених, док су концентрације глицерола од 15-25%, дале жељене амликоне дужине 197bp, без неспецифичних (**слика 11**). За све тестиране реакције које следе биране су DNA са задовољавајућом концентрацијом, односно оном концентрацијом која доводи до успешне PCR амплификације.

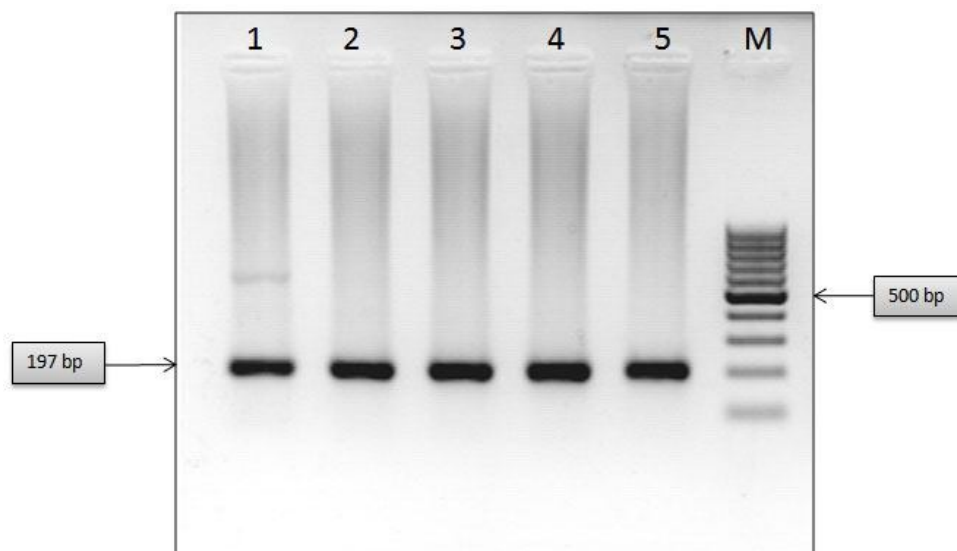


Слика 11. Ефекти различитих концентрација глицерола на амплификацију секвенце контролне DNA дужине 197bp на 2% агарозном гелу.

Колона М: 100bp DNA маркер; колона 1: 5% глицерол; колона 2: 10% глицерол; колона 3: 15% глицерол; колона 4: 20% глицерол; колона 5: 25% глицерол

Резултати одређивања оптималне концентрације глицерола на PCR амплификацију са DNA узорком изолованом из замрзнутог ткива

Резултати дејства различитих концентрација глицерола на PCR амплификацију са DNA узорком из ткива које је стављено након операције у NE пуфер, а након тога замрзнуто на -20°C (енгл. fresh frozen, FF) показују да су концентрације од 5-25% глицерола дале жељене ампликоне дужине 197bp (слика 12). Међутим, најмања тестирана концентрација је показала неспецифичне ампликоне изнад 500 bp.

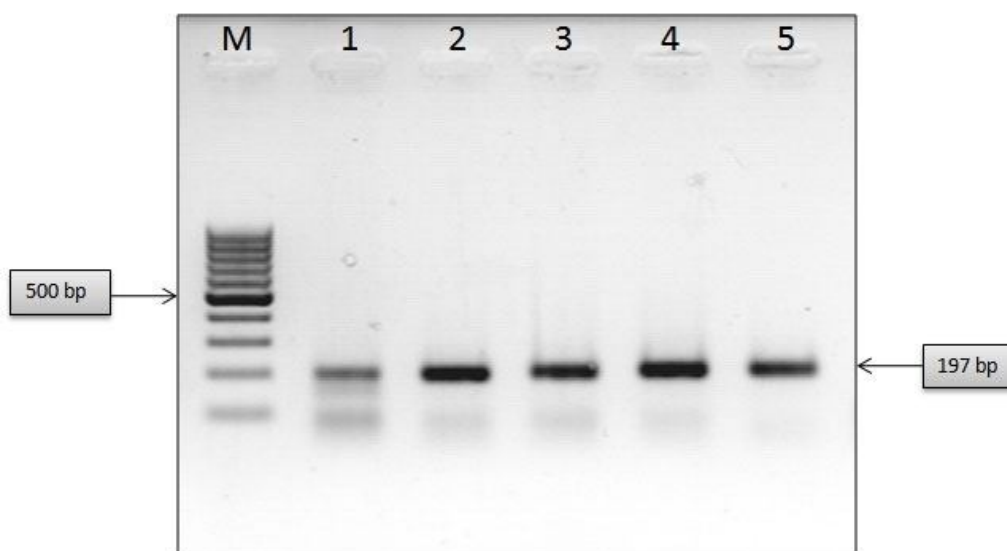


Слика 12. Ефекти различитих концентрација глицерола на амплификацију секвенце дужине 197bp на 2% агарозном гелу са DNA узорком из замрзнутог ткива (енгл.fresh frozen, FF).

Колона М: 100bp DNA маркер; колона 1: 5% глицерол; колона 2: 10% глицерол; колона 3: 15% глицерол; колона 4: 20% глицерол; колона 5: 25% глицерол

Резултати одређивања оптималне концентрација глицерола на PCR амплификацију са DNA узорком изолованим из парафинизованог ткива

Резултати показују да је додаток глицерола у било којој концентрацији између 5% и 25% дао жељене PCR продукте са сва три типа DNA (слика 13). Најмања концентрација глицерола у PCR-у са DNA узорком изолованим из ткива фиксираног формалином и прожетог парафином, довела је до амплификације неколико неспецифичних мањих фрагмената и мрља. Међутим, то се смањивало повећањем концентрација глицерола. Због униформисања услова за рестрикционе реакције које су уследиле одабране су концентрације 15% и 20% глицерола за сва три типа DNA узорка.

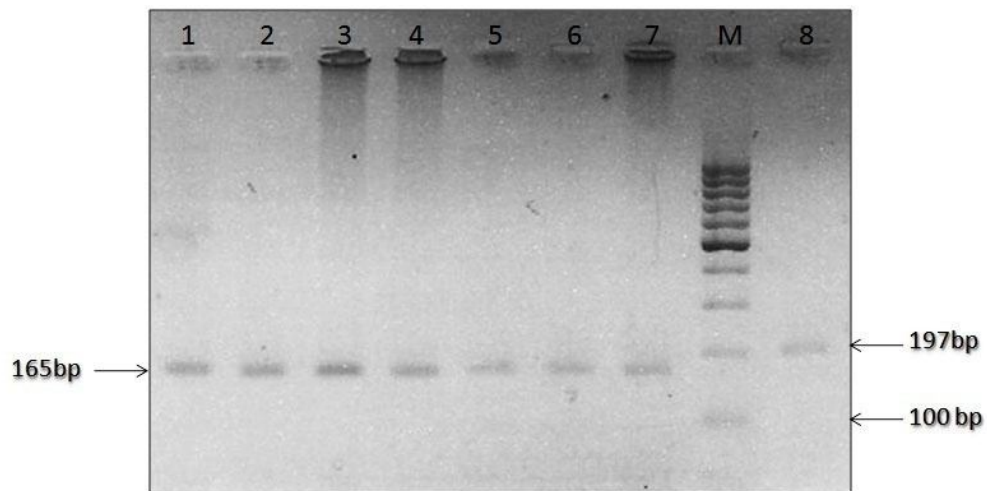


Слика 13. Ефекти различитих концентрација глицерола на амплификацију секвенце дужине 197bp на 2% агарозном гелу са DNA узорком из ткива фиксираног формалином и прожетог парафином (енгл. formalin fixed and paraffin embedded, FFPE).

Колона М: 100bp DNA маркер; колона 1: 5% глицерол; колона 2: 10% глицерол; колона 3: 15% глицерол; колона 4: 20% глицерол; колона 5: 25% глицерол

Резултати дејства различитих концентрација глицерола на рестрикционе реакције PCR продуката са DNA изолованом на три различита начина за полиморфизам -191 C/A

Резултати показују да рестрикционе анализе PCR продуката са Cfr42I нису биле ометене додатком 15-20% глицерола (слика 14).

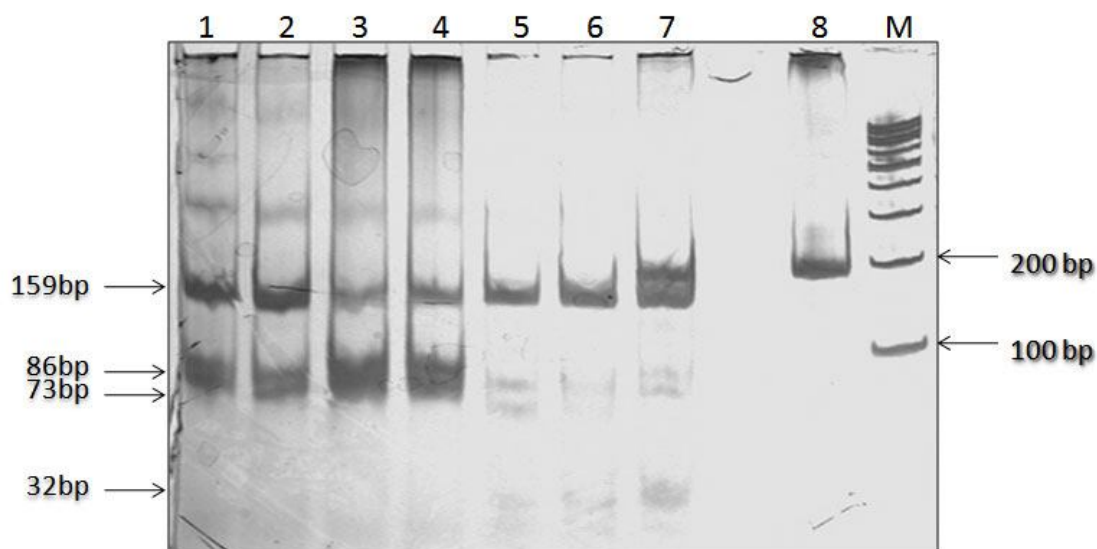


Слика 14. Ефекти различитих концентрација глицерола на рестрикцију PCR продуката помоћу ензима Cfr42I за полиморфизам -191C/A на 3% агарозном гелу на DNA узорцима изолованим на три различита начина.

Колона 1: 15% глицерол са контролном DNA; колона 2: 20% глицерол са контролном DNA; колона 3: 15% глицерол са DNA изолованом из замрзнутог ткива (FF); колона 4: 20% глицерол са FF DNA; колона 5: 15% глицерол са DNA изолованом из ткива фиксираног формалином и прожетог парафином (FFPE); колона 6: 20% глицерол са FFPE DNA; колона 7: 25% глицерол са FFPE DNA; колона M: 100bp DNA маркер; колона 8: PCR продукт који није подвргнут рестрикционој дигестији;

Резултати дејства различитих концентрација глицерола на рестрикционе реакције PCR продуката са DNA изолованом на три различита начина за полиморфизам -216 G/T

Резултати показују да додаток глицерола у концентрацијама од 15-20% није утицао на рестрикциону реакцију PCR продуката помоћу ензима BseRI за полиморфизам -216 G/T изведеном на 8% поклиякриламидном гелу, без обзира на начин изолације DNA. Рестрикционе анализе са BseRI су показале да је 25% глицерол, мада оптималан за PCR, интераговао са ензиматском реакцијом са ензимом BseRI (слика 15).

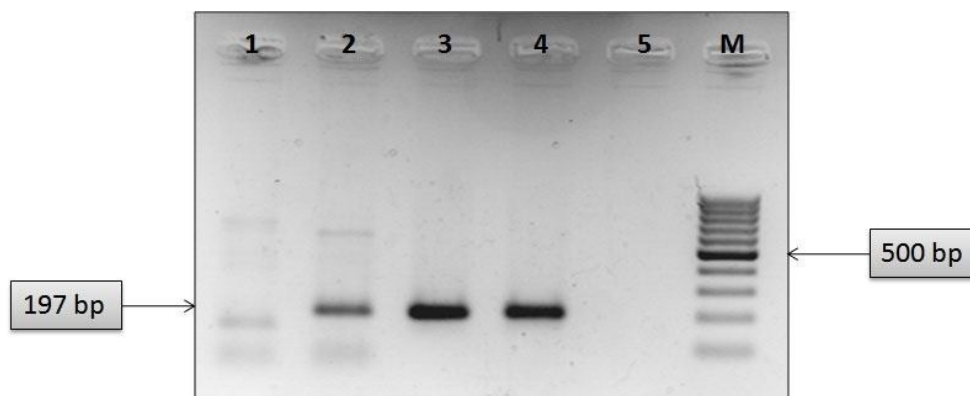


Слика 15. Ефекти различитих концентрација глицерола на рестрикцију PCR продуката помоћу ензима BseRI на 8% поклиякриламидном гелу за полиморфизам -216 G/T са DNA изолованом на три различита начина.

Колона 1: 15% глицерол са контролном DNA; колона 2: 20% глицерол са контролном DNA; колона 3: 15% глицерол са DNA изолованом из замрзнутог ткива (FF); колона 4: 20% глицерол са FF DNA; колона 5: 15% глицерол са DNA изолованом из ткива фиксираног формалином и прожетог парафином (FFPE) DNA; колона 6: 20% глицерол са FFPE DNA; колона 7: 25% глицерол са контролном DNA; колона 8: PCR продукт који није подвргнут рестрикционој дигестији; колона M: 100bp DNA маркер

Резултати одређивања оптималне концентрације бетаина на PCR амплификацију са контролним DNA узорком

Резултати показују тестирање бетаина у опсегу од 0,5М-2,5М, са повећањима од 0,5М, на амплификацију секвенце контролне DNA на 2% агарозном гелу (слика 16). При томе се виде жељени ампликони од 197bp у оним реакцијама које садрже 1-2% бетаина, али је концентрација бетаина од 1М поред жељеног амликона дала и неспецифичне продукте. Концентрације мање од 1М бетаина, као и повећање концентрације више од 2М бетаина није довело до успешности PCR-а.

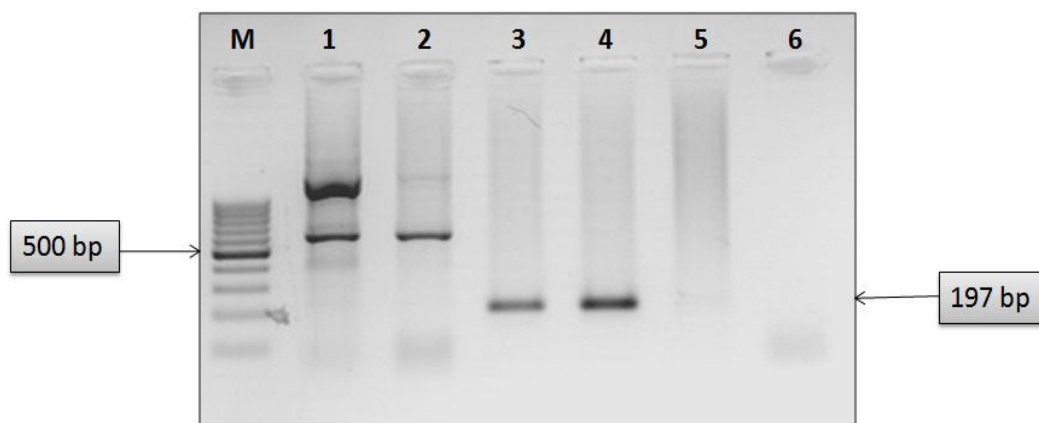


Слика 16. Ефекти различитих концентрација бетаина на амплификацију секвенце контролне DNA дужине 197bp на 2% агарозном гелу.

Колона 1: 0,5 М бетаин; колона 2: 1 М бетаин; колона 3: 1,5 бетаин; колона 4: 2М бетаин;
колона 5: 2,5 М бетаин; колона М: 100bp DNA маркер

Резултати одређивања оптималне концентрације бетаина на PCR амплификацију са DNA узорком изолованим из замрзнутог ткива

Резултати показују тестирање бетаина у опсегу од 0,5М-2,5М на успешност PCR амплификације са DNA узорком из „свеже замрзнутог“ ткива (енгл. fresh frozen, FF) (слика 17). При томе резултати јасно показују да су најуспешније реакције биле прилоком додавања 1,5М и 2М бетаина, док су остале, мање, довеле до појаве неспецифичних ампликона, а веће концентрације од 2М бетаина нису довеле до жељене амплификације.

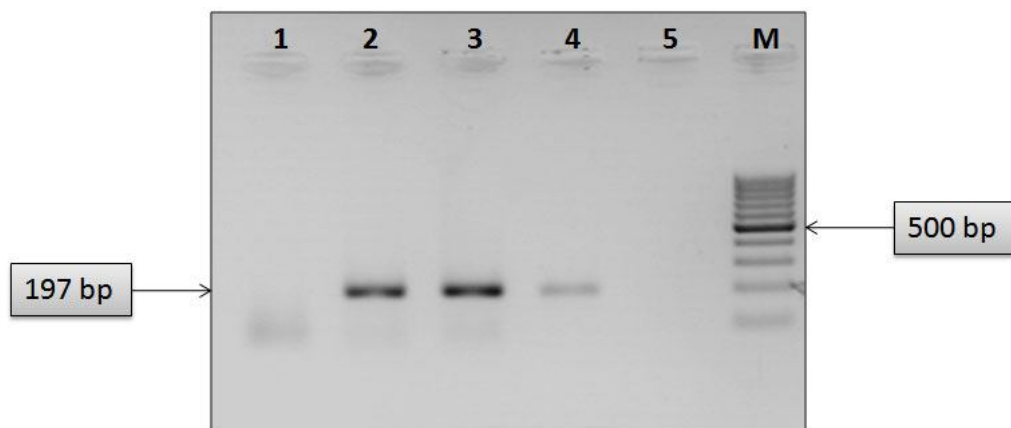


Слика 17. Ефекти различитих концентрација бетаина на амплификацију секвенце DNA дужине 197bp на 2% агарозном гелу са DNA узорком из замрзнутог ткива (енгл.fresh frozen, FF).

Колона М: 100bp DNA маркер Колона 1: 0,5 М бетаин; колона 2: 1 М бетаин; колона 3: 1,5 бетаин; колона 4: 2 М бетаин; колона 5: 2,5 М бетаин; колона 6: контрола без DNA узорка

Резултати одређивања оптималне концентрација бетаина на PCR амплификацију са DNA узорком изолованим из парафинизованог ткива

Резултати показују тестирање бетаина у одвојеним реакцијама при следећим концентрацијама: 0,5М, 1М, 1,5М, 2М и 2,5М на DNA узорку изолованом из парафинизованог ткива (**слика 18**). Додатком бетаина у опсегу од 1М-2М довело је до видљивих ампликона. Мање концентрације бетаина од 1М давале су неспецифичне продукте. Повећање концентрације више од 2М није дало амплификацију, чак је 2М бетаин довео до слабијег ампликона. Тако да је најуспешнија PCR била са 1,5М бетаином.

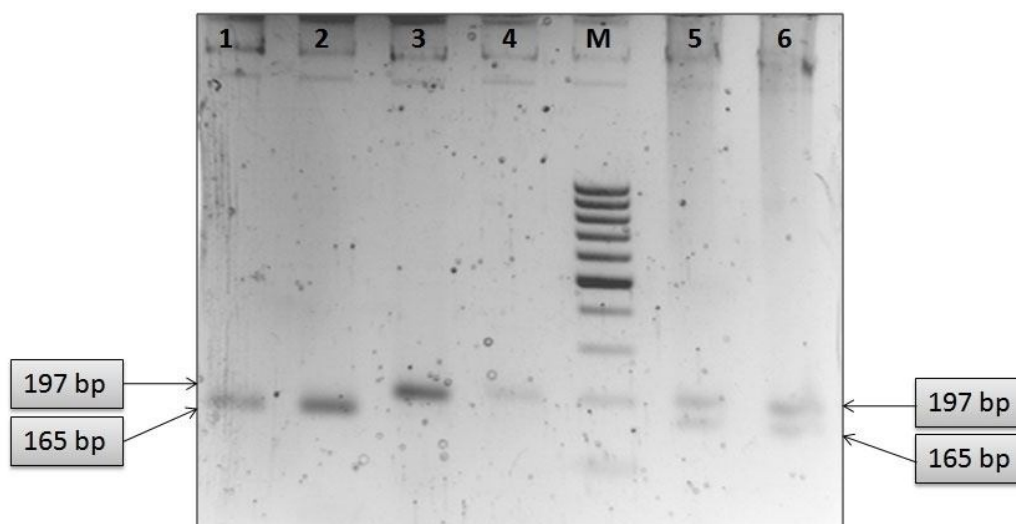


Слика 18. Ефекти различитих концентрација бетаина на амплификацију секвенце DNA дужине 197bp са DNA узорком изолованом из парафинизованог ткива (енгл. formalin fixed and paraffin embedded, FFPE) на 2% агарозном гелу.

Колона 1: 0,5М бетаин; колона 2: 1М бетаин; колона 3: 1,5 бетаин; колона 4: 2М бетаин; колона 5: 2,5М бетаин; колона М: 100bp DNA маркер

Резултати дејства различитих концентрација бетаина на рестрикционе реакције PCR продуката са DNA изолованом на три различита начина за полиморфизам -191 C/A

Резултати показују да је ензим Cfr42I је коришћен за ензимску рестрикцију PCR продуката за полиморфизам -191C/A на 3% агарозном гелу са додатим 1,5М и 2М бетаином у одвојеним реакцијама, за које се показало да су довеле до успешне амплификације код сва три типа DNA, без нежељених фрагмената (слика 19). Жељени рестрикциони фрагменти од 197bp који су одговарали алелу А и фрагменти 165 bp који су одговарали С алелу -191C/A полиморфизма, су успешно детектовани на гел електрофорези. Тако да у овом случају узорци имају следеће генотипове, (1, 2) контролни DNA узорак је рецесивни хомозигот (AA), (3,4) је био доминантни хомозигот (CC), а (5,6) узорак је био хетерозигот (CA).

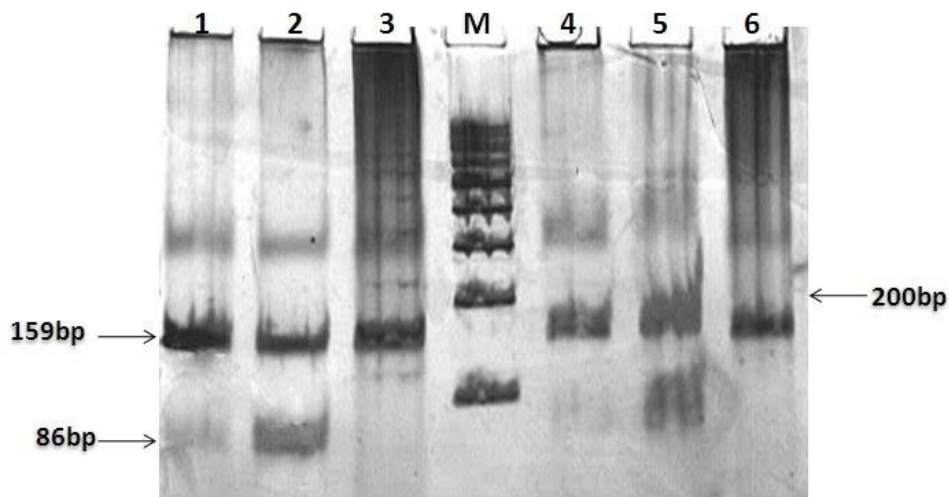


Слика 19. Ефекти различитих концентрација бетаина на ензимску рестрикцију PCR продуката ензимом Cfr42I за полиморфизам -191C/A на 3% агарозном гелу на DNA узорцима изолованим на три различита начина.

Колона 1: 1,5% бетаин са контролном DNA узорком; колона 2 : 2% бетаин са контролном DNA узорком; колона 3: 1,5% бетаин-FFPE DNA узорак; колона 4: 2% бетаин-FFPE DNA узорак; колона М: 100bp DNA маркер; колона 5: 1,5% бетаин-FF DNA узорак; колона 6: 2% бетаин- FF DNA узорак

Резултати дејства различитих концентрација бетаина на рестрикционе реакције PCR продуката са DNA изолованом на три различита начина за полиморфизам -216 G/T

Резултати показују да додаток 1,5М и 2М бетаина није утицао на рестрикциону реакцију PCR продуката за полиморфизам -216 G/T помоћу ензима BseRI, односно бетаин није интераговао у рестрикционој реакцији са овим ензимом без обзира на начин изолације DNA. Провера рестрикционе реакције је изведена на 8% поклиякриламидном гелу (слика 20).



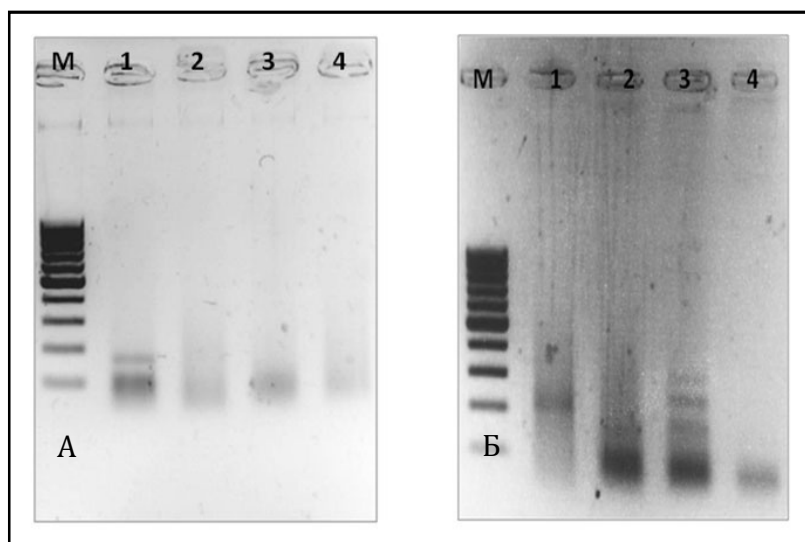
Слика 20. Ефекти различитих концентрација бетаина на рестрикцију PCR продуката помоћу ензима BseRI на 8% поклиякриламидном гелу за полиморфизам -216 G/T са DNA изолованом на три различита начина.

Колона 1: 1,5М бетаин са DNA изолованом из ткива фиксираног формалином и прожетог парафином (FFPE) DNA; колона 2: 1,5М бетаин са контролном DNA; колона 3: 1,5М бетаин са DNA изолованом из замрзнутог ткива (FF); колона М: 100bp DNA маркер; колона 4: 2М бетаин са FFPE DNA; колона 5: 2М бетаин са контролном DNA; колона 6: 2М бетаин са FF DNA.

Резултати одређивања оптималних концентрација тестираних адитива на PCR амплификацију

TWEEN и *TRITON X-100*

Резултати амплификације са додатим нејонским детерџентима Tween 20 и Triton X-100 показали су неуспешну амплификацију доводећи до појаве мрља, или неспецифичних фрагмената (**слика 21**). Тестирани су у одвојеним реакцијама у концентрацијама од 0,1%, 0,5%, 1% и 2%, са вишеструким покушајима. На сликама су приказани резултати коришћењем DNA узорка изолованим из парафинизованог ткива, међутим, слични резултати су добијени и са осталим типовима DNA.



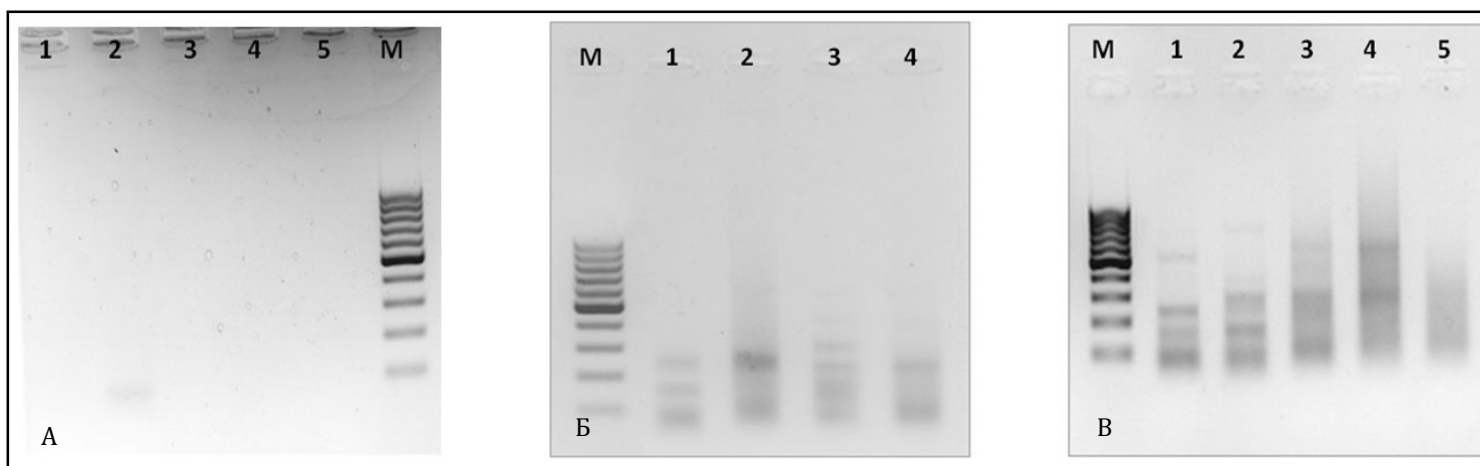
Слика 21. Одређивање оптималних концентрација тестираних адитива TWEEN 20 и TRITON X-100 на PCR амплификацију на 2% агарозном гелу.

А) Колона М: 100bp DNA маркер; колона 1: 0,1% TWEEN 20; колона 2: 0,5% TWEEN 20; колона 3: 1% TWEEN 20; колона 4: 2% TWEEN 20

Б) Колона М: 100bp DNA маркер; колона 1: 0,1% TRITON X-100; колона 2: 0,5% TRITON X-100; колона 3: 1% TRITON X-100; колона 4: 2% TRITON X-100

Формаид, PEG и BSA

Резултати показују да је формаид тестиран при концентрација: 1.25%, 2,5%, 5%, 7,5% и 10%, без видљивих трака на 2% електрофорези (слика 22). Након додавања PEG у концентрацијама: 2,5%, 5%, 10%, 15% и 20% и BSA у концентрацијама: 0,1 ug/ul, 0,5 ug/ul, 0,8 ug/ul и 1 ug/ul било је неспецифичних амплификата.



Слика 22. Одређивање оптималних концентрација тестираних адитива, формаида, PEG BSA на PCR амплификацију на 2% агарозном гелу.

А) Колона 1: 1,25% формаид; колона 2: 2,5% формаида; колона 3: 5% формаид; колона 4: 7,5% формаид; колона 5: 10% формаид; колона М: 100bp DNA маркер Б) Колона М: 100bp DNA маркер; колона 1: 2,5% PEG; колона 2: 5% PEG; колона 3: 10% PEG; колона 4: 15% PEG; колона 5: 20% PEG; В) Колона М: 100bp DNA маркер; колона 1: 0,1 ug/ul BSA; колона 2: 0,5 ug/ul BSA; колона 3: 0,8 ug/ul BSA; колона 4: 1 ug/ul BSA

Резултати одређивања варијанти гена EGFR код испитаника

Демографски подаци

Демографски подаци за 47 пацијента и 43 контроле у популацији испитаника са територије Републике Србије, су приказани на **табели 4**.

Табела 4. Демографски подаци за контроле и оболеле од канцера плућа.

Демографски подаци	Контроле No (%)	Оболели No (%)	Р вредност*
EGFR	43	47	
Пол			0,100
Мушки	21 (48,8)	31 (66,0)	
Женски	22 (51,2)	16 (34,0)	
Године			<0,01
<41	25 (58,1)	2 (4,3)	
41-61	17 (39,5)	24 (51,1)	
>61	1 (2,3)	21 (44,7)	
Пушачки статус			<0,01
Пушачи	15 (41,7)	32 (68,1)	
Непушачи	19 (52,8)	1 (2,1)	
Бивши пушачи	2 (5,6)	14 (29,8)	

*Двострани Хи квадрат тест.

Резултати показују да није постојао доказ повезаности између пола и NSCLC-а ($p > 0,05$).

Постоји веома јак доказ повезаности између година и оболелих од канцера плућа (Pearson Chi square= 38,869, $df=2$, $p < 0,01$).

Постоји јака повезаност између пушења и оболелих од канцера плућа (Pearson Chi square=28,594, $df=1$, $p < 0,01$). Ови резултати су добијени груписањем у две категорије (на пушаче и непушаче, спајајући бивше пушаче са групом пушача).

Слични резултати су добијени када су групе раздвојене (Pearson Chi square=30,426, df=2, $p<0,01$).

Мада је било више пушача међу особама мушког пола (63,3%) него међу женама (47,1%), у овој студији није уочена веза између пола и пушачког статуса у укупној популацији испитаника са територије Републике Србије (Пирсонов хи квадрат тест=2,612, df=2, $p=0,271$). Такође није било везе у укупној популацији (оболелих и контрола) и пола када су анализе спроведене само за пушаче ($p>0,05$).

Резултати дистрибуције година за контролну групу и групу оболелих од немикроћелијског канцера плућа са територије Републике Србије

Резултати показују да је средња вредност година за контролну групу била 41 (опсег од 25-66), што одговара средњој вредности у укупној популацији Срба (**Demographic Yearbook in the Republic of Serbia, 2014**) и статистички се значајно разликовала ($p=0,023$) од 61 (опсег 36-78), што је била средња вредност за пацијенте тумора плућа (**график 5**). Тиме се може закључити да су старије особе, чешћи пацијенти тумора плућа.

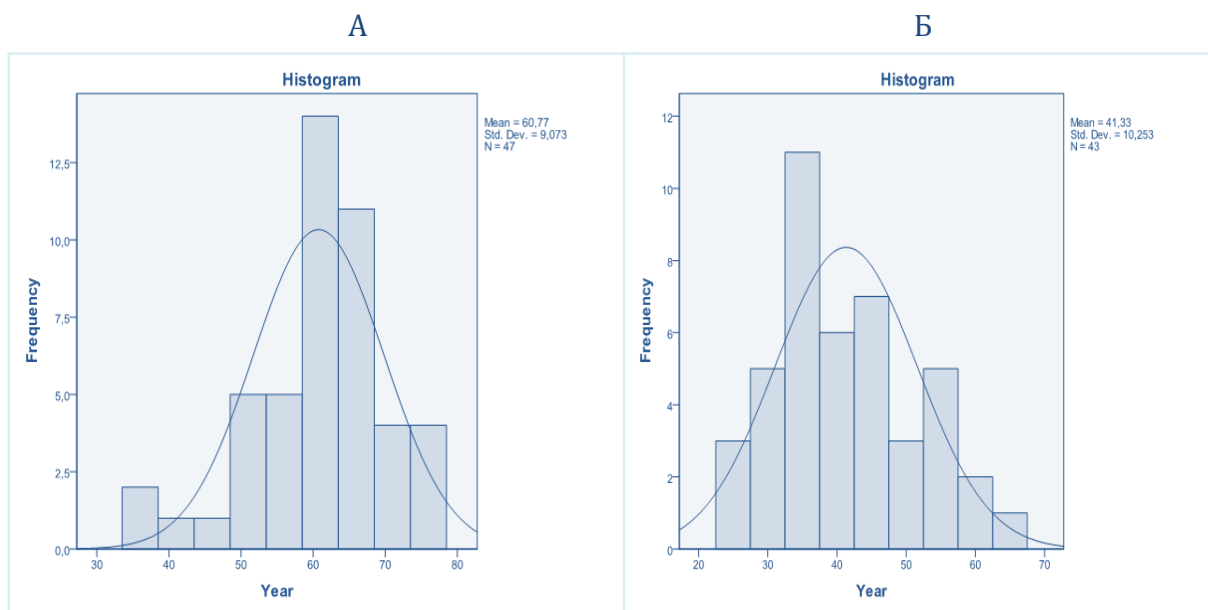


График 5. Дистрибуција година за оболеле (А) и контроле (Б).

Фреквенције генотипа и алела за оболеле и контроле

Није било одступања од Харди-Вајнбергове равнотеже (енгл. Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) ($p > 0,05$), за два полиморфизма 216 G/T и 181946 G/A (табела 5), што указује да су дистрибуције алела биле једнаке у контролним узорцима и узорцима оболелих. За -191 C/A полиморфизам, примећено је одступање од HWE, што је вероватно повезано са малим бројем испитиваних узорака.

Табела 5. Фреквенције генотипа и алела за оболеле и контроле.

Полиморфизам	генотип/алел	контроле n (%)	оболели n (%)	OR*	95% CI*	$P^{#*}$	HWE
-191C/A	CC	32 (82,1)	34 (72,3)	1,00	0,62-4,94	0,399	<0,01
	CA	3 (7,7)	8 (17,0)	1,75			
	AA	4 (10,3)	5 (10,6)				
	C	67 (85,9)	76 (80,9)				
	A	11 (14,1)	18 (19,1)				
-216G/T	GG	19 (47,5)	26 (60,5)	1,69	0,71 - 4,04	0,236	0,204
	GT	17 (42,5)	12 (27,9)	1,00			
	TT	4 (10,0)	5 (11,6)				
	G	55 (68,8)	64 (74,4)				
	T	25 (31,3)	22 (25,6)				
181946G/A	GG	25 (92,6)	44 (95,7)	1,76	0,233 - 13,27	0,579	0,809
	GA	2 (7,4)	2 (4,3)	1,00			
	AA	0 (0)	0 (0)				
	G	52 (96,3)	90 (97,8)				
	A	2 (3,7)	2 (2,2)				

Хи квадрат тест; *вредности рачунате за доминантни генетички модел

У контролној групи за -191С/А било је 82,1% доминантних хомозигота, а код оболелих 72,3%, што је више од хетерозигота (код контролне групе 7,7% и код оболелих 17,0%) и мутантних хомозигота (код контролне групе 10,3% и код оболелих 10,6%).

У случају -216G/Т код контролне групе било је 47,5% GG, а код оболелих 60,5% GG, што је више од хетерозигота (42,5% код контролне групе и 27,9% код оболелих) и мутантних хомозигота (10,0% код контрола и 11,6% код оболелих).

За полиморфизам 181946С>Т, односно G/А код контрола било је 92,6% GG, а код оболелих 95,7% GG, што је било више од хетерозигота код контрола 7,4% и код оболелих 4,3%. Мутантних хомозигота за овај полиморфизам није било ни у контролној групи, а ни код оболелих.

Резултати показују да није било статистички значајне разлике у фреквенцији генотипова за сва три испитивана полиморфизама између оболелих и контрола у популацији Срба ($p > 0,05$) (табела 5), односно за сваки полиморфизам важи да су били једнако распоређени генотипови у групи оболелих и у групи здравих иситаника.

Резултати показују да су за све три типа полиморфизма најзаступљенији били доминантни хомозиготи.

Дистрибуција генотипа за полиморфизам -191С>А

Дистрибуција генотипа за полиморфизам -191С>А у складу са демографским карактеристикама приказана је на **табели 6** као и укупни процентуални удео полиморфизама из ове студије у популацији испитаника са територије Републике Србије за сваку демографску карактеристику.

Табела 6. Дистрибуција генотипа за -191С>А складу са демографским карактеристикама.

Фактори	-191С>А						Укупно		P#
	СС		СА		АА		No	%	
	No	%	No	%	No	%	No	%	
Статус	0,424								
здрави	32	37,2	3	3,5	4	4,7	39	45,3	
болесни	34	39,5	8	9,3	5	5,8	47	54,7	
Укупно	66	76,7	11	12,8	9	10,5	86	100,0	
Године	0,358								
<41	21	24,4	2	2,3	2	2,3	25	29,1%	
41-61	29	33,7	4	4,7	6	7,0	39	45,3	
>61	16	18,6	5	5,8	1	1,2	22	25,6	
Укупно	66	76,7	11	12,8	9	10,5	86	100,0	
Пол	0,244								
мушки	41	47,7	4	4,7	6	7,0	51	59,3	
женски	25	29,1	7	8,1	3	3,5	35	40,7	
Укупно	66	76,7	11	12,8	9	10,5	86	100,0	
Пушачки статус	0,464								
пушач	35	43,8	5	6,3	6	7,5	46	57,5	
непушач	16	20,0	2	2,5	0	0,0	18	22,5	
бивши пушач	12	15,0	3	3,8	1	1,3	16	20,0	
Укупно	63	78,8	10	12,5	7	8,8	80	100,0	

#Chi квадрат за табеле контингенције

Резултати показују да није утврђена зависност између полиморфизма -191C>A и статуса (болесни/здрави) ($p=0,424$), као ни осталих испитиваних демографских карактеристика: година ($p=0,358$), пола ($p=0,244$) и пушачког статуса ($p=0,464$).

Резултати показују да је за овај испитивани полиморфизам било више доминантних хомозигота него хетерозигота и мутантних хомозигота, рачунато у оквиру појединачних демографских група. Носиоци CC генотипа за -191C>A су код пушача имали 43,8%, односно бивших пушача 15% у односу на непушаче којих је било 20%. Међу носиоцима СА генотипа било је 6,3% пушача, 3,8% бивших пушача и 2,5% непушача. Док су носиоци генотипа АА били присутни само код пушача са 7,5%, односно код бивших пушача са 1,3%, тј. код непушача их није било (**табела 6**).

Дистрибуција генотипа за полиморфизам -216G>Т

Дистрибуција генотипа за полиморфизам -216G>Т у складу са демографским карактеристикама приказана је у **табели 7** као и укупни процентуални удео полиморфизама из ове студије у популацији испитаника са територије Републике Србије за сваку демографску карактеристику.

Табела 7. Дистрибуција генотипа за -216G>Т складу са демографским карактеристикама.

Фактори	-216G>Т						Укупно		P#
	GG		GT		TT		No	%	
	No	%	No	%	No	%			
Статус	0,376								
здрави	19	22,9	17	20,5	4	4,8	40	48,2	
болесни	26	31,3	12	14,5	5	6,0	43	51,8	
Укупно	45	54,2	29	34,9	9	10,8	83	100,0	
Године	0,384								
<41	13	15,7	10	12,0	2	2,4	25	30,1	
41-61	19	22,9	16	19,3	4	4,8	39	47,0	
>61	13	15,7	3	3,6	3	3,6	19	22,9	
Укупно	45	54,2	29	34,9	9	10,8	83	100,0	
Пол	0,830								
мушки	26	31,3	16	19,3	6	7,2	48	57,8	
женски	19	22,9	13	15,7	3	3,6	35	42,2	
Укупно	45	54,2	29	34,9	9	10,8	83	100,0	
Пушачки статус	0,857								
пушач	20	26,3	16	21,1	6	7,9	42	55,3	
непушач	9	11,8	7	9,2	2	2,6	18	23,7	
бивши пушач	10	13,2	5	6,6	1	1,3	16	21,1	
Укупно	39	51,3	28	36,8	9	11,8	76	100,0	

#Chi квадрат за табеле контингенције

Резултати показују да није утврђена зависност између полиморфизма -216G>Т и статуса (болесни/здрави) ($p=0,376$) као ни осталих испитиваних демографских карактеристика: година ($p=0,384$), пола ($p=0,830$) и пушачког статуса ($p=0,857$) (**табела 7**). Резултати такође показују да је за овај испитивани полиморфизам било више доминантних хомозигота него хетерозигота и мутантних хомозигота, рачунато у оквиру појединачних демографских група. За полиморфизам -216G/Т носиоци доминантног хомозигота били су заступљени код пушача са 26,3%, односно бивших пушача са 13,2%, док је непушача било 11,8%.

Хетерозигота је било у оквиру пушача и бивших пушача 21,1% и 6,6% у односу на непушаче са 9,2%. Мутантних хомозигота је било међу пушачима 7,9% и 1,3% међу бившим пушачима, односно 2,6% међу непушачима.

Дистрибуција генотипа за полиморфизам 181946C>T (D994D) тј. G>A

Дистрибуција генотипа за полиморфизам 181946 G>A у складу са демографским карактеристикама приказана је у **табели 8**, као и укупни процентуални удео полиморфизама из ове студије у популацији испитаника са територије Републике Србије за сваку демографску карактеристику.

Табела 8. Дистрибуција генотипа за 181946 G>A (D994D) складу са демографским карактеристикама.

Фактори	181946 G>A (D994D)						Укупно		P#
	GG		GA		AA		No	%	
	No	%	No	%	No	%	No	%	
Статус									0,579
здрави	25	34,2	2	2,7	0	0	27	37,0	
болесни	44	60,3	2	2,7	0	0	46	63,0	
Укупно	69	94,5	4	5,5	0	0	73	100,0	
Године									0,425
<41	12	16,4	1	1,4	0	0	13	17,8	
41-61	36	49,3	3	4,1	0	0	39	53,4	
>61	21	28,8	0	0	0	0	21	28,8	
Укупно	69	94,5	4	5,5	0	0	73	100,0	
Пол									0,666
мушки	42	57,5	2	2,7	0	0	44	60,3	
женски	27	37,0	2	2,7	0	0	29	39,7	
Укупно	69	94,5	4	5,5	0	0	73	100,0	
Пушачки статус									0,805
пушач	41	59,4	2	2,9	0	0	43	62,3	
непушач	9	13,0	1	1,4	0	0	10	14,5	
бивши пушач	15	21,7	1	1,4	0	0	16	23,2	
Укупно	65	94,2	4	5,8	0	0	69	100,0	

#Chi квадрат за табеле контингенције

Резултати показују да није утврђена зависност између полиморфизма 181946 G>A и статуса (болесни/здрави) ($p=0,579$) као ни осталих испитиваних демографских карактеристика: година ($p=0,425$), пола ($p=0,666$) и пушачког статуса ($p=0,805$).

Резултати показују да је за овај испитивани полиморфизам било више доминантних хомозигота него хетерозигота и мутантних хомозигота, рачунато у оквиру појединачних демографских група (**табела 8**). Полиморфизам 181946C>T, тј. G>A имао је следећу дистрибуцију генотипова у оквиру пушачког статуса: GG генотип је био заступљен код пушача са 59,4% и бивших пушача са 21,7%, односно код непушача 13,0%, а GA је био код пушача заступљен са 2,9% и бивших пушача са 1,4%, односно код непушача 1,4%. AA генотип није био заступљен у целој популацији.

Резултати просечних фреквенција генотипова испитаника са територије Републике Србије

Резултати показују да је за сва три испитивана полиморфизма из ове студије било више доминантних хомозигота него хетерозигота и мутантних хомозигота (и у контролној и у групи оболелих) тестирано за сваки полиморфизам појединачно (табела 9). Наиме, рецесивни хомозиготи су били најмање заступљени у целој популацији за сва три испитивана полиморфизма из ове студије.

Табела 9. Просечне фреквенције генотипова.

	-191C>A†			Σ	-216G>T *			Σ	181946C>T (D994D) тј. G>A¶			Σ
	CC&	CA&	AA		GG&	GT&	TT		GG&	GA&	AA	
	66	11	9	86	45	29	9	83	69	4	0	74
	27,16%	4,53%	3,7%		18,52%	11,93%	3,7%		28,4%	1,65%	0,0%	
Σ				35,39%				34,16%				30,45%
Укупно												243 (100,0%)

& најчешћи генотипови у различитим етничким групацијама према подацима са базе NCBI:

**http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=712829;*

† http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=712830; ¶ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2293347;

Резултати одређивања фреквенце хаплотипова и LD анализе

Резултати показују да су у целој групи (болесних и здравих) испитаника са територије Републике Србије најфреквентнији хаплотипови били CG (54,96%) и CT (27,36%). На основу LD анализе и D' вредности (0,7594) показано је да су полиморфизми -191C>A и -216G>T у „везаној неравнотежи“, односно има великих основа за претпоставку да ће се у 75% наслеђивати заједно.

Табела 10. Фреквенција хаплотипова за полиморфизме -191C>A и -216G>T и LD анализа.

Хаплотипови за полиморфизме -191C>A и -216G>T	Фреквенца
CG	54,96%
CT	27,36%
AG	16,38%
AT	1,30%

LD	вредности
D'	0,7594
r ²	0,0498

Резултати показују да су најзаступљеније комбинације хаплотипова, односно генотипови, у групи здравих били CG/CT (20,51%) односно у групи оболелих CG/CG (17,44%), при чему за ове генотипове није било статистички значајног раздвајања ($p = 0,27$) на основу Хи квадрат теста. Такође, генотипови CT/AG и CT/AT били су ретки (1,16%), у групи оболелих испитаника, али нису нађени код здравих, док је генотип AG/AT (1,28%) био присутан само код здравих испитаника.

Табела 11. Комбинације хаплотипова у групи оболелих и здравих испитаника.

Полиморфизми -191C>A и - 216G>T	Здрави		Болесни	
	број	процент	број	процент
AG/AG	3	3,85%	5	5,81%
AG/AT	1	1,28%	0	0,00%
CG/AG	3	3,85%	6	6,98%
CG/CG	12	15,38%	15	17,44%
CG/CT	16	20,51%	11	12,79%
CT/CT	4	10,26%	4	4,65%
CT/AG	0	0	1	1,16%
CT/AT	0	0	1	1,16%

Резултати одређивања фактора ризика у групи пушача за обољевање од канцера плућа

На основу познатих литературних чињеница о повезаности штетних ефеката пушења и канцера плућа, извршена су тестирања само у оквиру групе пушача.

У анализама је коришћен доминантни генетички модел, односно група у којој је био GG генотип поређена је са групом која је обухватала хетерозиготе и рецесивне хомозиготе (GT + TT). Резултати су на основу Хи квадрат теста само у оквиру пушача, показали да је постојала јасна веза између оболелих и контролних узорака са једне стране и полиморфизма -216 G>T (коришћењем доминантног генеичког модела) са друге, где је вероватноћа била $p=0.012$.

Коришћен је модел логистичке регресије и нађено је да су носиоци -216 G>T полиморфизма (прецизније носиоци GG генотипа) имали већу шансу (OR=3.5435, 95% CI 1.0710-11.7244, $p=0.038$), него они који нису носиоци (GT и TT), за настанак канцера плућа када је подешавање укључило пушачки статус.

Резултати одређивања мутација TP53

Резултати показују да је одређено присуство мутација TP53 код три пацијента у егзонима 5, 6 и 7 применом SSCP методе (сваки пацијент је носилац мутације у једном егзону). Након тога следе анализе директног секвенцирања, чиме би се утврдила специфичност откривене мутације у одређеном егзону.

ДИСКУСИЈА

Открићем DNA молекула проникло се у структуру једног новог света, а открићима генетичких варијанти упознаће се лепота његове различитости, али и постојање потенцијално нових ризика за обољевање од одређених болести.

Бројним студијама и интензивним истраживањима су мапиране генетичке варијанте (**Lander и сар., 2001**), при чему је захваљујући технолошком напретку побољшано и убрзано њихово откривање, али и даље остаје задатак истраживачима да одреде прецизну везу између наслеђених својстава, конкретно генетичких варијанти и фенотипа, нарочито у случају оболелих од немикроћелијског канцера плућа, као и потенцијалних фактора ризика за његов настанак.

Механизми развоја предиспозиција за настанак немикроћелијског тумора плућа нису познати, па се трага за сигурним показатељима на молекуларном нивоу, односно за биомаркерима, на основу којих се може дати поуздана дијагноза, прогноза, терапија, односно спречити резистенција и/или нежељена дејства лека. Одређене мутације *EGFR-a* се данас узимају као поуздан показатељ за примену терапије и то несинонимна делеција-инсерција у егзону 19 и тачкаста мутација, која доводи до замене леуцина аргинином L858R (с.2573T>G, rs121434568) и T790M (с.2369C>T, rs121434569) у егзону 21, која је везана са резистенцијом на лечење инхибиторима тирозин киназа (**Liu W и сар., 2007; Liu G, 2008; Kotsakis и Georgoulas, 2010; Han и сар., 2011**). Међутим установљено је да на терапију не реагују сви пацијенти подједнако (**Lynch и сар., 2004; Liu G и сар., 2008**). Због тога је потрага за сигурним показатељем који је у високој корелацији са канцерозним фенотипом проширена и обухватила је полиморфизме појединачних нуклеотида. Да би се извршило молекуларно испитивање циљних биомаркера код потенцијалних пацијената пре давања терапије, односно рано откривање у случају рецидива болести, неопходна је поуздана и оптимизована метода.

Кроз анализу литературе сумирани су проблеми који могу да буду од помоћи приликом избора методе у истраживањима и то су: неуједначеност узорак за анализу, јер се међу туморским могу наћи и здраве ћелије (**Sholl и сар., 2007; Asano и сар., 2006**), различити типови лигананда који активирају EGFR, или друге чланове фамилије рецептора епидермалног фактора раста, много сигналних путева након активације рецептора где кључни молекули тог сигналног пута такође могу да буду погођени мутацијама (**Yarden, 2001; Kim и сар., 2014**),

настанак и развој резистенције након лечења са TKI и појава секундарних мутација (**Oxnard и сар., 2011**), нејасни однос између претеране експресије EGFR-а и туморске инвазивности (**Selvaggi и сар., 2004; Onn и сар., 2004**), штетни ефекти хемотерапије (**Herbst и Bun, 2003**); полиморфност EGFR-а (**Liu W и сар., 2007**), немембрански догађаји, односно они који покрећу сигналну трансдукцију неактивирањем рецептора и други механизми који доводе до повећања сигналне трансдукције и до измене специфичног сигналног пута (**Scagliotti и сар., 2004**).

Постоји широк спектар метода у употреби за детекцију варијанти и мутација EGFR-а и плејада тренутно доступних научних радова (**Scagliotti и сар., 2004**). Након претраге *Pub Med* базе 2012. године (**слика 3**) и хронолошког приказа употребе метода за детекцију мутација EGFR-а кроз десетогодишњи период (**график 1**), као и њихов процентуални удео (**график 2**), установљено је да су имунохистохемијске методе знатно заступљене у истраживањима и то нарочито од 2007-2010., године (**Obradović и Jurišić, 2012**). Када је поновљена претрага 2014. године са истим кључним речима и активираним лимитима, добијен је скоро удвостручен број часописа. Увођење нових софистицираних метода као и нових PCR метода, као и пораст њихове употребе је запажен око 2010. године, али ипак се стиче утисак да су најчешће методе избора комбинација директног секвенцирања и PCR-а.

Свака од метода има своје предности и ограничења, тако да се у пракси одабир методе углавном своди на расположиве ресурсе, било да су у питању опрема, материјал, хемикалије или експертиза. Тако да не постоји дефинитиван закључак и препорука која је метода најбоља за откривање EGFR мутација код NSCLC пацијената. Препоручује се унапређивање и откривање нових метода, било скрининг или циљних метода, које би се изводиле релативно брзо и једноставно, са мање трошкова, довољно осетљиве да открију све, не само уобичајене мутације, са мање инвазивним поступцима за прикупљање узорака, применљиве у већини лабораторија, са смањеним временом и поступцима за оптимизацију, применљиве чак и када су узорци ткива и DNA лошијег квалитета, односно ниске концентрације.

У складу са ресурсима и горе наведеним препорукама, а након претраге литературе, у нашим условима, одабрана је, примењена и оптимизирана PCR-RFLP метода у експериментима за генотипизацију одређених EGFR полиморфизама, након чега је секвенца потврђена директним секвенцирањем.

ОПТИМИЗАЦИЈА PCR-А

Између функције EGFR-а, његове често претеране експресије и/или амплификације (**Merlino и сар., 1985а, Merlino и сар., 1985б, Hirsch и сар., 2003**) и раста различитих тумора код људи, уочена је веза која је постала важна након примене анти-EGFR терапије која данас укључује неколико тирозин киназних инхибитора и моноклоналних антитела (**Mendelsohn и Baselga, 2000; Arteaga 2002; Wheeler и сар., 2010; Hodoglugil и сар., 2013**). Успех ове терапије у многоме зависи од функције EGFR-а, тако да било која промена у кодирајућем региону гена носи могућност измена исхода лечења. У EGFR-у су откривене и соматске мутације и SNP-ови, а неке од њих су прихваћене као фармакогеномски биомаркери у лечењу канцера (**Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labels [Интернет]**).

Полиморфизми -216G>Т и -191C>А су лоцирани у транскрипционом старт месту EGFR промотора и због тога је предложено да могу да буду потенцијални регулатори EGFR активности и самим тим да измене одговор на анти-EGFR терапију (**Liu W и сар., 2005; Rudin и сар., 2008**). Оптимизацијом PCR-а за полиморфизме -216G>Т и -191C>А, у складу са њиховим важним утицајем на EGFR, се омогућавају поуздана и поновљива, будућа и научна и рутинска истраживања. Међутим оптимизација, односно генотипизација за ова два SNP-а се показала као временски захтевна и генерално тешко изводљива (**Obradović и сар. 2013**). Разлози томе су бројни, а тичу се углавном високог садржаја гуанина и цитозина (**слика 4**) који стварају стабилне секундарне структуре у DNA (**Sahdev и сар., 2007**) и DNA материјал који је често оштећен услед припреме ткивних пресека фиксацијом формалином и прожимањем парафином. Оптимизација стандардног PCR-а примењеног у овој студији тиче се неколико параметара: концентрације DNA узорка, концентрације магнезијумових јона, подешавања температуре везивања прајмера и додатка одговарајућих адитива.

На основу резултата директног секвенцирања потврђена је висока специфичност испитиване секвенце са референтном (**слика 5**).

PCR услови: Температура везивања прајмера

Да би се оптимизовали температурни PCR услови истраживач мора емпиријски да одреди оптималну температуру и дужину сваког сегмента методе, као и број циклуса. Наравно, најважнији параметар изгледа да је температура везивања прајмера, где чак и најмања одступања од 1°C или 2°C могу да направе

разлику између специфичне и неспецифичне амплификације (**Lo и Chan, 2006; Roux, 2009**). Температура везивања прајмера која је оптимална за специфичну PCR директно зависи од базног састава прајмера и дужине њихове секвенце и обично је око 5°C испод температуре топљења прајмера, дефинисана као температура дисоцијације између дуплекса прајмер/узорак (**Grunenwald, 2003; Mamedov и сар., 2008**). Уопштено, температуре анилинга се крећу у распону од 55°C до 72°C, али пошто се G-C везују са три водоничне везе, а A-T само са две, висок GC садржај одговара вишим температурама топљења и захтева више температуре за везивање прајмера (**Kramer и Coen, 2001; Mamedov и сар., 2008**).

У овој студији, температуре анилинга су израчунате на 56°C, али у складу са високим GC садржајем (**слика 4**), оптималне су биле најмање за 5°C више. Градијент PCR је показао да је оптимална температура анилинга за PCR била 63°C (**слика 6**), што је било чак и више него што је предвиђено. Као што се и очекивало (**Rychlik и сар., 1990**), анилинг на нижим температурама је довео до неспецифичне амплификације, док су више температуре потпуно онемогућиле анилинг, тако да нису давале PCR продукте. Примењен је и тзв. „touch down“ метод, који обухвата измену PCR-а која укључује прогресивно смањивање температуре анилинга кроз циклусе, да би се повећала специфичност и принос, што је такође тестирано, али без успеха.

Концентрација DNA узорка

Метода фиксације формалином и прожимања ткива парафином је позната као златни стандард за очување узорака и рутински је коришћена више од једног века да би обезбедила дуготрајно складиштење узорака за будућа истраживања (**Magdeldin и Yamamoto, 2012**). Ови FFPE узорци су успешно коришћени у бројним истраживачким техникама, укључујући и PCR методу (**Ben-Ezra и сар., 1991**). PCR уопштено захтева узорак DNA високог квалитета, где се испоставио да је прави изазов екстракција DNA из FFPE ткива. Наиме, формалин коришћен за фиксацију ткива често редукује количину и квалитет доступне DNA, узрокујући формирање нуклеопротеинских комплекса, унакрсног везивања нуклеинских киселина са хистонима, стварања метиленских мостова између суседних аминокиселина група база и фрагментацију нуклеинских киселина (**Brutlag и сар., 1969; Chaw и сар., 1980; Тага и сар., 2013**). Међутим метода изолације није од суштинског значаја, јер након извршеног поређења различитих техника, укључујући фенол-хлороформски протокол, методу исољавања и комерцијалне китове, установљено је да нема значајне разлике у смислу приноса, квалитета и дужине изоловане DNA (**Mirmomeni и сар., 2010**).

У овој студији DNA је изолована коришћењем комерцијалног кита дизајнираног да ефикасно изолује геномску DNA из FFPE узорака. Концентрације DNA пацијената, су износиле од 0,25 до 28,20 $\mu\text{g/ml}$ (**график 3**). Успешна амплификација је разматрана само са концентрацијама DNA већим од 1,98 ng геномске DNA по реакцији, или приближно 0,07 $\mu\text{g/ml}$ DNA у коначној концентрацији (**слика 7**). За оне узорке који су били нижих концентрација од наведених, повећање почетне запремине DNA узорка није довело до задовољавајуће амплификације, врло вероватно и због вишка остатака пуфера за испирање који садржи EDTA, који има потенцијал да инхибира PCR хелацијом магнезијумових јона (**Abu Al-Soud и Radstrom, 2000**). Показано је да је чак и поједначни молекул DNA довољан за успешну амплификацију, односно, чак и количина од 1 μg DNA (**Kolmodin и Birch, 2002; Lo и Chan, 2006**). Ипак у условима из ове студије, концентрација DNA од најмање 2 $\mu\text{g/ml}$ је била потребна за успешну амплификацију. У контролној групи биле су концентрације DNA које су омогућиле успешну PCR амплификацију и рестрикционе реакције.

Специфичност и сензитивност PCR методе

Према вредности области испод ROC криве (**график 4**) од 0,998, показано је да је PCR метода високо специфична и сензитивна, што је и статистички значајно ($p < 0,01$, са интервалом поверења 95% (0,993-1). Према овој анализи, препорука је да се користе концентрације DNA веће од 1,255 $\mu\text{g/ml}$ да би метода била успешна.

Концентрација магнезијумових јона

Концентрације MgCl_2 имају значајан утицај на ефикасност PCR амплификације, служећи као важан кофактор који утиче на активност и тачност рада *Taq* DNA полимеразе, на везивање прајмера, температуре топљења, као и формирање артефакта (**Innis и Gelfand, 1990; Kramer и Coen, 2001; Kolmodin и Birch 2002; Grunenwald, 2003**). Концентрације MgCl_2 у PCR-овима су обично у распону од 0,5 mM до 2,5 mM , зависно од концентрација магнезијум-везујућих компоненти, као што су узорак DNA, прајмери и dNTP, остаци хелатора, као што је EDTA (**Grunenwald, 2003**). Ако је концентрација магнезијума (магнезијум хлорида) много висока, реакција је мање специфична, док ако је сувише ниска, може се очекивати мало амплификације или чак може да је нема уопште (**Miller и Cunningham, 1999; Grunenwald, 2003**). Тако, препоручљиво је да успостављање PCR-а започне са оптимизацијом MgCl_2 , извођењем неколико одвојених реакција са различитим моларитетом.

У овој студији, концентрација $MgCl_2$ је тестирана у опсегу од 0,5mM до 2,5mM, са установљеним оптимумом од 1,5mM (**слика 8**), мада је и од 2mM $MgCl_2$, резултовала одговарајућом амплификацијом. Критеријум за одабир оптималног моларитета се базирао на реакцијама које су уследиле, а заснивале су се на дејству рестрикционих ензима, који су дали најбоље резултате када су примењени на PCR продуктима добијеним са 1,5mM $MgCl_2$. Разматрани опсег прихватљивих моларитета је широк, вероватно због присуства појачивача као што је DMSO, за који је познато да повећава успех PCR-а, чак и са различитим концентрацијама $MgCl_2$.

Адитиви

Различити адитиви који могу да побољшају PCR су често укључени као компоненте у комерцијално доступним китовима. Међутим резултат није загарантован и заправо, веома је тешко да се предвиди који адитив и у којој концентрацији ће омогућити амплификацију жељене секвенце (**Bachmann, и сар. 2003**), тако да сваки PCR понаособ, нарочито ако укључује и DNA узорак који је тешко амплификовати, захтева специфична емпиријска подешавања. У овој студији је тестиран ефекат различитих концентрација глицерола, формамида, Tween 20, Triton X-100, PEG-а, BSA и бетаина, као адитива за амплификацију *EGFR* промоторног региона и генотипизацију -216G>T и -191C>A, према претходно оптимизованим условима PCR (**Obradović и сар. 2013, Jurišić и Obradović, 2014, а, б**).

Показано је да неке PCR методе, нарочито оне које укључују узорке богате GC паровима, не могу да се оптимизују једино подешавањем концентрација компонената и услова везаним са циклусима (**Grunenwald, 2003; Musso и сар., 2006; Sahdev и сар. 2007**). У тим случајевима, PCR адитиви или косолвенти, укључујући DMSO, глицерол, формаמיד и многи други могу да се понашају као појачивачи амплификације и често се користе у истраживачкој пракси да повећају принос и специфичност PCR-а (**Bachmann и сар., 1990; Hung и сар., 1990; Sarkar и сар., 1990; Roux, 2009; Farell и Alexandre, 2012**).

Диметил-сулфоксид

Диметил-сулфоксид је добро описан косолвент који повећава оба, специфичност и продуктивност PCR-а, вероватно због смањивања интер- и интраланчаних реанилинга и формирања проблематичних секундарних структура (**Hung и сар., 1990; Bookstein и сар., 1990; Grunenwald, 2003; Jensen и сар.,**

2010). Последично, смањује температуру топљења прајмера и олакшава раздвајање ланца PCR продуката, обезбеђујући ефикаснију амплификацију (Grunenwald, 2003; Kang и сар., 2005; Sahdev и сар., 2007; Jensen и сар., 2010). Треба имати у виду и концентрацију DMSO у реакцији, који има способност да редукује активност Taq DNA полимеразе и до 50% (Hung и сар., 1990; Grunenwald, 2003).

Оптимална концентрација је била 5% (слика 9), након тестирања различитих препоручених концентрација у опсегу од 1-10% (Kolmodin и Birch, 2002; Grunenwald, 2003). Додатак DMSO у реакциону мешавину у овој студији, био је есенцијалан за успешну амплификацију и ниједна од претходно описаних стратегија оптимизације не би била успешна без његовог присуства (слика 10). Показано је такође да успешност амплификације не зависи од начина изолације DNA (слика 10).

Глицерол

EGFR промоторски регион је изузетно богат гуанином и цитозиним и тако тежи да створи интер- и интра-секундарне структуре у DNA молекулу (Sahdev и сар., 2007). Последично, адитиви попут глицерола који имају способност да отворе двоструки DNA хеликс, могу знатно да побољшају и принос и специфичност PCR-а (Lee и сар., 1981). Поред ове денатурације истакнуто је да глицерол повећава и температурну стабилност полимеразе и специфичност везивања прајмера (Cheng и сар., 1994; Grunenwald, 2003).

Побољшавајући ефекти глицерола у PCR-у у присуству GC богатих узорака су тестирани у концентрацијама од 0,5% до 27%, са најбољим резултатима у концентрацијама од 10-20% (Varadaraj и Skinner, 1994; Yason и сар., 1995; Weissensteiner и Lanchbury, 1996). У овој студији је глицерол додат у реакциону смешу у концентрацијама од 5% до 25% са повећањима од 5%. Мада су сви показали жељену продукцију амплификата (слика 11), при мањим концентрацијама се показала амплификација додатних неспецифичних фрагмената мањих величина, тако да реакциони продукти који су садржали 5% или 10% глицерол су сматрани незадовољавајућим и искључени су из даљих анализа. Дешава се да високе концентрације глицерола резултују у мањем приносу жељеног PCR продукта и овај феномен је у складу са већ описаним инхибиторним ефектом високе концентрације глицерола на Taq DNA полимеразу (Varadaraj и Skinner, 1994; Cheng и сар., 1994; Nagai, и сар., 1998). PCR продукти добијени са концентрацијама 15-25% глицерола, су последично били подвргнути рестрикцији,

што је довело до фрагмента жељене величине за мање концентрације, али неадекватног резултата за највећу (25%) концентрацију глицерола (**слика 15**). Може се сматрати да глицерол у високим концентрацијама поред полимераза вероватно може да инхибира и друге ензиме. Тако да би за оптимизацију PCR-а, било препоручљиво да се узме најмања ефективна концентрација глицерола, нарочито ако пост-PCR процеси укључују додатну ензимску активност. Начин изолације DNA молекула и код овог адитива није утицао на успешност PCR амплификације (**слика 11-13**), чак ни на успешност RFLP анализе (**слике 14, 15**), мада се додуше уочава образац да у PCR-у при додатку концентрација глицерола једнаким или мањим од 10%, долази до појаве неспецифичних ампликона.

Бетаин

Бетаин је веома користан адитив који повећава амплификацију PCR-а нарочито у регионима богатим GC паровима (**Baskaran и сар., 1996; Henke и сар., 1997; Frackman и сар., 1998; Sahdev и сар., 2007**). Применљив је и у синтези конструката са високим садржајем GC парова (**Jensen и сар., 2010**), чак и у бројним апликацијама PCR-а (**Pratyush и сар., 2012; Lajin и сар., 2013**). Висок садржај гуанина и цитозина у DNA секвенци тежи да формира различите компликоване структуре, попут нпр. укоснице. Тај DNA полимераза се зауставља за време елонгације кад дође близу таквих секундарних структура, а бетаин је показао да елиминше те паузе DNA полимеразе (**Mytelka и Chamberlin, 1996**). Чак када су коришћене различите DNA полимеразе у различитим и одвојеним реакцијама, са узорцима који су имали висок садржај GC парова, амплификација се појавила додатком самог бетаина или у комбинацији са различитим адитивима (**Henke и сар., 1997; Musso и сар., 2006**).

У складу са већ потврђеном функцијом као што је стабилизација термалне денатурације протеина или „изоостабилизације“ DNA, при којој се изједначавају разлике између температура топљења базних парова А-Т и G-C у DNA (**Rees и сар., 1993**), не би зачудило да бетаин побољшава PCR амплификацију промоторног региона *EGFR-a* са екстермно великим садржајем GC парова.

У овој студији је тестиран бетаин у ефективној моларној концентрацији у опсегу од 0,5М до 2,5М са повећањима од 0,5 М, на DNA узорцима изолованим на три начина (**слике 16-18**). Видљива амплификација се појавила са додатком 1М, 1,5М и 2М бетаина, код контролне DNA (**слика 16**), док је код DNA из замрзнутог ткива била примећена са додатком 1,5М и 2М бетаина (**слика 17**). Код DNA изоловане из парафинизованог ткива амплификација је била уочљива при

концентрацијама од 1М-2М бетаина (**слика 18**), при чему је повећање концентрације више од 2М инхибирало PCR амплификацију, вероватно инхибирајући Taq полимеразу (**Baskaran и сар., 1996**). Тако да је додаток бетаина у коначној концентрацији од 1,5М знатно побољшо PCR амплификацију *EGFR* промоторног региона са високим садржајем GC парова, што је потврђено и другим студијама (**Pratyush и сар., 2012**).

RFLP анализе са ензимом Cfr42I довеле су до очекиваних резултата, тј. задовољавајуће амплификације (**слика 19**), а такође је рестрикција ензимом BseRI била успешна (**Sugimoto и сар., 2005**), наиме додатком 1,5М и 2М бетаина није дошло до интеракције са рестрикцијом ензимом BseRI без обзира на начин изолације DNA (**слика 20**).

Резултати показују да начин изолације DNA молекула такође није утицао на успешност PCR-RFLP амплификације при додатку бетаина (**слике 16-20**). Додатком бетаина у концентрацијама једнаким или мањим од 1М, дошло до појаве неспецифичних ампликона, а код већих концентрација, тачније 2,5М изостале су PCR амплификације код сва три типа изолације DNA. Овде је једино било одступања код FFPE DNA, где је постојала успешна амплификација и са 1М, и нешто слабија са 2М бетаином, и најуспешнија са 1,5 М бетаином (**слика 18**).

Tween-20 и Triton X-100

Tween-20 и Triton X-100, су заправо нејонски детерџенти и корисни су у сузбијању образовања секундарних структура и тако повећавају успех амплификације (**Bachmann и сар., 1990**). Њихов ефекат је обично повезан са неутрализовањем наелектрисања јонских детерџената често коришћених у DNA екстракцији, као што је SDS (енгл. sodium dodecyl sulfate, SDS) (**Kramer и Coen, 2001; Goldenberger и сар., 1995**). Упркос истим механизмима акције Tween-20 и Triton X-100 се разликују по ефикасности, као што је показано амплификацијом 57% G+C-богатог узорка: 0,05%-0,15% Tween-20 побољшали су специфичност амплификације, док додаток Triton X-100 у истој реакционој мешавини је резултовао у продукцији неспецифичних амплификата (**Varadaraj и Skinner, 1994**). Мада познат као стабилизатор полимеразе показано је да Tween-20 у концентрацијама већим од 0,15% инхибира неке, али не и друге полимеразе укључене у PCR (**Varadaraj и Skinner, 1994**), што даље компликује њену свакодневну употребу као појачивача амплификације. Слично као формамид, Tween-20 у концентрацијама од 0,001% до 1,0% је неефикасан у реакцијама које треба да амплификују дугачке фрагменте (**Ohler и Rose, 1992**). Са друге стране,

секвенцирање кратке DNA секвенце је побољшано Tween-20 у концентрацијама од 0,5% (**Bachmann и сар., 1990**). Испитиван је у овој студији утицај додавања Tween-20 и Triton X-100, оба у концентрацијама између 0,1% до 2,0% на специфичност и ефикасност PCR-а, али су све реакције резултовале са неспецифичностима или мрљама (**слика 21**). Имајући у виду да су претходни извештаји везани за успех PCR након додавања нејонских детерџената били неуједначени, испитивања из ове студије јасно потврђују да је свака PCR јединствена и да захтева индивидуалну оптимизацију. Важно је напоменути да је DNA коришћена у овој студији изолована из тумора плућа коришћењем PureLink™ Genomic DNA Kit (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA) који садржи Triton X-100 (**PureLink Genomic Lysis/Bind Buffer: Material Safety Data Sheet [Интернет]**). Његова улога у изолацији DNA је да раствори мембране, али може индиректно да помогне амплификацији неутрализацијом присутних јонских детерџената, пре него PCR-у.

Формаид

Формаид је други добро познати PCR појачивач, који редукујући формирање водоничних веза између два ланца DNA и смањујући DNA температуру топљења помаже амплификацију узорка који може да формира јаке секундарне структуре (**Varadaraj и Skinner, 1994; Blake и Delcourt, 1996**). Његова главна улога у PCR-у и секвенцирању региона DNA богатих GC паровима је већ показана при концентрацијама од 1,25% до 5% (**Sarkar и сар.,1990; Zhang и сар., 1991; Blake и Delcourt, 1996; Kovarova и Draber, 2000**). Са друге стране, веће концентрације формаида, као што су оне између 10% и 15% инхибирају амплификацију (**Sarkar и сар.,1990; Varadaraj и Skinner, 1994**). Додатно, при његовом нижем ефективном концентрационом опсегу (**Chakrabarti и Schutt, 2001**), формаид, чини се да није делотворан увек, када треба амплификовати дуге DNA секвенце (**Cheng и сар., 1994; Farell и Alexandre, 2012**). У овој студији, ефекат формаида на PCR-у је био тестиран у концентрацијама од 1,25% до 10%, али се није појавио жељени амплификат (**слика 22, А**). Показано је да ће права концентрација формаида зависити од процента GC нуклеотида у циљној секвенци (**Zhang и сар., 1991**). DNA узорци коришћени у овој студији су екстремно богати GC паровима, са 75,45% G + C садржајем у секвенци од 660 базних парова (**Obradović и сар. 2013**). Ако би се формула за одређивање адекватног процента формаида применила (**Zhang и сар., 1991**), вредност би порасла више од 17,5% и превазишла PCR инхибиторне концентрације формаида. Тако, када треба амплификовати регионе екстремно богате GC нуклеотидима, формаид као

појачивач, треба заменити другим доступним адитивима, или другим техникама оптимизације, као што је „touchdown PCR“ (Hube и сар., 2005).

Полиетилен-гликол

PEG је познати молекуларни растварач, који у концентрацијама од 5% до 15% може да повећа принос и специфичност PCR-а стабилишући полимеразну активност (Kramer и Coen, 2001). Као и BSA додаток, PEG у PCR реакционој смеси у овој студији је довео до неспецифичних амплификација и мрља (слика 22, Б). Пошто нема много студија које су објавиле успешну амплификацију додатком PEG-а, нарочито оне које укључују GC-богате регионе DNA, други адитиви су можда бољи избор за амплификацију проблематичних узорака.

BSA

Поред јонских детерџената, постоје бројне друге супстанце које могу да ометају DNA амплификацију, принос и специфичност. Оне укључују протеиназу К, која може да буде стални реагенс китова за DNA изолацију (Shahriar и сар., 2011) и може да се пренесе у PCR (Roux, 2009). BSA је уобичајени стабилишући протеин (Kramer и Coen, 2001), способан да очисти и премости ефекте, оба, ендогених и инхибитора полимераза, и претпоставља се да је он алтернативан супстрат за везивање инхибитора (Forbes, 1996; Kreader, 1996; Farrell и Alexandre, 2012). Међутим, упркос бројним радовима који говоре о позитивним дејствима BSA на PCR, покушај да се амплификује GC-богат *EGFR* промоторни регион у присуству BSA резултовао је неспецифичном амплификацијом (слика 22, В). У складу са претходним студијама (Kreader, 1996; Nagai и сар., 1998), BSA концентрације испитиване у овој студији су биле у опсегу од 0,1 ug/ul до 1 ug/ul. Разлог овог неуспеха није јасан и даља испитивања са проширеним опсегом концентрација и у комбинацији са другим адитивима би расветлиле да ли BSA може да се користи за PCR у овом или сличним секвенцама које имају GC-богате регионе.

Све наведено илуструје јединственост састава сваког појединачног региона богатог GC паровима и секундарних структура које се формирају, за које је неопходно специфично емпиријско подешавање додатком адекватних концентрација адитива које побољшавају успешност PCR-RFLP анализа.

EGFR И ЊЕГОВЕ ВАРИЈАНТЕ

Експресија и амплификација EGFR-a

EGFR има велику хомологију са *erbB* онкогеним продуктом птичијег еритробластозис вируса, а због својих особина се и сам може сматрати онкогеном (Yamamoto и сар., 1983). EGFR експресија се разликује код нормалних и код трансформисаних ћелија. Експресија EGFR-a је комплексна и обухвата регулацију транскрипције, која се заснива на балансу између транскрипционих фактора са позитивним и негативним ефектом. У контексту регулације EGFR-a наводе се и различити *trans* и *cis* елементи, као што су: TP53, p63, DNA везујући протеин ERDBP-1 (енгл. epidermal growth factor (EGF) responsive DNA-binding protein, ERDBP-1), Egr-1 фактор узрокован хипоксијом (енгл. early growth response factor 1, Egr-1), нуклеарни фактор односно EGFR-специфични транскрипциони фактор (енгл. EGFR-specific transcription factor, ETF), ETR - EGFR транскрипциони репресор (cis-acting EGF receptor transcriptional repressor), репресорни регулаторни елемент у првом интрону EGFR-a, трансформишући фактор раста-бета (енгл. transforming growth factor β (TGF- β), GCF- GC везујући фактор (GC-binding factor, GCF), микросателитска CA секвенца, AP1, AP2 и многи други (Kageyama, и сар., 1988a; Kageyama и сар., 1988b; Kageyama и сар., 1989; Chen и сар., 1993; Hou и сар., 1994a; Hou и сар., 1994b; Reed и сар., 1998; Gebhardt и сар., 1999; Buerger и сар., 2000; Nishi и сар., 2001; Nishi и сар., 2002; Wilson и Chrysogelos, 2002).

Претерана експресија EGFR-a се повезује са напредним стадијумом болести, лошијом прогнозом и преживљавањем у различитим туморима људи. Кроз литературу се долази до контрадикторних резултата, по питању комплексних интеракција: амплификације EGFR-a, претеране експресије EGFR-a и нивоа транскрипције. Постоје студије које показују да експресија и амплификација нису биле (Xu и сар., 1984; King и сар., 1985), односно да јесу биле у корелацији (Merlino и сар., 1985a, Merlino и сар., 1985 б, Hirsch и сар., 2003). Показано је, да се услед амплификације EGFR-a јавља аберантна RNA, која је резултат реаранжмана гена у хромозому 7 (Merlino и сар., 1985a). У новије време је показано да боље преживљавање имају пацијенти код којих је било повећаних копија EGFR-a, а који су примали тирозин киназне инхибиторе (Dahabreh и сар., 2011)

Првобитни научни радови нису утврдили јасан однос између експресије EGFR-а и клиничког исхода код пацијената третираних TKI (**Kris и сар., 2003; Fukuoka и сар., 2003**), за разлику од студија које су касније утврдиле овај однос (**Carpuzzo и сар., 2005; Tsao и сар., 2005**).

Показано је и да су активирани мутације EGFR-а и амплификација EGFR-а повезане са појачаном mRNA експресијом, а свака од ових карактеристика је у високој корелацији са клиничким исходом (**Lynch и сар., 2004; Paez и сар., 2004; Carpuzzo и сар., 2005**).

Неки пацијенти имају већу предиспозицију за развој соматских мутација, што указује на генетичке основе овакве предиспозиције у EGFR-у или у неким другим генима, а чак су се показале интерперсоналне разлике у експресији EGFR-а (**Liu W и сар., 2005**).

Фреквенца EGFR полиморфизама

Између великих етничких група попут Кинеза, Индуса и Европљана установљене су разлике испитивањима неких полиморфних гена. Веће су разлике између било ког припадника ових великих група људи и оних који припадају релативно изолованим групама попут Јужноамеричких Индијанаца, Баскија, Ескимима и Аустралијских домородаца, него што су разлике између припадника било које од ових великих група (**Маринковић и сар., 1981**).

Позиција гена и њихов редослед на хромозомима је скоро идентичан код свих људи, мада постоје варијације које се разликују између појединих популација. Већина варијација нађених код људских популација се налази у уједначеним фреквенцијама, али поједини алели иако су присутни у свим групама могу да покажу знатне разлике у фреквенцијама између популација, а постоје и такве варијанте које су ограничене само на поједине популације, иако не морају да буду присутне код свих чланова популације. Бројни су фактори који доводе до ових појава: генетичка случајност (енгл. genetic drift), ефекат оснивача (енгл. founder effect), хетерозиготска предност (енгл. heterozygote advantage). Да постоји различит ризик међу популацијама за настанак болести и њен ток указују разлике у фреквенцијама алела који узрокују болести (**Nussbaum и McInnes, 2007**).

Предмет интензивних истраживања су механизми који доводе до предиспозиције за настанак канцера, па се као кандидати за настанак те предиспозиције опредељују бројни полиморфизми за које је установљен неки функционални значај. Истраживања у оквиру обимних студија указала су на

постојање интеретничких разлика у погледу распрострањености типичних мутација које се већ користе као дијагностички модел за канцер плућа, попут мутација *EGFR-a* и *KRAS* мутација. До данас се зна, на пример да је у популацији азијских пацијената у односу на оне који су пореклом из Африке или Европе, већа распрострањеност мутација *EGFR-a*, мања распрострањеност *KRAS* мутација и већа пропорција пацијената који одговарају на TKI, као и веће укупно преживљавање (Zhou и Christiani, 2011).

Међу много полиморфизама који су кандидати за будуће биомаркере, у овој студији су одабрана три циљна полиморфизма за које је установљено да постоје интеретничке разлике, потенцијална улога у регулацији *EGFR-a*, а како нема података за фреквенце ових полиморфизама у популацији испитаника са територије Републике Србије ово би била прва студија у којој је извршено профилисање генотипова за полиморфизме -216G>Т (rs712829), 191C>А (rs712830) и 181946C>Т (D994D) (rs2293347) (табела 4).

Ова истраживања су изазов у много чему обзиром да се до сада није испитало пуно релација, па у будућности треба дати многе одговоре. Недовољно је испитан механизам који доводи до настанка интеретничких разлика у погледу фреквенце полиморфизама - да ли су то фактори средине или су то етнички, односно генетички фактори, а потом неуједначен је и приказ о фреквенци алела, односно генотипова и хаплотипова (Liu G и сар., 2008; Giovannetti и сар., 2010; Jung и сар., 2012). Такође је недовољно података о разлици у фреквенцији полиморфизама између здравих и болесних, мада неколико радова указује да нема разлике (Ichihara и сар., 2007; Wang, 2007). Недовољно је података и о вези мутација и полиморфизама (Giovannetti и сар., 2010; Giovannetti и сар., 2011; Liu W и сар., 2011). Потом није разјашњено да ли разлике у фреквенци полиморфизама утичу на било који начин на настанак канцера; да ли те исте разлике утичу на настанак соматских мутација, односно да ли су полиморфизми фактори који доводе до настанка соматских мутација (Liu G и сар., 2008; Giovannetti и сар., 2010; Jung и сар., 2012); да ли се мења фреквенција полиморфизама код оних који не живе више у својим матичним земљама (Tsao и сар., 2006; Liu W и сар., 2011, Ling и Lee, 2011). Да би се одговорило на ова питања неопходна су обимна истраживања која би укључила већи број узорака равномерно узетих са територије Републике Србије, што повлачи питања трошкова таквих испитивања, па је оптимизована, поуздана метода, попут методе у овој студији, високо препоручљива у том случају.

Мада има студија у којима није било статистички значајне разлике између пацијената који су имали мутације и полиморфизме *EGFR-a* (**Giovannetti и сар., 2010**), има и таквих где је показано да су били у јакој асоцијацији (**Liu W и сар., 2011**).

Подаци који указују на фреквенцију генотипова су кроз студије прилично неуједначени, тако да је тешко извући јасан образац и прецизне закључке. Постоје студије које су потврдиле да је најзаступљенији био GT генотип (**Liu G и сар., 2008; Giovannetti и сар., 2010**), односно GG генотип за -216G/T (**Jung и сар., 2012**), заправо CC генотип за -191C/A (**Liu G и сар., 2008; Giovannetti и сар., 2010**).

За сва три испитивана полиморфизма из ове студије било је више доминантних хомозигота него хетерозигота и мутантних хомозигота и у контролној и у групи оболелих, тестирано за сваки полиморфизам појединачно (**табела 5**). У контролној групи за -191C/A било је 82,1% доминантних хомозигота, а код оболелих 72,3%, што је више од хетерозигота (код контролне групе 7,7% и код оболелих 17,0%) и мутантних хомозигота (код контролне групе 10,3% и код оболелих 10,6%).

У случају -216G/T код контролне групе било је 47,5% GG, а код оболелих 60,5% GG, што је више од хетерозигота (42,5% код контролне групе и 27,9% код оболелих) и мутантних хомозигота (10,0% код контрола и 11,6% код оболелих).

За полиморфизам 181946C>T, односно G/A код контрола било је 92,6% GG, а код оболелих 95,7% GG, што је било више од хетерозигота код контрола 7,4% и код оболелих 4,3%. Мутантних хомозигота за овај полиморфизам није било ни у контролној групи, а ни код оболелих.

Такође, за сва три испитивана полиморфизма из ове студије било је више доминантних хомозигота него хетерозигота и мутантних хомозигота, рачунато у оквиру појединачних демографских група (**табеле 6-8**). Носиоци CC генотипа за -191C>A су код пушача имали 43,8%, односно бивших пушача 15% у односу на непушаче којих је било 20%. Међу носиоцима CA генотипа било је 6,3% пушача, 3,8% бивших пушача и 2,5% непушача. Док су носиоци генотипа AA били присутни само код пушача са 7,5% односно код бивших пушача са 1,3%, тј., код непушача их није било (**табела 6**).

За полиморфизам -216G/T носиоци доминатног хомозигота били су заступљени код пушача са 26,3%, односно бивших пушача са 13,2%, док је непушача било са 11,8%. Хетерозигота је било у оквиру пушача и бивших пушача

21,1% и 6,6% у односу на непушаче са 9,2%. Мутантних хомозигота је било међу пушачима 7,9% и 1,3% међу бившим пушачима, односно 2,6% међу непушачима (табела 7).

Полиморфзам 181946C>Т, тј., G>А имао је следећу дистрибуцију генотипова у оквиру пушачког статуса: GG генотип је био заступљен код пушача са 59,4% и бивших пушача са 21,7%, односно код непушача 13,0%, а GA је био код пушача са 2,9% и бивших пушача са 1,4%, односно код непушача 1,4% (табела 8).

За сва три полиморфизма важи да није утврђена зависност између конкретног полиморфизма и статуса (болетан/здрав), година, пола и пушачког статуса, односно, полиморфизми су на исти начин расподељени у групама здравих и болесних, мушкарца и жена итд. (табеле 6-8). Генерално, дистрибуција за сва три полиморфизма је била у корелацији са најчешћим генотиповима у различитим етничким групацијама према подацима са базе NCBI (табела 9).

Знатне разлике у дистрибуцији SNP-ова су примећене кроз велике етничке групе. У поређењу са другим групама -216G/Т је чешћи међу белцима и Афро Американцима, него код Азијата. Полиморфизам -191C/А је присутан само код белаца, док је код Азијата најзаступљенији 181946C>Т (D994D) (Liu W и сар., 2005; Choi и сар., 2007). Подаци са базе NCBI међу популацијама различитог етничког порекла су показали да је алел G заступљенији од алела Т, С од А, G од А за полиморфизме -216G>Т (rs712829), -191C>А (rs712830) и 181946G>А (D994D) (rs2293347), што је потврђено и резултатима ове студије (табела 5). Етничке разлике у појави канцера, стопи смртности и стопи преживљавања, су већ показане у литератури (Siegel и сар., 2014).

Тешко је предвидети какав ће ефекат имати појединачни SNP у интеракцији са леком, односно тешка је идентификација таквих циљаних појединачних SNP-ова у геному и процене да ли су носиоци са предиспозицијом за неку болест. Зато се раде анализе сетова, блокова генетичких варијанти, односно хаплотипова који се наслеђују заједно у тзв., „везаној неравнотежи“ (енгл. linkage disequilibrium) и њихова идентификација је лакша, било да су истраживања везана за односе генома са једне стране и лечења са друге, односно генома и пријемчивости за болест (Bull и сар., 2000; Ma и Lu, 2011). Обимне студије асоцијације целог генома човека (енгл. genome-wide association, GWA) су расветлиле пуно односа између варијанти и предиспозиција за болести (McCarthy и сар., 2008)

У овој студији су у складу са литературним подацима најзаступљенији хаплотипови били С-С и С-Т за -191С/А и -216G/Т полиморфизме (**Liu W и сар., 2005**) у целој групи рачунајући и болесне и здраве испитанике. Профил групе испитиване у овој студији у погледу комбинације хаплотипова, односно генотипова показује да су најзаступљенији генотипови у групи здравих били СС/СТ (20,51%) односно у групи оболелих СС/СГ (17,44%), при чему за ове генотипове није било статистички значајног раздвајања ($p=0,27$), односно на једнак начин су распоређени у целој групи. Ретки генотипови у групи оболелих испитаника су били СТ/АГ и СТ/АТ (1,16%), али нису нађени код здравих, док је генотип АГ/АТ (1,28%) био присутан само код здравих испитаника.

Хаплотипови су показали знатне етничке разлике за полиморфизме -216G/Т и -191С/А. Најфреквентнији је био СС хаплотип код азијата и Т-С код белаца. С-А хаплотип је био заступљен само код белаца, а Т-А није био заступљен ни код једне групе. Указано је да Т-С у односу на С-С хаплотип има већи утицај на ниво експресије тј. синтезе mRNA *in vivo*. Испитивања *in vivo* указала су да су главна места транскрипције на позицији -260, што значи да су позиције -216 и -191 сигурно у транскрипту (**Liu W и сар., 2005**). Показано је у овој студији да су полиморфизми у „везаној неравнотежи“, (енгл. linkage disequilibrium, LD), али да она није јака, односно да слаба је корелација између ова два полиморфизма.

Полиморфизми -216G/Т и -191С/А и краћи СА поновци су догађаји који се доводе у везу са појачаном продукцијом EGFR-а. То је значајно, јер је код пацијената источно азијског порекла у односу на пример на Европљане и друге етничке заједнице, знатно мања фреквенца поменутих полиморфизма (**Nomura и сар., 2007**), што би могло да укаже да пацијенти различитог етничког порекла треба да имају одговарајући односно, чак и међусобно различит третман, тако да етничко порекло не мора да буде кључна ставка, али се може узети у обзир при доношењу одлуке за третман. То је нарочито важно због доказаних чињеница да је већа стопа одговора на лечење TKI била повезана са непущачима, затим оним особама које су азијског порекла, онима који су примали TKI као другостепену терапију, оним који су били позитивни на EGFR мутације и пацијенти женског пола (**Shigematsu и сар., 2005; Jung и сар., 2012**). Али у вези са тим треба имати у виду и нпр. токсичне ефекте терапије (у виду диареје и раша по кожи) који су били у знатној корелацији са полиморфизмима -216G/Т и -191С/А (**Rudin и сар., 2008; Giovannetti и сар., 2010**).

У више спроведених студија није било статистички значајних разлика између генотипа и следећих клиничких карактеристика: година, пола, стадијума,

пушачког статуса, хистологије канцера, и истовременог или претретмана са хемотерапијом (**Liu G и сар., 2008**), односно између генотипа и присуства EGFR мутација (**Jung и сар., 2012**).

Наведено илуструје потребу за спровођењем даљих обимнијих истраживања, јер свака од ових појединачних својстава укључујући мутације, амплификацију *EGFR-a*, експресију протеина, синтезу iRNA, одговор на терапију, преживљавање и њихове међусобне интеракције, указује да се разликују код пацијената различитог етничког порекла, односно да постоје чак и интериндивидуалне разлике. Поред података о интеретничким разликама, интересантно би било одговорити на питања о фреквенцији и дистрибуцији генотипова ових полиморфизама у популацијама у матичним локалитетима, као и оним које су промениле пребивалиште.

Комбинације фактора ризика за обољевање од канцера плућа

Канцер плућа је тешко излечива болест и водећи узрок смртности у свету, тако да добија размере пандемије широм света (**Gibson и сар., 2013; Siegel и сар., 2014**). Механизми попут повећане амплификације гена, повећане продукције протеина, полиморфизама у вези са повећаном генском и протеинском експресијом EGFR-a, соматске мутације које погађају циљано ТК домен EGFR-a, кључне за абнормалну ћелијску активацију, повећана експресија mRNA, алелски дисбаланс као и епигенетички механизми (**Yarden , 2001; Jaenisch и Bird, 2003; Liu G и сар, 2008; Brambilla и Gazdar, 2009; Giovannetti и сар., 2010; Rho и сар, 2011; Jung и сар., 2012; Kim и сар., 2014**), итд. су само неки од догађаја који су описани до данас, што је све скупа можда само врх леденог брега за све неиспитане интеракције и сигналне мреже које погађају ћелије канцера.

Међу бројним факторима ризика (**Institute of Medicine (US), 2002**) пушење је један од главних узрочника канцера плућа у Европи и у осталим деловима света. Сваке године пушење изазива прерану смртност око 700 000 Европских држављана. Према годишњој смртности од канцера плућа Србија је на трећем месту, иза Мађарске и Холандије (**Gibson и сар., 2013**). Додуше, због пуно разлика у пушачким навикама током историје, произилазе и разлике међу Европским замљама. Оно што највише утиче за настанак ризика од канцера плућа су: дужина и интензитет конзумације дувана, дубина инхалације, одвикавање и престанак пушења и тип цигарета или дувана који се користи (**Tuczynski и сар., 2003**). Иако је примећено да је код дугогодишњих пушача ризик за обољевање од канцера плућа већи 20-30 пута у односу на непушаче и смањује се са престанком пушења,

ипак никад не може да се врати на минималан ниво ризика који постоји код непушача. Тако да је зависност од дувана главни узрок канцера плућа и попутни престанак пушења, без компромиса са коришћењем „лајт“ цигарета и сл., може да доведе до смањења ризика (Hecht, 1999, а, б; Hecht, 2002; Tuczynski, и сар., 2003).

Показано је да су поред утицаја спољашње средине, попут конзумације дувана између осталих (Boyle и сар., 1997; Sasco, 2004; Irigaray и сар. 2007) и генетички фактори повезани са предиспозицијом обољевања од канцера плућа (Amos и сар., 2008; Wu и сар., 2004).

Мада није потпуно расветљен генетички механизам повећане протеинске продукције EGFR-а, он се често догађа код NSCLC и води малигном фенотипу кроз измењен интерцелуларни сигнал преко низа каскадних реакција. Средином осамдесетих година двадесетог века су препозната три механизма у туморима код људи која утичу на измену EGFR-а: амплификација која је у вези и која није у вези са измењеном mRNA и амплификација која је у вези са повећаном експресијом EGFR-а (King и сар., 1985).

Позиција два полиморфизма -216G/T (rs712829) и -191C/A (rs712830) указује на њихов значај у регулацији EGFR-а. Полиморфизам -216G/T је позициониран у месту везивања транскрипционог фактора Sp1, а -191C/A је близу места иницијације транскрипције (Kageyama и сар., 1988 а, б; Johnson и сар., 1988). Показано је заправо да су ова два полиморфизма повезана са повећаном активношћу промотора, односно са генском и протеинском експресијом (Liu W и сар., 2005, Liu W и сар., 2007). Генотипови GT и TT полиморфизма -216 G/T показали су тенденцију ка повећаној mRNA експресији у ћелијским културама (Nomura и сар., 2007).

Полиморфизам 181946C/T (односно G/A), (D994D) rs2293347 је смештен у кодирајућем региону DNA (у егзону 25) и показао је интересне разлике у дистрибуцији фреквенција и био је најчешћи у Азијској популацији. Пошто је ово синонимна варијанта, претпостављено је да та промена може да утиче на стабилност iRNA, транслациону кинетику итд., што може да води измењеној структури и функцији протеина (Sauna и сар., 2007). За овај SNP, носиоци доминантног алела, било у хомозиготној или хетерозиготној форми, су боље реаговали на терапију гефитинибом (Ma и сар., 2009). Иако у овој студији није нађено (табела 4), постоје и такве студије у којима је показана јасна разлика у дистрибуцији генотипа између оболелих и контрола и значајан заштитни ефекат

мутантног хомозигота код пушача (**Choi и сар., 2007**), заправо, овај мутантни хомозигот није био присутан ни у једном узорку у овој студији (**табела 5**).

Фреквенције полиморфизама између здравих особа и пацијената са тумором плућа у овој студији се нису битно разликовале (**табела 4**), што је у корелацији са налазима других студија, међу особама пореклом из САД и Европе (**Nomura и сар., 2007**), а и из Источне Азије (**Ishihara и сар., 2007**).

Болести које су у вези са туморима су углавном чешће међу старијом популацијом (старијом од 61 године) код испитаника са територије Републике Србије, односно већина смрти (1661 за 2013. годину) је била између 60-64 године (**Demographic Yearbook in the Republic of Serbia, 2014**). У овој студији средња вредност година за контролну групу је била 41 (опсег од 25-66), што је у корелацији са средњом вредношћу у укупној популацији испитаника са територије Републике Србије (**Demographic Yearbook in the Republic of Serbia, 2014**) и статистички се значајно разликовала ($p < 0,05$) од 61 (опсег 36-78), што је била средња вредност за пацијенте тумора плућа (**график 5**). Показало се да су старије особе чешћи пацијенти тумора плућа, што је потврђено и у литератури (**Siegel и сар., 2014**). Чињеница да је канцер јавља као последица споре акумулације мутација и да је везан углавном за старију популацију, указује и на то колико су јаки механизми одбране организма, укључујући и имуни систем и антиоксидациону заштиту и механизме поправке DNA. Тако да су препоручљиве и неопходне измене у начину живота које доприносе бољем раду ових одбрамбених механизма ради побољшавања његовог квалитета.

Конзумација дувана се мењала за време историје, што се одразило на појаву тумора плућа и уопштено је било више оболелих међу мушкарцима него међу женама широм света (**Gibson и сар., 2013; Siegel и сар., 2014**). У источној Европи највећа учесталост и стопа смртности је код мушкараца, док је најмања стопа у северној са изузетком Балтичких земаља. Код жена најмања учесталост и морталитет су у јужној Европи (са изузетком земаља бивше Југославије), али у северној Европи учесталост је веома висока (**Tuczynski и сар., 2003**). Смањење оболелих од канцера плућа у САД је било опажено у оба пола у протеклих 10 година након редукције конзумације дувана (**Siegel и сар., 2014**), што указује на штетност његове конзумације. Мада је било више пушача међу особама мушког пола (63,3%) него међу женама (47,1%), у овој студији није уочена веза између пола и пушачког статуса у укупној популацији испитаника са територије Републике Србије ($p = 0,271$). Такође није било везе у укупној популацији (оболелих и контрола) и пола када су анализе спроведене само за пушаче ($p > 0,05$).

На основу ове студије показало се да конзумација дувана има велики утицај на смртност од NSCLC-а у популацији испитаника са територије Републике Србије. Прецизније, показало се да особе носиоци GG генотипа EGFR полиморфизма - 216G/T (rs712829) у комбинацији са пушењем имају значајан фактор ризика за настанак NSCLC-а, више него хетерозиготи или мутантни хомозиготи, тако да се може закључити да Т алел може да има заштитни ефекат у популацији испитаника са територије Републике Србије. Показано је и у другим студијама је да Т алел доведен у везу са бољим преживљавањем (Liu G и сар, 2008). Овај проналазак може да буде од значаја за превенцију канцера плућа наравно, након потврде резултата на већем броју узорака.

Број хемикалија у дуванском диму се мери у хиљадама, где је око 70 од њих канцерогено (Gibson и сар., 2013) и показано је да пушење доводи до појаве спектра мутација (Toyooka и сар., 2007). У дуванском диму су присутни никл, хром, кадмијум и арсен, азотни оксиди, ацеталдехиди, формалдехиди, бензопирени, а најпознатији канцерогени из дуванског дима су из групе полицикличних ароматичних хидрокарбона (енгл. polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH) и нитрозамина (нитрозамин 4(метил-нитрозамино) -1-(3 пиридил)-1-бутанон) познати и као никотински-нитрозаминокетон (енгл. nicotine-derived nitrosaminoketone, NNK). Поред NNK познат је и N-нитрозонорникотин (NNN), такође канцероген из дуванског дима. Ово су преканцерогени, а само у одговарајућим метаболичким условима постају канцерогени, уколико савладају детоксификациону баријеру. Индивидуалне разлике произилазе од равнотеже између ова два процеса и у зависности од индивидуалних детоксификационих механизма, ствара се специфична пријемчивост сваког појединца за обољевање од канцера плућа (Hecht, 1999, а, б; Hecht, 2002; Tuczynski, и сар., 2003; Hittelman и сар., 2003).

Обзиром да је EGFR промоторни регион богат GC паровима, а нарочито чињеница из ове студије којом се показало да доминантни хомозиготи GG имају већи ризик за обољевање од канцера плућа, као и то да су заступљенији у популацији од хетерозигота и мутантних хомозигота, постоји могућност интеракције бензопирен диол епоксида и нитрозамина са овим местима и нарушавања нормалне структуре DNA. Јер је показано да нитрозамини и бензопирени стварају DNA адукте, канцерогене метаболите који настају ковалентним везивањем за DNA и то углавном за гуанин или аденин, који доводе до нарушавања нормалне хомеостазе. Бензопирен је један од веома штетних састојака дуванског дима и ковалентно се везује са молекулом DNA нарочито са гуанином у позицији N2, нарушава се нормална структура и ометају се процеси

репликације, и последично долази до мутација које воде у канцерогенезу (**Hecht, 1999, а, б; Hecht, 2002**).

Канцерогени из дуванског дима погађају и бројне онкогене и тумор супресорске гене, али постоје и слободни радикали из дуванског дима који доводе до оксидативних оштећења и до липидне пероксидације, заправо, пресудно је кумулативно дејство услед хроничне изложености овим штетним агенсима (**Hecht, 1999, а, б; Hecht, 2002**). Наспрам ових стоје механизми антиоксидационе заштите и DNA механизми за поправку и у зависности у коју страну се помери равнотежа доћи ће до детоксификације и екскреције продуката и поправке оштећења или пак до мутагенезе и канцерогенезе.

Није у потпуности испитан механизам настанка соматских мутација у туморима, али се претпоставља да је већи утицај етничких него фактора спољашње средине на развој осетљивости за настанак соматских мутација према студији Азијских пацијената који више не живе у својим матичним земљама и који нису имали измене у учесталости мутација (**Liu W и сар., 2011, Tsao и сар., 2006**). Још увек није познато да ли је ово тачно и за полиморфизме, иако постоје евидентне интеретничке разлике у демографским, генетичким и факторима спољашње средине, у одговору на терапију, преживљавање и прогнозу (**Zhou и Christiani, 2011**). Било је примећено да су код Азијских пацијената полиморфизми допринели развоју *EGFR* мутација (**Liu W и сар., 2011**); ипак за овај налаз неопходна је потврда и за друге етничке групе. У складу са јасним интеретничким разликама у фреквенцијама алела за многе функционалне полиморфизме, потенцијални утицај полиморфизама у појави и развоју соматских мутација у NSCLC-у указују да постоји различита етничка предиспозиција за канцер плућа. Тако да није важно трагање за разликама међу етничким групама у расистичкој конотацији, већ трагање за адекватном комбинацијом различитих фактора који су најпоузданији фактори ризика за обољевање од канцера плућа међу различитим етничким групама и даље, чак и између сваког појединца, што имплицира персонализацију терапије.

Иако постоје студије које јасно указују да су SNP-ови предсказатељи ефикасности лечења канцера плућа помоћу EGFR TKI (**Jung и сар. 2012**), има и оних који изражавају сумњу поводом тога (**John и сар., 2009**) указујући на то да су неопходне обимне студије које би потврдиле независан утицај полиморфизама као прогнозера болести, а не као последицу удруженог дејства са другим факторима. Поред тога има заговорника да су за настанак канцера битнији утицаји фактора средине у односу на генетичке (**Weinberg, 2007**), али још увек се

воде полемике око тога који је од њих доминантан. Код непушача се на пример, на канцер плућа гледа као на другачију болест од оне која постоји код пушача у погледу патогенезе, молекуларних измена, одговора на лечење и прогнозу. Непушачи обухватају око једну четвртину оболелих од канцера плућа и код њих је испитано много генетичких, хормоналних, вирусних, фактора средине и других фактора ризика кроз разне етничке групе, али ни један није доминантан (**Lee и сар., 2011**).

Када се појави поуздан и самосталан предсказатељ болести, NSCLC ће вероватно бити излечен. Ипак, тешко је да је један чинилац одговоран за NSCLC канцерогенезу, већ је то вероватно комбинација варијабли која доприноси појави и развоју NSCLC-а, тако да је потрага за том комбинацијом, која вероватно има и етничку позадину, изазов за будуће студије.

Однос између TP53 и EGFR-а

Многе студије су потврдиле да различити мутирани TP53 могу да регулишу експресију гена укључених у прогресији канцера, обухватајући регулацију раста, метаболизма, ангиогенезе, резистенције на лекове и генетичке нестабилности (**Nigro, 2014**). Код канцерозних ћелија губитком активности дивљег TP53 (енгл. wild type tumor protein TP53, wtTP53) долази до акумулације протеинских продуката мутираног TP53 (енгл. mutant, mutTP53). Мутирани TP53 чине хетерогену групу са структурним и функционалним разликама у односу на немутирани TP53 и стварају широк спектар канцерозних фенотипова. У половини тумора постоје мутације самог TP53, и то су углавном „мисенс“ мутације, док у другој половини постоји дивљи TP53, али се поред ових дешавају и генетичке, и епигенетичке промене оних елемената који укључују TP53 одговор и тако доводе до формирања канцерозног фенотипа (**Weisz и сар., 2007; Muller и сар., 2011; Freed-Pastor и Prives, 2012; Nigro, 2014**).

У складу са условима, регулација промотора EGFR-а може да се изврши различитим транскрипционим факторима, односно различитим TP53 облицима (**Abusail и сар., 2013**). Дивљи и мутирани облик TP53 регулишу активацију EGFR промотора преко различитих механизма. Промоторни сегмент -167/-105 EGFR-а има комплексне карактеристике, садржи четири транскрипциона старт места, као и везујуће секвенце за AP2, SP1 и TP53, функционише и као базални промотор и ступа у интеракције са другим факторима основне транскрипционе машинерије. Показано је да дивљи TP53 могу да активирају EGFR везујући се за два усходна места од EGFR промотора између поменутог -167/-105 места и -265/-239 места.

Мутирани TP53 не захтевају ова, већ имају своје везујуће место, а обично су заступљени у већој количини у канцерозним ћелијама што може да доведе до пораста нивоа EGFR-а, односно до хиперпролиферације ћелија или активације других гена који управо подстичу пролиферацију, што води ка онкогеним последицама (**Ludes-Meyers и сар., 1996; Sheikh и сар., 1997**). Код канцера дојки, показано је да мутације TP53 независно од типа и локације, али које се налазе у региону од 5-8 егзона су у вези са појачаном апоптозом (**Ludes-Meyers и сар., 1996; Sheikh и сар., 1997; van Slooten и сар., 1999**). Код свега три пацијента у овој студији су пронађене мутације TP53 у егзонима 5, 6 и 7. У студијама оваквог типа, често је оскудна количина ткива које се добије након биопсије, што може да онемогући даље анализе. Претпоставља се да би са повећањем броја испитаника оболелих од немикроћелијског канцера плућа вероватно био нађен и већи број оних који имају мутације TP53, што би омогућило да се утврди корелација са варијантама гена за рецептор епидермалног фактора раста.

ЗАКЉУЧЦИ:

- Промоторни регион *EGFR-a* има висок GC садржај (75,45%) и као такав, представља тежак задатак за успешну оптимизацију PCR-а.
- Оптимизација PCR услова укључила је одређивање оптималне концентрације $MgCl_2$ (1,5 mM), температуре везивања прајмера (63°C) и прихватљиве концентрације DNA узорка (више од 0,07 $\mu g/ml$ DNA у коначној концентрацији).
- Генотипизација региона богатих GC нуклеотидима, тј. промоторног региона *EGFR-a* код NSCLC-а за детекцију -216G>T и -191C>A SNP-ова употребом PCR-RFLP методе може се побољшати додатком глицерола у коначној концентрацији од 15-20%, 5% DMSO или 1,5M бетаина у одвојеним реакцијама.
- Остали испитивани адитиви, формаид, Tween 20, Triton X-100, PEG и BSA су били неефикасни.
- Начин изолације DNA молекула није утицао на успешност PCR-RFLP амплификације при додатку DMSO, глицерола и бетаина.

- Први пут је приказана дистрибуција генотипова за полиморфизме појединачних нуклеотида: -216G>Т (rs712829), -191C>А (rs712830) и 181946G>А (rs229334) *EGFR*-а, у популацији здравих особа и оболелих од NSCLC-а са територије Републике Србије.
- Утицаји спољашње средине, као што су конзумација дувана и генетичка предиспозиција су потенцијални фактори ризика за смртност од NSCLC-а у популацији испитаника са територије Републике Србије.
- Показано је да је GG генотип *EGFR* полиморфизма -216G/Т (rs712829) био фактор ризика за пушаче да оболе од NSCLC-а, односно да Т алел може да има заштитни ефекат код пушача у популацији испитаника са територије Републике Србије.
- Фреквенције полиморфизама између здравих особа и пацијената тумора плућа се нису битно разликовале.
- Припадници старије популације су чешћи пацијенти тумора плућа.
- Мали број пацијената имао је мутације *TP53* и то у егзонима 5, 6 и 7.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abu Al-Soud W, Radstrom P. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *J Clin Microbiol*, 2000; 38(12):4463-4470.
2. Abusail MS, Dirweesh AM, Salih RA, Gadelkarim AH. Expression of EGFR and p53 in head and neck tumors among Sudanese patients. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013; 14(11): 6415-6418.
3. Akhavan-Niaki H, Samadani AA. DNA Methylation and Cancer Development: Molecular Mechanism. *Cell Biochem Biophys*, 2013; 67(2): 501-513.
4. Amador ML, Oppenheimer D, Perea S, Maitra A, Cusati G, Iacobuzio-Donahue C, Baker SD, Ashfaq R, Takimoto C, Forastiere A, Hidalgo M. An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer Res*, 2004; 64: 9139-9143.
5. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2013. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2013. [цитирано 10.01.2014] Доступно са: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/document/s/document/acspc-036845.pdf>
6. American Joint Committee on Cancer. [Интернет] Приступ: 25.03.2015. <https://cancerstaging.org/references-tools/quickreferences/Pages/default.aspx>
7. Amos CI, Wu X, Broderick P, Gorlov IP, Gu J, Eisen T, Dong Q, Zhang Q, Gu X, Vijayakrishnan J, Sullivan K, Matakidou A, Wang Y, Mills G, Doheny K, Tsai YY, Chen WV, Shete S, Spitz MR, Houlston RS. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet*, 2008; 40(5): 616-622.
8. Andreeff M, Goodrich DW, Pardee AB. Proliferation. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Доступно са: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13035/>
9. Armitage P, Doll R. The Age Distribution of Cancer and a Multi-stage Theory of Carcinogenesis. *British Journal of Cancer*, 1954; 8(1):1-12.
10. Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist* 2002; 7 Suppl 4: 31-39.
11. Asano H, Toyooka S, Tokumo M, Ichimura K, Aoe K, Ito S, Tsukuda K, Ouchida M, Aoe M, Katayama H, Hiraki A, Sugi K, Kiura K, Date H, Shimizu N. Detection of EGFR gene mutation in lung cancer by mutant-enriched polymerase chain reaction assay. *Clin Cancer Res*, 2006; 12:43-48.
12. Bachmann B, Lüke W, Hunsmann G. Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents. *Nucleic Acids Res*, 1990; 18(5):1309.
13. Bachmann HS, Siffert W, Frey UH. Successful amplification of extremely GC-rich promoter regions using a novel 'slowdown PCR' technique. *Pharmacogenetics*, 2003; 13(12): 759-766.
14. Bafico A, Aaronson SA. Classification of Growth Factors and Their Receptors. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer*

- Medicine. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Доступно са: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12423/>
15. Bailey OT, Hawn CV. The effect of crystallized bovine serum albumin on the tissues of normal animals: Morphologic changes in normal rabbits induced by intravenous injection of crystallized bovine serum albumin. *Am J Pathol*, 1943; 19(2): 267-291.
 16. Barros-Núñez P, Rosales-Reynoso MA, Juárez-Vázquez CI. The Classification, Mechanisms of Activation and Roles in Cancer Development of Oncogenes. Chapt. 2; In: *Oncogenes*; (eds) Luciano Torres; 2013: 41-84. ISBN: 978-1-62618-868-6
 17. Bar-Sagi D, Hall A. Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell*, 2000; 103(2):227-238.
 18. Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Kramer A, Tort F, Zieger K, Guldborg P, Sehested M, Nesland JM, Lukas C, Orntoft T, Lukas J, Bartek J. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 2005; 434: 864–870.
 19. Bartlett JMS, Stirling D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *PCR Protocols. Methods in Molecular Biology*, 2003, 226 (2nd ed.), 3–6.
 20. Baskaran N, Kandpal RP, Bhargava AK, Glynn MW, Bale A, Weissman SM. Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content. *Genome research*, 1996; 6(7), 633-638.
 21. Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem*, 1991; 39(3): 351-354.
 22. Bishop, JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 1991; 64: 235-248.
 23. Blake RD, Delcourt SG. Thermodynamic effects of formamide on DNA stability. *Nucleic Acids Res*, 1996; 24(11): 2095-2103.
 24. Blanco D, Vicent S, Fraga MF, Garcia IF, Freire J, Lujambio A, Esteller M, Solorzano Co, Pio R, Lecanda F, Montuenga LM. Molecular Analysis of a Multistep Lung Cancer Model Induced by Chronic Inflammation Reveals Epigenetic Regulation of p16 and Activation of the DNA Damage Response Pathway. *Neoplasia (New York, NY)*. 2007; 9(10): 840-852.
 25. Bookstein R, Lai CC, To H, Lee WH. PCR-based detection of a polymorphic BamHI site in intron 1 of the human retinoblastoma (RB) gene. *Nucleic Acids Res*, 1990; 18(6): 1666.
 26. Boyle P. Cancer, cigarette smoking and premature death in Europe: a review including the Recommendations of European Cancer Experts Consensus Meeting, Helsinki, October 1996. *Lung Cancer*, 1997; 17: 1-60.
 27. Brambilla E, Gazdar A. Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. *Eur Respir J*, 2009; 33(6): 1485-1497.
 28. Brandt B, Meyer-Staekling S, Schmidt H, Agelopoulos K, Buerger H. Mechanisms of *EGFR* gene transcription modulation: relationship to cancer risk and therapy response. *Clin Cancer Res*, 2006; 12: 7252–7260.

29. Broeckel U, Hessner MJ. Single-Nucleotide Polymorphisms. In: Coleman WB, Tsongalis GJ (eds): Molecular diagnostics for the clinical laboratorian, Edition Totowa, New Jersey: Humana Press Inc 2006; 111-120.
30. Brown TA. Genomes. 2nd edition. Oxford: Wiley-Liss; 2002. Chapter 14, Mutation, Repair and Recombination. Доступно са: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21114/>
31. Brutlag D, Schlehuber C, Bonner J. Properties of formaldehyde-treated nucleohistone. *Biochemistry*, 1969; 8(8): 3214-3218.
32. Buerger H, Gebhardt F, Schmidt H, Beckmann A, Hutmacher K, Simon R, Lelle R, Boecker W, Brandt B. Length and loss of heterozygosity of an intron 1 polymorphic sequence of egfr is related to cytogenetic alterations and epithelial growth factor receptor expression. *Cancer Res*, 2000; 60: 854–857.
33. Bui TV, Joshua TM. Мус: Maestro of MicroRNAs. *Genes Cancer*, 2010; 1(6): 568–575.
34. Bull L. Genetics, Mutations, and Polymorphisms. In: Madame Curie Bioscience Database [Интернет]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000. [цитирано 15.08. 2014.] Доступно са: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6475/>
35. Bustin SA: Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*, 2002; 29: 23–39.
36. Cancer registry of central Serbia, Belgrade, 2012. Cancer incidence and mortality in central Serbia 2010. REPORT No. 12, Belgrade 2012; ISBN 86-7358-030-7; Institute of Public Health of Serbia “Dr Milan Jovanovic- Batut” Department for Prevention and Control of Noncommunicable Diseases [цитирано 15.08. 2014.] Доступно са: <http://www.batut.org.rs>
37. Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S. Oncogenes and signal transduction. *Cell*, 1991; 64(2): 281–302
38. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 2002; 296: 1655–1657.
39. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Doglioni C, Sidoni A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA Jr, Varella-Garcia M. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2005; 97: 643–655.
40. Chakrabarti R, Schutt CE. The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides. *Nucleic Acids Res*, 2001; 29(11): 2377-2381.
41. Chan SK, Gullicka WJ, Hill ME. Mutations of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer – Search and destroy. *European Journal Of Cancer*, 2006; (42) 17 – 23.
42. Chaw YF, Crane LE, Lange P, Shapiro R. Isolation and identification of cross-links from formaldehyde-treated nucleic acids. *Biochemistry*, 1980; 19(24): 5525-5531.
43. Chen LL, Clawson ML, Bilgrami S, Carmichael G. A sequence-specific single-stranded DNA-binding protein that is responsive to epidermal growth factor

- recognizes an S1 nuclease-sensitive region in the epidermal growth factor receptor promoter. *Cell Growth Differ*, 1993; (4): 975–983.
44. Chen YJ, Huang X. DNA sequencing by denaturation: Principle and thermodynamic simulations. *Anal Biochem*, 2009; 384:170–179.
 45. Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994; 91(12): 5695-5699.
 46. Cheng YK, Beroukhir R, Levine RL, Mellinghoff IK, Michor F. Reply to Parsons: Many tumor types follow the monoclonal model of tumor initiation. *PNAS*. Letter. 2011; (108):5
 47. Chin TM, Anuar D, Soo R, Salto-Tellez M, Li WQ, Ahmad B, Lee SC, Goh BC, Kawakami K, Segal A, Iacopetta B, Soong R.. Detection of epidermal growth factor receptor variations by partially denaturing HPLC. *Clin Chem*, 2007; 53: 62–70.
 48. Choi JE, Park SH, Kim KM, Lee WK, Kam S, Cha SI, Kim CH, Kang YM, Kim YC, Han SB, Jung TH, Park JY. Polymorphisms in the epidermal growth factor receptor gene and the risk of primary lung cancer: a case-control study. *BMC Cancer*, 2007; 7: 199.
 49. Church D, Sherry S, Phan L, Ward M, Landrum M, Maglott D. Variation Overview. 2013 Nov 14. In: *The NCBI Handbook* [Internet]. 2nd edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2013-. [цитирано 15.08. 2014.] Доступно са: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK169030/>
 50. Cohen V, Agulnik JS, Jarry J, Batist G, Small D, Kreisman H, Tejada NA, Miller WH Jr, Chong G. Evaluation of denaturing high-performance liquid chromatography as a rapid detection method for identification of epidermal growth factor receptor mutations in nonsmall-cell lung cancer. *Cancer*, 2006; 107: 2858–2865.
 51. Coleman WB, Tsongalis GJ. The Polymerase Chain Reaction. In Coleman WB, Tsongalis GJ (eds): *Molecular diagnostics for the clinical laboratorian*, Edition Totowa, New Jersey: Humana Press Inc 2006; 47-56.
 52. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J*, 1992; (11): 1921–1929.
 53. Cox AD, Der CJ. Ras history. The saga continues. *Small GTPases*, 2010; 1(1): 2–27.
 54. Cross M, Dexter TM. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell*, 1991; 64(2): 271-280.
 55. D’Arcangelo M, Cappuzzo F. K-Ras Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer: Prognostic and Predictive Value. *ISRN Molecular Biology*, vol. 2012, Article ID 837306, 8 pages, 2012.
 56. Dahabreh IJ, Linardou H, Kosmidis P, Bafaloukos D, Murray S. EGFR gene copy number as a predictive biomarker for patients receiving tyrosine kinase inhibitor treatment: a systematic review and meta-analysis in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*, 2011; 22(3): 545-552.
 57. Database of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and multiple small-scale variations that include insertions/deletions, microsatellites, and non-

- polymorphic variants. Доступно ca:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>[25.04.2015.]
58. Davis AH, Wang J, Tsang TC, Harris DT. Direct sequencing is more accurate and feasible in detecting single nucleotide polymorphisms than RFLP: using human vascular endothelial growth factor gene as a model. *Biol Res Nurs*, 2007; 9: 170–178.
 59. Demographic Yearbook in the Republic of Serbia, 2013. Belgrade 2014 For publishers: Prof. Dragan Vukmirovic, Ph.D, Director, Published by: Statistical Office of the Republic of Serbia, Belgrade, 5 Milana Rakića St. Statistical office of the Republic of Serbia. ISSN 0084-4357
 60. den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat*. 2000; 15(1): 7-12. Erratum in *Hum Mutat* 2002; 20(5): 403.
 61. Downward J. Targeting RAS and PI3K in lung cancer. *Nature medicine*, 2008; 14(12): 1315-1316.
 62. Dufort S, Richard MJ, Lantuejoul S, de Fraipont F. Pyrosequencing, a method approved to detect the two major EGFR mutations for anti EGFR therapy in NSCLC. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011; 30: 57.
 63. Eberhard DA, Giaccone G, Johnson BE, Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group. Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: standardization for use in the clinical trial setting. *J Clin Oncol*, 2008; 26: 983–994.
 64. Eilbeck K, Lewis SE, Mungall CJ, Yandell M, Stein L, Durbin R, Ashburner M. The Sequence Ontology: A tool for the unification of genome annotations. *Genome Biol*, 2005; 6(5): R44.
 65. Etienne-Grimaldi MC, Pereira S, Magne N, Formento JL, Francoual M, Fontana X, Demard F, Dassonville O, Poissonnet G, Santini J, Bensadoun RJ, Szepietowski P, Milano G. Analysis of the dinucleotide repeat polymorphism in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in head and neck cancer patients. *Ann Oncol* 2005; 16: 934–941.
 66. Farrell EM, Alexandre G. Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. *BMC Res Notes*, 2012; 5: 257.
 67. Fearon ER. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science*, 1997; 278(5340): 1043-1050.
 68. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 2015;136(5):E359-86.
 69. Forbes BA, Hicks KE. Substances interfering with direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by PCR: effects of bovine serum albumin. *J Clin Microbiol*, 1996; 34(9): 2125-2158.
 70. Frackman S, Kobs G, Simpson D, Storts D. Betaine and DMSO: enhancing agents for PCR. *Promega notes*, 1998; (65): 27-29.

71. Frazer K, Murray S, Schor N, Topol E. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet*, 2009; 10: 241-251.
72. Freed-Pastor WA, Prives C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev*, 2012; 26: 1268-1286.
73. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY, Nishiwaki Y, Vansteenkiste J, Kudoh S, Rischin D, Eek R, Horai T, Noda K, Takata I, Smit E, Averbuch S, Macleod A, Feyereislova A, Dong RP, Baselga J. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial). *J Clin Oncol*, 2003; 21: 2237-2246.
74. Ganti AK. Epidermal growth factor receptor signaling in nonsmall cell lung cancer. *Cancer Invest*, 2010; 28(5): 515-525.
75. Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med*, 2009; 60: 167-179.
76. Gebhardt F, Zanker KS, Brandt B. Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J Biol Chem* 1999; 274: 13176-13180.
77. Gibbs RA. DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Anal Chem*, 1990; 62(13): 1202-1214.
78. Gibson GJ, Loddenkemper R, Sibille Y, Lundback B. (Eds.). *The European Lung White Book: Respiratory Health and Disease in Europe*. European Respiratory Society, 2013.
79. Giovannetti E, Erdem L, Olcay E, Leon LG, Peters GJ. Influence of polymorphisms on EGFR targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *Front Biosci*, 2011; 16: 116-130.
80. Giovannetti E, Zucali PA, Peters GJ, Cortesi F, D'Incecco A, Smit EF, Falcone A, Burgers JA, Santoro A, Danesi R, Giaccone G, Tibaldi C. Association of Polymorphisms in AKT1 and EGFR with Clinical Outcome and Toxicity in Non Small Cell Lung Cancer – Patients Treated with Gefitinib. *Mol Cancer Ther*, 2010; 9: 581-593.
81. Glubb DM, Innocenti F. Mechanisms of genetic regulation in gene expression: examples from drug metabolizing enzymes and transporters. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2011; 3(3): 299-313.
82. Goldenberger D, Perschil I, Ritzler M, Altwegg M. A simple "universal" DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. *PCR Methods Appl*, 1995; 4(6): 368-370.
83. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 1999; 286(5439): 531-537.
84. Green DR, Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*, 2009; 458: 1127-1130.
85. Grinstein E, Jundt F, Weinert I, Wernet P, Royer HD. Sp1 as G1 cell cycle phase specific transcription factor in epithelial cells. *Oncogene*, 2002; 21: 1485-1492.

86. Grunenwald H. Optimization of Polymerase Chain Reactions. In Bartlett JMS, Stirling D (eds): Methods in molecular biology. PCR protocols, Edition 2nd. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 2003.
87. Guo H, Xing Y, Liu R, Chen S, Bian X, Wang F, Yang C, Wang X. -216G/T (rs712829), a functional variant of the *EGFR* promoter, is associated with the pleural metastasis of lung adenocarcinoma. *Oncol Lett*, 2013; 6(3): 693–698.
88. Gupta GP, Massagué J. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell*, 2006: 4(17), 679–695.
89. Han B, Zhou X, Zhang RX, Zang WF, Chen ZY, Song HD, Wan HY, Zheng CX. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in NSCLC patients. *Oncol Lett* 2011; 2 (6): 1233-1237.
90. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation *Cell* 2011: 144, (5), 646–674.6
91. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 2000: 100 (1), 57–70. a
92. Harper JW, Adams PD. Cyclin-dependent kinases. *Chemical Reviews*, 2001; 101.8: 2511-2526.
93. Harris, A.L. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*, 2002; 2: 38–47.
94. Hassler MR, Egger G. Epigenomics of cancer - emerging new concepts. *Biochimie* 94, 2012; 2219-2230.
95. He L, He X, Lowe SW, Hannon GJ. microRNAs join the p53 network-another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Cancer*, 2007; 7: 819–822.
96. Health statistical yearbook of Republic of Serbia 2012. Belgrade: Institute of Public Health of Serbia 2013. 535.
97. Hecht SS. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol*, 2002;3(8): 461-469. 6
98. Hecht SS. DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutat Res*, 1999; 424(1-2): 127-142. a
99. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1999; 91(14): 1194-1210. 6
100. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 1996, 6: 986–994.
101. Henke W, Herdel K, Jung K, Schnorr D, Loening SA. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic acids research*, 1997; 25(19): 3957-3958.
102. Herbst RS, Bunn PA Jr. Targeting the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 5813–5824.
103. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, Barón AE, Zeng C, Franklin WA. Epidermal Growth Factor Receptor in Non-Small-Cell Lung Carcinomas: Correlation Between Gene Copy Number and Protein Expression and Impact on Prognosis. *J Clin Oncol*, 2003: 21(20): 3798-3807.
104. Hirsch FR, Varella-Garcia M, McCoy J, West H, Xavier AC, Gumerlock P, Bunn PA Jr, Franklin WA, Crowley J, Gandara DR, Southwest Oncology Group: Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by

- fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol*, 2005; 23: 6838–6845.
105. Hittelman WN, Kurie JM, Swisher SG. Molecular Events in Lung Cancer and Implications for Prevention and Therapy. *Lung Cancer, M.D. Anderson Cancer Care Series*, 2003: 280-298.
 106. Hodoglugil U, Carrillo MW, Hebert JM, Karachaliou N, Rosell RC, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for the epidermal growth factor receptor. *Pharmacogenet Genomics* 2013; 23(11): 636-642.
 107. Hong FD, Huang HJS, Tot H, Young LJS, Oro A, Bookstein R, Lee EYHP, Lee WH. Structure of the human retinoblastoma gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 5502-5506.
 108. Hoque MO, Brait M, Rosenbaum E, Poeta ML, Pal P, Begum S, Dasgupta S, Carvalho AL, Ahrendt SA, Westra WH, Sidransky D. Genetic and epigenetic analysis of ERBB signaling pathway genes in lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2010; 5(12): 1887-1893.
 109. Hou X, Johnson AC, Rosner MR. Identification of an epidermal growth factor receptor transcriptional repressor. *J Biol Chem*, 1994; 269: 4307–4312. 6
 110. Hou X, Johnson AC, Rosner MR. Induction of epidermal growth factor receptor gene transcription by transforming growth factor h1: association with loss of protein binding to a negative regulatory element. *Cell Growth Differ*, 1994; 5: 801–809. a
 111. Hube F, Reverdiau P, Iochmann S, Gruel Y. Improved PCR method for amplification of GC-rich DNA sequences. *Mol Biotechnol* 2005; 31 (1): 81-84.
 112. Hung T, Mak K, Fong K. A specificity enhancer for polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1990; 18(16): 4953.
 113. Ichihara S, Toyooka S, Fujiwara Y, Hotta K, Shigematsu H, Tokumo M, Soh J, Asano H, Ichimura K, Aoe K, Aoe M, Kiura K, Shimizu K, Date H, Shimizu N. The impact of epidermal growth factor receptor gene status on gefitinib-treated Japanese patients with non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer*, 2007; 120(6): 1239-1247.
 114. Innis MA, Gelfand D. Optimization of PCRs. In Innes MA, Gelfand D, Sninsky JJ, White TJ (eds): *PCR protocols. A guide to methods and application.*, Edition San Diego: Academic Press, 1990; 3-13.
 115. Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA: DNA sequencing with *Thermusaquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, 85: 9436–9440.
 116. Institute of Medicine (US) Roundtable on Environmental Health Sciences, Research, and Medicine; Wilson S, Jones L, Couseens C, et al., editors. *Cancer and the Environment: Gene-Environment Interaction*. Washington (DC): National Academies Press (US); 2002. 3, The Links Between Environmental Factors, Genetics, and the Development of Cancer. Доступно за: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK220897/>

117. International Agency for Research on Cancer. [Интернет]. [цитирано 15.09.2014]. Доступно са: <http://p53.iarc.fr/DevelopmentHistory.aspx>
118. International HapMap Project. [Интернет]. [цитирано 15.09.2014.]. Доступно са: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>
119. Irigaray P, Newby JA, Clapp R, Hardell L, Howard V, Montagnier L, Epstein S, Belpomme D. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. *Biomed Pharmacother*, 2007; 61(10): 640-658.
120. Ishii S, Xu YH, Stratton RH, Roe BA, Merlino GT, Pastan I. Characterization and sequence of the promoter region of the human epidermal growth factor receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985; 82(15): 4920-4924.
121. Iwakawa R, Kohno T, Anami Y, Noguchi M, Suzuki K, Yoshimura M, Mishima K, Nishikawa R, Tashiro F, Yokota J. Association of p16 Homozygous Deletions with Clinicopathologic Characteristics and EGFR/KRAS/p53 Mutations in Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 2008; 14: 3746.
122. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 2003; (33), 245-254.
123. Jänne PA, Borrás AM, Kuang Y, Rogers AM, Joshi VA, Liyanage H, Lindeman N, Lee JC, Halmos B, Maher EA, Distel RJ, Meyerson M, Johnson BE: A rapid and sensitive enzymatic method for epidermal growth factor receptor mutation screening. *Clin Cancer Res*, 2006; 12: 751-758.
124. Jensen MA, Fukushima M, Davis RW. DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis. *PLoS One*, 2010; 5(6): e11024.
125. Jenuwein T, Allis CD. Translating the Histone Code. *Science*, 2001; 293(5532): 1074-1080.
126. John T, Liu G, Tsao MS. Overview of molecular testing in non-small-cell lung cancer: mutational analysis, gene copy number, protein expression and other biomarkers of EGFR for the prediction of response to tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*, 2009; 28 (1): S14-23.
127. Johnson AC, Ishii S, Jinno Y, Pastan I, Merlino GT. Epidermal growth factor receptor gene promoter. Deletion analysis and identification of nuclear protein binding sites. *J Biol Chem*, 1988; 263: 5693-5699.
128. Jung M, Cho BC, Lee CH, Park HS, Kang YA, Kim SK, Chang J, Kim DJ, Rha SY, Kim JH, Lee JH. EGFR polymorphism as a predictor of clinical outcome in advanced lung cancer patients treated with EGFR-TKI. *Yonsei Med J*, 2012; 53(6): 1128-1135.
129. Jurisic V, Srdic-Rajic T, Konjevic G, Bogdanovic G, Colic M. TNF- α induced apoptosis is accompanied with rapid CD30 and slower CD45 shedding from K-562 cells. *J Membr Biol*, 2011; 239(3): 115-122.
130. Jurišić V, Bogdanović G, Srdić T, Jakimov D, Mrdjanović J, Baltić M, Baltić VV. Modulation of TNF-alpha activity in tumor PC cells using anti-CD45 and anti-CD95 monoclonal antibodies. *Cancer Lett*, 2004; 214(1): 55-61.

131. Jurišić V, Obradović J. Amplification of single nucleotide polymorphisms of the EGFR gene promoter sequence in NSCLC patients. P3.03-P3.03, WIN2014, Winning combination for precise cancer medicine (M31), WIN Consortium, 11, *in press*. France, 23.06.2014.- 24.06.2014. 6
132. Jurišić V, Obradović J. Effects of different additives for detection of single nucleotide polymorphisms in promoter sequence EGFR gene in NSCLC (Meeting Abstract). *European Journal Of Cancer*, (2014), vol. 50, S91-S91. Germany, 05.07.2014.- 08.07.2014. a
133. Jurišić V, Živančević Simonović S. Opšta patološka fiziologija: Poglavlje 11: Etiologija i patogeneza nastanka tumora. 2002, 464-483. Medicinski fakultet, Kragujevac, ISBN 86-82477-65
134. Kageyama R, Merlino GT, Pastan I. A transcription factor active on the epidermal growth factor receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988; 85: 5016–5020. 6.
135. Kageyama R, Merlino GT, Pastan I. Epidermal growth factor (EGF) receptor gene transcription: requirement for Sp1 and an EGF receptor-specific factor. *J Biol Chem*, 1988; 263: 632936. a.
136. Kageyama R, Merlino GT, Pastan I. Nuclear factor ETF specifically stimulates transcription from promoter without a TATA box. *J Biol Chem*, 1989; 264: 15508–15514. B
137. Kahn SM, Jiang W, Culbertson TA, Weinstein IB, Williams GM, Tomita N, Ronai Z: Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant K-ras genes via 'enriched' PCR amplification. *Oncogene*, 1991; 6: 1079–1083.
138. Kang J, Lee MS, Gorenstein DG. The enhancement of PCR amplification of a random sequence DNA library by DMSO and betaine: application to in vitro combinatorial selection of aptamers. *J Biochem Biophys Methods*, 2005; 64 (2): 147-151.
139. Karan-Djurasevic T, Palibrk V, Zukic B, Spasovski V, Glumac I, Colovic M, Colovic N, Jurisic V, Scorilas A, Pavlovic S, Tosic N. Expression of Bcl2L12 in chronic lymphocytic leukemia patients: association with clinical and molecular prognostic markers. *Med Oncol*, 2013; 30(1): 405.
140. Keedy VL, Temin S, Somerfield MR, Beasley MB, Johnson DH, McShane LM, Milton DT, Strawn JR, Wakelee HA, Giaccone G. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: epidermal growth factor receptor (EGFR) Mutation testing for patients with advanced non-small-cell lung cancer considering first-line EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy. *J Clin Oncol*, 2011; 29(15): 2121-2127.
141. Kerr KM. Classification of Lung Cancer: Proposals for Change? *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2012; 136(10):1190-1193.
142. Khidr L, Chen PL. RB, the conductor that orchestrates life, death and differentiation. *Oncogene*, 2006; 25, 5210–5219.
143. Kiefer PE, Bepler G, Kubasch M, Havemann K. Amplification and expression of protooncogenes in human small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res*, 1987; 47: 6236

144. Kim L, Liu G, Tsao MS. Predictive Tumor Biomarkers for EGFR Inhibitors. Lung Cancer, Fourth Edition. Eds. Roth JA, Hong WK, Komaki RU. 2014:435-453
145. King CR, Kraus MH, Williams LT, Merlino GT, Pastan IH, Aaronson SA. Human tumor cell lines with EGF receptor gene amplification in the absence of aberrant sized mRNAs. Nucleic Acids Res, 1985; 13(23): 8477–8486
146. Kitts A, Sherry S. The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) of Nucleotide Sequence Variation. 2002 Oct 9 [Updated 2011 Feb 2]. In: McEntyre J, Ostell J, editors. The NCBI Handbook [Интернет]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2002-. Chapter 5. Доступно са: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21088/>
147. Kolmodin LA, Birch DE. Polymerase chain reaction. Basic principles and routine practice. Methods Mol Biol, 2002; (192): 3-18.
148. Kondo Y, Issa JPJ. DNA methylation profiling in cancer. Expert reviews in molecular medicine, 2010; 12: e23.
149. Konjević G, Radenković S, Vuletić A, Mirjačić Martinović K, Srdić T, Jurišić V. STAT Transcription Factors in Tumor Development and Targeted Therapy of Malignancies (2013). STAT Transcription Factors in Tumor Development and Targeted Therapy of Malignancies, Oncogene and Cancer - From Bench to Clinic, Dr. Yahwardiah Siregar (Ed.), ISBN: 978-953-51-0858-0, InTech, DOI: 10,5772/54893. Доступно са: <http://www.intechopen.com/books/oncogene-and-cancer-from-bench-to-clinic/stat-transcription-factors-in-tumor-development-and-targeted-therapy-of-malignancies>
150. Korpanty GJ, Graham DM, Vincent MD, Leighl NB. Biomarkers That Currently Affect Clinical Practice in Lung Cancer: EGFR, ALK, MET, ROS-1, and KRAS. Frontiers in Oncology, 2014; 4: 204.
151. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T: Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. Cancer Res, 2004; 64: 8919–8923.
152. Kotsakis A, Georgoulas V. Targeting epidermal growth factor receptor in the treatment of non-small-cell lung cancer. Expert Opin Pharmacother, 2010; 11 (14): 2363-2389.
153. Kovarova M, Draber P. New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions. Nucleic Acids Res, 2000; 28(13): E70.
154. Kramer MF, Coen DM. Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization. Curr Protoc Mol Biol, 2001; Chapter 15. Unit 15 1.
155. Krauss G. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation, Second Edition. 2001. DOI: 10,1002/3527600051
156. Kreader CA. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. Appl Environ Microbiol, 1996; 62(3): 1102–1106.
157. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, Lynch Jr TJ, Prager D, Belani CP, Schiller JH, Kelly K, Spiridonidis H, Sandler A, Albain KS, Cella D, Wolf MK, Averbuch SD, Ochs JJ, Kay AC. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. JAMA, 2003; 290: 2149–2158.

158. Kwok PY, Chen X. Detection of single nucleotide polymorphisms. *Curr Issues Mol Biol*, 2003; 5(2): 43-60.
159. Lajin B, Alachkar A, Sakur AA. Betaine significantly improves multiplex tetra-primer ARMS-PCR methods. *Molecular biotechnology*, 2013; 54(3): 977-982.
160. Lander ES, (48 researchers). International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409 (6822): 860-921.
161. Lee CH, Mizusawa H, Kakefuda T. Unwinding of double-stranded DNA helix by dehydration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981; 78(5): 2838-2842.
162. Lee J, Mehta K, Blick MB, Gutterman JU, Lopez-Berestein G. Expression of c-fos, c-myc, and c-myc in human monocytes: correlation with monocytic differentiation. *Blood*, 1987; 69(5): 1542-1545.
163. Lee YJ, Kim JH, Kim SK, Ha SJ, Mok TS, Mitsudomi T, Cho BC. Lung cancer in never smokers: change of a mindset in the molecular era. *Lung Cancer*, 2011; 72(1): 9-15.
164. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annual review of pathology*. 2009; 4: 199-227.
165. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 2010; 141(7): 1117-1134.
166. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 1998; (396): 643-649
167. Ling WH, Lee SC. Inter-ethnic differences-how important is it in cancer treatment? *Ann Acad Med Singapore*, 2011; 40(8): 356-361.
168. Liu G, Gurubhagavatula S, Zhou W, Wang Z, Yeap BY, Asomaning K, Su L, Heist R, Lynch TJ, Christiani DC. Epidermal growth factor receptor polymorphisms and clinical outcomes in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Pharmacogenomics J*, 2008; 8(2): 129-138.
169. Liu W, He L, Ramirez J, Krishnaswamy S, Kanteti R, Wang YC, Salgia R, Ratain MJ. Functional EGFR germline polymorphisms may confer risk for EGFR somatic mutations in non-small cell lung cancer, with a predominant effect on exon 19 microdeletions. *Cancer Res*, 2011; 71(7): 2423-2427
170. Liu W, Innocenti F, Chen P, Das S, Cook Jr EH, Ratain MJ. Interethnic difference in the allelic distribution of human epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism. *Clin Cancer Res*, 2003; 9: 1009-1012.
171. Liu W, Innocenti F, Wu MH, Desai AA, Dolan ME, Cook EH Jr, Ratain MJ. A functional common polymorphism in a Sp1 recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter. *Cancer Res*, 2005; 65 (1): 46-53.
172. Liu W, Smith DI, Rehtzige KJ, Thibodeau SN, James CD. Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) used in the detection of germline and somatic mutations. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26: 1396-1400.
173. Liu W, Wu X, Zhang W, Montenegro RC, Fackenthal DL, Spitz JA, Huff LM, Innocenti F, Das S, Cook EH Jr, Cox NJ, Bates SE, Ratain MJ. Relationship of EGFR mutations, expression, amplification, and polymorphisms to epidermal growth

- factor receptor inhibitors in the NCI60 cell lines. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(22 Pt 1): 6788–6795.
174. Lo YMD, Chan KCA. Introduction to the polymerase chain reaction. In Lo YMD, Chiu RWK, Chan KCA (eds): *Clinical applications of PCR*, Edition 2nd. Totowa, New Jersey: Humana Press 2006.
 175. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 20,1, Overview of Extracellular Signaling. Доступно са: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21517/a>
 176. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 20.4, Receptor Tyrosine Kinases and Ras. Доступно са: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21720/6>
 177. Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res*, 1991; 51(12): 3075-3079.
 178. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 2004; (432) 307-315.
 179. Ludes-Meyers JH, Subler MA, Shivakumar CV, Munoz RM, Jiang P, Bigger JE, Brown DR, Deb SP, Deb S. Transcriptional activation of the human epidermal growth factor receptor promoter by human p53. *Mol Cell Biol*, 1996; 16: 6009–6019.
 180. Luscher B, Eisenman RN. New light on Myc and Myb. Part I. *Myc Genes&Development*, 1990; 4: 2025-2035.
 181. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, 2004; 350(21): 2129–2139.
 182. Ma F, Sun T, Shi Y, Yu D, Tan W, Yang M, Wu C, Chu D, Sun Y, Xu B, Lin D. Polymorphisms of EGFR predict clinical outcome in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with Gefitinib. *Lung Cancer*, 2009; 66(1): 114-119.
 183. Ma Q, Lu AY. Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and individualized medicine. *Pharmacol Rev*, 2011; 63(2): 437-459.
 184. Maekawa T, Imamoto F, Merlino GT, Pastan I, Ishii S. Cooperative function of two separate enhancers of the human epidermal growth factor receptor proto-oncogene. *J Biol Chem*, 1989; 264: 5488–5494.
 185. Magdeldin S, Yamamoto T. Toward deciphering proteomes of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. *Proteomics*, 2012; 12(7): 1045-1058.
 186. Mamedov TG, Pienaar E, Whitney SE, TerMaat JR, Carvill G, Goliath R, Subramanian A, Viljoen HJ. A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. *Comput Biol Chem*, 2008; 32(6): 452-457.
 187. Marchetti A, Martella C, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, Chella A, Campese PP, Iarussi T, Mucilli F, Mezzetti A, Cuccurullo F, Sacco R, Buttitta F: EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases

- and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol*, 2005; 23: 857–865.
188. Maston GA, Evans SK, Green MR. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2006; 7: 29-59.
 189. McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP A, Hirschhorn JN. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nature Rev Genet*, 2008; 9: 356–369.
 190. McCormick F. Signalling networks that cause cancer. *Trends in Cell Biology* 1999; 9 (12, 1): M53–M56.
 191. McCormick. Cancer Therapy Based on Oncogene Addiction. *Journal of Surgical Oncology* 2011; 103: 464–467
 192. McDowell DG, Burns NA, Parkes HC. Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. *Nucleic Acids Res*, 1998; 26 (14): 3340-3347.
 193. McInerney JM, Wilson MA, Strand KJ, Chrysogelos SA. A strong intronic enhancer element of the EGFR gene is preferentially active in high EGFR expressing breast cancer cells. *J Cell Biochem*, 2001; 80: 538–549.
 194. Mellstedt H, Vansteenkiste J, Thatcher N. Vaccines for the treatment of non-small cell lung cancer: investigational approaches and clinical experience. *Lung Cancer*, 2011, 73.1: 11-17.
 195. Meltzer SJ, ed. PCR in Bioanalysis. Vol. 92. Springer Science & Business Media, 1998.
 196. Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene*, 2000; 19(56): 6550-6565.
 197. Merlino GT, Ishii S, Whang-Peng J, Knutsen T, Xu YH, Clark AJ, Stratton RH, Wilson RK, Ma DP, Roe BA, Hunts JH, Shimizu N, Pastan I. Structure and localization of genes encoding aberrant and normal epidermal growth factor receptor RNAs from A431 human carcinoma cells. *Mol Cell Biol*, 1985; 5: 1722–1734. a
 198. Merlino GT, Xu YH, Richert N, Clark AJ, Ishii S, Banks-Schlegel S, Pastan I.. Elevated epidermal growth factor receptor gene copy number and expression in a squamous carcinoma cell line. *J Clin Invest*, 1985; 75: 1077–1079. 6.
 199. Miller MC, Cunningham L. Introduction to polymerase chain reaction. *Methods Mol Med*, 1999; 22: 1-25.
 200. Miller YE. Pathogenesis of lung cancer: 100 year report. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005; 33(3): 216-223.
 201. Mirmomeni MH, Sajjadi Majd S, Sisakhtnezhad S, Doranegard F. Comparison of the three methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues. *Journal of Biological Sciences*, 2010; (10): 261-266. Mishra PJ. MicroRNAs as promising biomarkers in cancer diagnostics. *Biomarker Research*, 2014; 2: 19
 202. Muller PAJ, Vousden KH, Norman JC. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol*, 2011; 192(2): 209–218.

203. Mullis K. Nobel Lecture, December 8, 1993; Доступно са: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html
204. Musso M, Bocciardi R, Parodi S, Ravazzolo R, Ceccherini I. Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences. *J Mol Diagn*, 2006; 8(5): 544-550.
205. Myers TW, Gelfand DH: Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry*, 1991; 30: 7661–7666.
206. Mytelka DS, Chamberlin MJ. Analysis and suppression of DNA polymerase pauses associated with a trinucleotide consensus. *Nucleic acids research*, 1996; 24(14): 2774-2781.
207. Nagai M, Yoshida A, Sato N. Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol, and glycerol on PCR. *Biochem Mol Biol Int*, 1998; 44(1): 157-163.
208. Nagai Y, Miyazawa H, Huqun X, Tanaka T, Udagawa K, Kato M, Fukuyama S, Yokote A, Kobayashi K, Kanazawa M, Hagiwara K: Genetic heterogeneity of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cell lines revealed by a rapid and sensitive detection system, the peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR clamp. *Cancer Res*, 2005; 65: 7276–7282.
209. Nakamura H, Mochizuki A, Shinmyo T, Ando K, Kurimoto N, Yokote K, Takagi M: Immunohistochemical detection of mutated epidermal growth factor receptors in pulmonary adenocarcinoma. *Anticancer Res*, 2010; 30: 5233–5237.
210. National Cancer Institute, "Cancer Staging", Accessed 20.03. 2015. [<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/staging>] [Интернет]б
211. National Cancer Institute, "Tumor Grade", Accessed 20.03. 2015. [<http://www.cancer.gov/cancertopics/diagnosis-staging/prognosis/tumor-grade-fact-sheet>] [Интернет]а
212. NIEHS SNPs. NIEHS Environmental Genome Project, University of Washington, Seattle, WA (URL: <http://egp.gs.washington.edu>) [25.04.2015] [Интернет].
213. Nigro CL. New Insights into P53 Signalling and Cancer: Implications for Cancer Therapy. *Journal of Tumor*, 2014; 2(1): 73-81
214. Nilsson JA, Cleveland JL. Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene*, 2003; 22: 9007–9021.
215. Nishi H, Nishi KH, Johnson AC. Early growth response-1 gene mediates up-regulation of epidermal growth factor receptor expression during hypoxia. *Cancer Res*, 2002; 62: 827–834.
216. Nishi H, Senoo M, Nishi KH, Murphy B, Rikiyama T, Matsumura Y, Habu S, Johnson AC. p53 Homologue p63 represses epidermal growth factor receptor expression. *J Biol Chem*, 2001; 276: 41717–41724.
217. Nomura M, Shigematsu H, Li L, Suzuki M, Takahashi T, Estess P, Siegelman M, Feng Z, Kato H, Marchetti A, Shay JW, Spitz MR, Wistuba II, Minna JD, Gazdar AF. Polymorphisms, mutations, and amplification of the EGFR gene in non-small cell lung cancers. *PLoS Med*, 2007, 4:e125.

218. Nussbaum R, McInnes RR., Willard HF. Thompson & Thompson genetics in medicine. Elsevier Health Sciences, 2007.
219. Nyati MK, Morgan MA, Feng FY, Lawrence TS. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 2006; 6(11): 876-885.
220. Obradovic J, Jurisic V, Tosic N, Mrdjanovic J, Perin B, Pavlovic S, Djordjevic N. Optimization of PCR conditions for amplification of GC-rich EGFR promoter sequence. *JCLA* 2013; 27(6): 487–493.
221. Obradovic J, Jurisic V. Evaluation of current methods to detect the mutations of epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer patients. *Multidiscip Respir Med*. 2012; 7(1): 52.
222. Ocak S, Sos ML, Thomas RK, Massion PP. High-throughput molecular analysis in lung cancer: insights into biology and potential clinical applications. *Eur Respir J*, 2009; 34: 489–506.
223. Ohler LD, Rose EA. Optimization of long-distance PCR using a transposon-based model system. *PCR Methods Appl*, 1992; 2(1): 51-59.
224. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), {21.08. 2014}. World Wide Web URL: <http://omim.org/>
225. Onn A, Correa AM, Gilcrease M, Isobe T, Massarelli E, Bucana CD, O'Reilly MS, Hong WK, Fidler IJ, Putnam JB, Herbst RS. Synchronous overexpression of epidermal growth factor receptor and HER2-neu protein is a predictor of poor outcome in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2004; 10:136–143.
226. Oxnard GR, Arcila ME, Sima CS, Riely GJ, Chmielecki J, Kris MG, Pao W, Ladanyi M, Miller VA. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation. *Clin Cancer Res*, 2011; 17(6): 1616–1622.
227. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 2004; 304: 1497–1500.
228. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 13306–13311.
229. Pao W. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS medicine*, 2005; 2.1: e17.
230. Parsons BL. Monoclonal tumor origin is an underlying misconception of the RESIC approach. *Letter. PNAS*, 2011; (108): 5.
231. Passarge E. *Color Atlas of Genetics*. Second edition 2001 Thieme, ISBN 3131003626–ISBN 0-86577-958-9

232. PDQ Cancer Information Summaries [Интернет]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-. Non-Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version. [Updated 2014 Aug 6]. [цитирано 15.09.2014.] Доступно са: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65865/>
233. Pelengaris S, Khan M, Evan G. c-мус: more than just a matter of life and death. *Nature Reviews Cancer*, 2002; 2 (10) 764: 13.
234. Persing DH, Polymerase Chain Reaction. *Trenches to Benches. Journal of clinical microbiology*, 1991; 1281-1285.
235. Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature*, 2001; (411): 390-395.
236. Pirker R, Filipits M. Monoclonal antibodies against EGFR in non-small cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2011; 80(1): 1-9.
237. Popović B, Jekić B, Novaković I, Luković LJ, Teravcević Z, Jurisić V, Vukadinović M, Milasin J. *Ann N Y Acad Sci*, 2007; 1095: 19-25. Vcl-2 expression in oral squamous cell carcinoma. *Ann N Y Acad Sci*, 2007; 1095: 19-25.
238. Powledge TM: The polymerase chain reaction. *Adv Physiol Educ*, 2004; 28: 44–50.
239. Pratyush DD, Tiwari S, Kumar A, Singh SK. A new approach to touch down method using betaine as co-solvent for increased specificity and intensity of GC rich gene amplification. *Gene*, 2012; 497(2): 269-272.
240. PubChem, Open Chemistry Database. [Интернет] (Доступно са: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/glycerol#section=Top>), цитирано: 15.03.2015. а
241. PubChem, Open Chemistry Database. [Интернет] (Доступно са: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/247>) цитирано: 15.03.2015. б
242. PubChem, Open Chemistry Database. [Интернет] (Доступно са: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/713>) цитирано: 15.03.2015. в
243. PubChem, Open Chemistry Database. [Интернет] (Доступно са: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/443314#section=Classification>), цитирано: 15.03.2015. г
244. PubChem, Open Chemistry Database. [Интернет] (Доступно са: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5590>), цитирано: 15.03.2015. д
245. PubChem, Open Chemistry Database. [Интернет] (Доступно са: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5327147#section=Top>), цитирано: 15.03.2015. њ
246. PureLink Genomic Lysis/Bind Buffer: Material Safety Data Sheet [Интернет]. Life Technologies. 2013 Jul 23 [цитирано 01.05.2014.]. Доступно са: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/msds/2013/467581_MTR-NALT_EN.pdf.
247. Quesnelle KM, Boehm AL, Grandis JR. STAT-Mediated EGFR Signaling in Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2007; 102: 311–319.
248. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 2005, 42: 405–426.

249. Rapp UR, Korn C, Ceteci F, Karreman C, Luetkenhaus K, Serafin V, Zanucco E, Castro I, Potapenko T. Myc Is a Metastasis Gene for Non-Small-Cell Lung Cance. PLoS ONE, 2009; 4(6): 1-16.
250. Reed AL, Yamazaki H, Kaufman JD, Rubinstein Y, Murphy B, Johnson AC. Molecular cloning and characterization of a transcription regulator with homology to GC-binding factor. J Biol Chem, 1998; 273: 21594–21602.
251. Rees WA, Yager TD, Korte J, Von Hippel PH. Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. Biochemistry, 1993; 32(1), 137-144.
252. Reiter JL, Threadgill DW, Eley GD, Strunk KE, Danielsen AJ, Sinclair CS, Pearsall RS, Green PJ, Yee D, Lampland AL, Balasubramaniam S, Crossley TD, Magnuson TR, James CD, Maihle NJ. Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. Genomics, 71: 1-20, 2001. Note: Erratum: Genomics 96: 128 only, 2010.
253. Rho O, Kim D J, Kiguchi K, DiGiovanni J. Growth factor signaling pathways as targets for prevention of epithelial carcinogenesis. Mol Carcinog, 2011; (50): 264–279.
254. Rice JC, Allis CD. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. Curr Opin Cell Biol, 2001; 13: 263–273.
255. Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. Anal Biochem, 1996; 242: 84–89.
256. Roux KH. Optimization and troubleshooting in PCR. Cold Spring Harb Protoc, 2009; (4): pdb ip66.
257. Rudin CM, Liu W, Desai A, Karrison T, Jiang X, Janisch L, Das S, Ramirez J, Poonkuzhali B, Schuetz E, Fackenthal DL, Chen P, Armstrong DK, Brahmer JR, Fleming GF, Vokes EE, Carducci MA, Ratain MJ. Pharmacogenomic and pharmacokinetic determinants of erlotinib toxicity. J Clin Oncol, 2008; 26(7): 1119-1127.
258. Ruoslahti E. How cancer spreads. Sci Am, 1996; 275(3): 72-77.
259. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. Nucleic Acids Res. 1990; 18(21): 6409-6412.
260. Sahdev S, Saini S, Tiwari P, Saxena S, Singh Saini K. Amplification of GC-rich genes by following a combination strategy of primer design, enhancers and modified PCR cycle conditions. Mol Cell Probes, 2007; 21(4): 303-307.
261. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, 1977. Proc Natl Acad Sci USA, 1977; 74 –5467.
262. Sarkar G, Kapelner S, Sommer SS. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. Nucleic Acids Res, 1990; 18(24): 7465.
263. Sasaki H, Endo K, Konishi A, Takada M, Kawahara M, Iuchi K, Matsumura A, Okumura M, Tanaka H, Kawaguchi T, Shimizu T, Takeuchi H, Yano M, Fukai I, Fujii

- Y. EGFR Mutation status in Japanese lung cancer patients: genotyping analysis using Light Cycler. *Clin Cancer Res*, 2005; 11: 2924–2929.
264. Sasco AJ, Secretan MB, Straif K. Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer*, 2004; 45 (2): S3-9.
265. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV, Gottesman MM. Silent polymorphisms speak: how they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer. *Cancer Res*, 2007; 67: 9609–9612.
266. Scagliotti GV, Selvaggi G, Novello S, Hirsch FR. The biology of epidermal growth factor receptor in lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2004; 10: 4227s–4232s.
267. Schulz, WA. *Molecular biology of human cancers: an advanced student's textbook*. Springer Science & Business Media, 2005.
268. SEER Training Modules, Cancer Classification. U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute. [Интернет] [цитирано:20.03.2015]. Доступно ca: <http://training.seer.cancer.gov/>
269. Segatto O, Anastasi S, Alema S. Regulation of epidermal growth factor receptor signalling by inducible feedback inhibitors. *J Cell Sci*, 2011;124(11): 1785-1793.
270. Selvaggi G, Novello S, Torri V, Leonardo E, De Giuli P, Borasio P, Mossetti C, Ardisson F, Lausi P, Scagliotti GV. Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*, 2004; 15: 28–32.
271. Shahriar M, Haque R, Kabir S, Dewan I, Bhuyian MA. Effect of proteinase-K on genomic DNA extraction from gram-positive strains. *S J Pharm Sci*, 2011; 4(1): 53-57.
272. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*, 2007; 7: 169–181.
273. Sheikh MS, Carrier F, Johnson AC, Ogdon SE, Fornace AJ. Identification of an additional p53-responsive site in the human epidermal growth factor receptor gene promoter. *Oncogene*, 1997; 15(9): 1095-1101.
274. Shendure J, Mitra RD, Varma C, Church GM. Advanced sequencing technologies: methods and goals. *Nat Rev Genet*, 2004; 5: 335–344.
275. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development*, 1999; 13.12: 1501-1512.
276. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*, 2001; 29(1): 308-311.
277. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Feng Z, Roth JA, Herz J, Minna JD, Gazdar AF. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst*, 2005; 97(5): 339-346.
278. Sholl LM, John Iafrate A, Chou YP, Wu MT, Goan YG, Su L, Huang YT, Christiani DC, Chirieac LR. Validation of chromogenic in situ hybridization for

- detection of EGFR copy number amplification in nonsmall cell lung carcinoma. *Mod Pathol* 2007; 20: 1028–1035.
279. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. *Cancer Statistics, 2014*. *CA Cancer J Clin* 2014; 64: 9–29
280. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. *Cancer statistics, 2013*. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2013; 63: 11–30.
281. Spasovski V, Tosic N, Nikcevic G, Stojiljkovic M, Zukic B, Radmilovic M, Karan-Djurasevic T, Srzentic S, Colovic M, Pavlovic S. The influence of novel transcriptional regulatory element in intron 14 on the expression of Janus kinase 2 gene in myeloproliferative neoplasms. *J Appl Genet*, 2013; 54(1): 21-26.
282. Spira A, Ettinger DS. Multidisciplinary management of lung cancer. *N Engl J Med*, 2004; 350(4): 379-392.
283. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*. 2nd edition. New York: Wiley-Liss; 1999. Chapter 6, PCR, DNA sequencing and in vitro mutagenesis. Доступно са: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7571/>
284. Sugimoto K, Makihara T, Saito A, Ohishi N, Nagase T, Takai D. Betaine improved restriction digestion. *Biochemical and biophysical research communications*, 2005; 337(4), 1027-1029.
285. Sui X, Kong N, Zhu M, Wang X, Lou F, Han W, Pan H. Cotargeting EGFR and autophagy signaling: A novel therapeutic strategy for non-small-cell lung cancer. *Mol Clin Oncol* 2014; 2(1): 8-12.
286. Sweetman S (ed) *Martindale: The complete drug reference* 36. Pharmaceutical Press; 2009.
287. Szumiel I. Epidermal growth factor receptor and DNA double strand break repair: the cell's self-defence. *Cellular signaling* 2006, 18(10): 1537-1548.
288. *Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labels [Интернет]*. The Food and Drug Administration; [updated 2012 Dec 13, цитирано 02.04.2015]. Доступно са: <http://www.fda.gov/drugs/scienceresearch/researchareas/pharmacogenetics/ucm083378.htm>
289. Taga M, Eguchi H, Shinohara T, Takahashi K, Ito R, Yasui W, Nakachi K, Kusunoki Y, Hamatani K. Improved PCR amplification for molecular analysis using DNA from long-term preserved formalin-fixed, paraffin-embedded lung cancer tissue specimens. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013; 6(1): 76-79.
290. Tao J, Zhao X, Tao J. c-MYC-miRNA circuitry. *Cell Cycle*, 2014; 13(2): 191-198.
291. Toyooka S, Matsuo K, Shigematsu H, Kosaka T, Tokumo M, Yatabe Y, Ichihara S, Inukai M, Suehisa H, Soh J, Kiura K, Fong KM, Lee H, Wistuba II, Gazdar AF, Mitsudomi T, Date H. The impact of sex and smoking status on the mutational spectrum of epidermal growth factor receptor gene in non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2007; 13(19): 5763-5768.
292. Toyooka S, Tsukuda K, Ouchida M, Tanino M, Inaki Y, Kobayashi K, Yano M, Soh J, Kobatake T, Shimizu N, Shimizu K: Detection of codon 61 point mutations of

- the K-ras gene in lung and colorectal cancers by enriched PCR. *Oncol Rep*, 2003; 10: 1455–1459.
293. Tsao AS, Tang XM, Sabloff B, Xiao L, Shigematsu H, Roth J, Spitz M, Hong WK, Gazdar A, Wistuba I. Clinicopathologic characteristics of the EGFR gene mutation in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2006; 1(3): 231-239.
294. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CO, Kamel-Reid S, Squire J, Lorimer I, Zhang T, Liu N, Daneshmand M, Marrano P, da Cunha Santos G, Lagarde A, Richardson F, Seymour L, Whitehead M, Ding K, Pater J, Shepherd FA. Erlotinib in lung cancer – molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med*, 2005; 353: 133–144.
295. Turner BM. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays*, 2000; 22(9): 836-845.
296. Tyczynski JE, Bray F, Parkin DM. Lung cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention, and early detection. *Lancet Oncol*, 2003; 4(1): 45-55.
297. Usdin K, Woodford KJ. CGG repeats associated with DNA instability and chromosome fragility form structures that block DNA synthesis in vitro. *Nucleic Acids Res*, 1995; 23(20): 4202-4209.
298. Valasek MA, Repa JJ: The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 2005, 29:151–159.
299. van Slooten HJ, van De Vijver MJ, Borresen AL, Eyfjörd JE, Valgardsdóttir R, Scherneck S, Nesland JM, Devilee P, Cornelisse CJ, van Dierendonck JH. Mutations in exons 5–8 of the *p53* gene, independent of their type and location, are associated with increased apoptosis and mitosis in invasive breast carcinoma. *J Pathol*, 1999; 189(4): 504–513.
300. Vaporciyan AA, Kies MS, Stevens CW, Komaki R, Roth JA. Molecular pathogenesis. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Доступно са: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13751/>
301. Varadaraj K, Skinner DM. Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a GC-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene*, 1994; 140 (1): 1–5.
302. Varella-Garcia M: Stratification of non-small cell lung cancer patients for therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors: the EGFR fluorescence in situ hybridization assay. *Diagn Pathol*, 2006; 1:19.
303. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, 2003; 36: 131–149.
304. Vuletic A, Konjevic G, Milanovic D, Ruzdijic S, Jurisic V. Antiproliferative effect of 13-cis-retinoic acid is associated with granulocyte differentiation and decrease in cyclin B1 and Bcl-2 protein levels in G0/G1 arrested HL-60 cells. *Pathol Oncol Res*, 2010; 16(3): 393-401.
305. Wang WS, Chen PM, Chiou TJ, Liu JH, Lin JK, Lin TC, Wang HS, Su Y. Epidermal Growth Factor Receptor R497K Polymorphism Is a Favorable

- Prognostic Factor for Patients with Colorectal Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2007; 13(12): 3597-604.
306. Weinberg RA. Oncogenes and tumor suppressor genes. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 1994; 44: 160–170.
307. Weinberg RA. *The biology of cancer*. 2007
308. Weinstein I. Addiction to oncogenes – the Achilles heel of cancer. *Science*, 2002; 297: 63–64.
309. Weissensteiner T, Lanchbury JS. Strategy for controlling preferential amplification and avoiding false negatives in PCR typing. *BioTechniques*, 1996; 21(6): 1102-1108.
310. Weisz L, Oren M, Rotter V. Transcription regulation by mutant p53. *Oncogene*, 2007, 26: 2202–2211.
311. Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010; 7(9): 493-507.
312. Willhite CC, Katz PI. Dimethyl sulfoxide. *Journal of Applied Toxicology*, 1984; 4(3): 155–160.
313. Wilson MA, Chrysogelos SA. Identification and characterization of a negative regulatory element within the epidermal growth factor receptor gene first intron in hormone-dependent breast cancer cells. *J Cell Biochem*, 2002; 85: 601–614.
314. Wiman KG. The retinoblastoma gene: role in cell cycle control and cell differentiation. *FASEB J*, 1993; 7(10): 841-845.
315. Woodford K, Weitzmann MN, Usdin K. The use of K(+)-free buffers eliminates a common cause of premature chain termination in PCR and PCR sequencing. *Nucleic Acids Res*, 1995; 23(3): 539.
316. Wu X, Zhao H, Suk R, Christiani DC. Genetic susceptibility to tobacco-related cancer. *Oncogene*, 2004; 23(38): 6500-6523.
317. Xu J, Thompson KL, Shephard LB, Hudson LG, Gill GN. T3 receptor suppression of Sp1-dependent transcription from the epidermal growth factor receptor promoter via overlapping DNA-binding sites. *J Biol Chem*, 1993; 268: 16065–16073.
318. Xu YH, Richert N, Ito S, Merlino GT, Pastan I. Characterization of epidermal growth factor receptor gene expression in malignant and normal human cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984; 81(23): 7308–7312.
319. Yamamoto T, Nishida T, Miyajima N, Kawai S, Ooi T, Toyoshima K. The erbB gene of avian erythroblastosis virus is a member of the src gene family. *Cell*, 1983; 35: 71–78.
320. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 2006; 9: 189–198.
321. Yarden Y: The EGFR family and its ligands in human cancer: signaling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*, 2001; 37: S3–S8.

322. Yason CV, Harris LM, McKenna PK, Wadowska D, Kibenge FS. Establishment of conditions for the detection of bovine herpesvirus-1 by polymerase chain reaction using primers in the thymidine kinase region. *Can J Vet Res*, 1995; 59(2): 94-101.
323. Ye Y, Wang D, Su C, Rong T, Guo A Combined detection of p53, p16, Rb, and EGFR mutations in lung cancer by suspension microarray. *Genet Mol Res*, 2009; 8(4): 1509-1518.
324. Zhang W, Hu GY, Deisseroth A. Improvement of PCR sequencing by formamide. *Nucleic Acids Res*, 1991; 19(23):6649.
325. Zhang X, Zhao Y, Wang M, Yap WS, Chang AY: Detection and comparison of epidermal growth factor receptor mutations in cells and fluid of malignant pleural effusion in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2008; 60: 175–182.
326. Zhou W, Christiani DC. East meets West: ethnic differences in epidemiology and clinical behaviors of lung cancer between East Asians and Caucasians. *Chin J Cancer*, 2011; 30(5): 287-292.
327. Zöchbauer-Müller S, Minna JD, Gazdar AF. Aberrant DNA methylation in lung cancer: biological and clinical implications. *The Oncologist*, 2002; 7(5): 451-457.
328. Брашанац Д, Васиљевић ЈД. Поглавље 8: Општа патологија тумора. Патологија, Медицински факултет Универзитета у Београду, Београд 2003; 196-248.
329. Газибара СМ. Поглавље 4: Телијска пролиферација и процеси репарације ткива. Патологија, Медицински факултет Универзитета у Београду, Београд 2003; 97-115.
330. Маринковић Д, Туцић Н, Кекић В. Генетика. Научна књига, Београд, 1981.
331. Матић Г. Основи молекуларне биологије, Завет, Београд, 1997. ISBN 8670340240, 9788670340244
332. Ромац С, Вукосавић С, Стојковић О, Чуљковић Б. PCR у клиничкој дијагностици. Биолошки факултет у Београду; Београд, 1999. СIP: 616-071:577.213.3 ID=79737356; ISBN 8670780135; 9788670780132

БИОГРАФИЈА

Јасмина М. Обрадовић је рођена 01.02.1981. године у Петровцу на Млави где је завршила основну школу као носилац Вукове дипломе. Средњу медицинску школу је завршила у Пожаревцу као носилац Вукове дипломе.



Студије биологије на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, уписала је 2000. године и завршила 2007. године, са просечном оценом 8.61. Исте године је уписала докторске студије биологије у Институту за биологију и екологију на Природно-математичком факултету у Крагујевцу.

Током протеклих година на докторским студијама је била ангажована у извођењу практичног дела наставе на предметима: Екофизиологија животиња и физиолошке основе анималне токсикологије (2008-2010. год.), Лабораторијски курс из цитологије и хистологије (2010. год.) и Биологија ћелије (2009-2015. год.) на основним академским студијама.

У истраживачко звање истраживач–приправник изабрана је 2009. године, а 2012. у истраживачко звање истраживач-сарадник, за научну област Биологија, у Институту за биологију и екологију Природно–математичког факултета у Крагујевцу.

Јасмина М. Обрадовић је ангажована на пројекту ОИ 175056 “Молекулске, биохемијске и имунолошке анализе у дијагностици тумора”, од 2011. године, који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, под руководством Др Владимира Јуришића, редовног професора на Факултету медицинских наука у Крагујевцу.

Јасмина Обрадовић се успешно бави научно-истраживачким радом у области Биологије и успешно је овладала савременим методама молекуларне биологије, хистолошким методама и методама физиолошко-биохемијских и хематолошких анализа. Резултате својих досадашњих истраживања Јасмина Обрадовић је публиковала у оквиру 15 библиотечких јединица. Објавила је 4 рада у међународним часописима са SCI листе (1–M21, 1–M22, 2–M23), 1 рад у часопису националног значаја (M53), као и 10 саопштења на међународним и националним конгресима и скуповима (6–M34, 4–M64). Такође, Јасмина Обрадовић је и коаутор практикума из области ћелијске биологије и рецезент рада у међународном часопису: Central European Journal Of Biology (ISSN 1895-104X).

Библиографија

РАДОВИ ОБЈАВЉЕНИ У НАУЧНИМ ЧАСОПИСИМА МЕЂУНАРОДНОГ ЗНАЧАЈА (M20)

Рад објављен у врхунском међународном часопису (M21)

1. Branka I. Ognjanović, Nataša Z. Djordjević, Miloš M. Matić, **Jasmina M. Obradović**, Jelena M. Mladenović, Andraš Š. Štajn, Zorica S. Saičić. Lipid peroxidative damage on cisplatin exposure and alterations in antioxidant defense system in rat kidneys: a possible protective effect of selenium. *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13, 1790-1803; doi:10.3390/ijms13021790, IF 2,598; ISSN: 1422-0067.

Рад објављен у истакнутом међународном часопису (M22)

2. Radmila Glišić, Vesna Koko, Gordana Cvijić, Maja Čakić Milošević, **Jasmina Obradović**. Cholecystokinin-producing (I) cells of intestinal mucosa in dexamethasone-treated rats. *Regulatory Peptides*, 2011, 171, 1-3, 6-10; doi:10.1016/j.regpep.2011.05.012, IF 2.473; ISSN: 0167-0115.

Рад објављен у међународном часопису (M23):

3. **Jasmina Obradovic**, Vladimir Jurisic. Evaluation of current methods to detect the mutations of epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer patients. *Multidiscip Respir Med.* 2012;7(1):52. doi: 10.1186/2049-6958-7-52; IF 0,050; ISSN 1828-695X.
4. **Jasmina Obradovic**, Vladimir Jurisic, Natasa Tosic, Jasminka Mrdjanovic, Branislav Perin, Sonja Pavlovic, Natasa Djordjevic. Optimization of PCR conditions for amplification of GC-rich EGFR promoter sequence. *JCLA* 2013; 27(6):487-493. doi: 10.1002/jcla.21632; IF 1.144; ISSN 0887-8013.

РАДОВИ ОБЈАВЉЕНИ У ЧАСОПИСИМА НАЦИОНАЛНОГ ЗНАЧАЈА (M50)

Рад објављен у научном часопису (M53)

1. Ognjanović I. Branka, **Milovanović M. Jasmina**, Đorđević Z. Nataša, Marković D. Snežana, Žikić V. Radoslav, Štajn Š. Andraš, Saičić S. Zorica. Parameters of oxidative stress in liver and white muscle of hake (*Merluccius merluccius* L.) from the Adriatic sea. *Kragujevac J Sci*, 2008, 30, 137-144. ISSN: 1450-9636.

РАДОВИ ОБЈАВЉЕНИ У ЗБОРНИЦИМА МЕЂУНАРОДНИХ НАУЧНИХ СКУПОВА (М30)

Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (М34)

1. **Milovanović JM**, Ognjanović BI, Trbojević IS, Mladenović JM, Djordjević NZ, Marković SD, Štajn AŠ, Saičić ZS. Cisplatin induced changes in antioxidative defense enzyme activities in the rat kidneys: Protective role of selenium. 2nd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation "Current trends in physiological sciences", September 17-20, 2009, Kragujevac, Serbia, Abstract P98.
2. Mladenović JM, Ognjanović BI, Trbojević IS, **Milovanović JM**, Djordjević NZ, Marković SD, Štajn AŠ, Saičić ZS. Protective effect of vitamin C on antioxidant defense system in the liver of rats treated with cisplatin. 2nd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation "Current trends in physiological sciences", September 17-20, 2009, Kragujevac, Serbia, Abstract P99.
3. Trbojević IS, Ognjanović BI, **Milovanović JM**, Mladenović JM, Djordjević NZ, Marković SD, Štajn AŠ, Saičić ZS. Role of selenium in ameliorating the cisplatin induced oxidative damage to kidney and liver in rats. 2nd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation "Current trends in physiological sciences", September 17-20, 2009, Kragujevac, Serbia, Abstract P103.
4. **Obradović JM**, Jurisic V. Frequency of specific methods for the detection of EGFR in lung tumors. Acta Physiologica, (2014), vol. 211. Budapest, Hungary 27.08.2014.-30.08.2014.
5. Jurišić V, **Obradović J**. Effects of different additives for detection of single nucleotide polymorphisms in promoter sequence EGFR gene in NSCLC (Meeting Abstract). European Journal Of Cancer, (2014), vol. 50, S91-S91. Germany, 05.07.2014.- 08.07.2014.
6. Jurišić V, **Obradović J**. Amplification of single nucleotide polymorphisms of the EGFR gene promoter sequence in NSCLC patients. P3.03-P3.03, WIN2014, Winning combination for precise cancer medicine (M31), WIN Consortium, 11, *in press*. France, 23.06.2014.- 24.06.2014.

РАДОВИ ОБЈАВЉЕНИ У ЗБОРНИЦИМА СКУПОВА НАЦИОНАЛНОГ ЗНАЧАЈА (М60)

Саопштења са скупова националног значаја штампана у изводу (М64)

1. Trbojević IS, Ognjanović BI, Đorđević NZ, Mladenović JM, **Milovanović JM**, Petrović ZD, Štajn AŠ, Saičić ZS. Toksičnost paladijuma i promene oksidaciono/antioksidacionog statusa u krvi pacova. Naučni simpozijum

"Mitohondrije i slobodni radikali", 21. septembar 2009, Beograd, Srbija, Knjiga abstrakata, str. 34.

2. **Milovanović JM**, Ognjanović BI, Trbojević IS, Đorđević NZ, Mladenović JM, Glišić RM, Štajn AŠ, Saičić ZS. Zaštitna uloga selena u hepatotoksičnosti i lipidnoj peroksidaciji indukovanih cisplatinom kod pacova. Naučni simpozijum "Mitohondrije i slobodni radikali", 21. septembar 2009, Beograd, Srbija, Knjiga abstrakata, str. 70.
3. Mladenović JM, Ognjanović BI, Trbojević IS, Đorđević NZ, **Milovanović JM**, Štajn AŠ, Saičić ZS. Efekti vitamina C na antioksidacioni zaštitni sistem u bubregu pacova akutno izloženih dejstvu cisplatina. Naučni simpozijum "Mitohondrije i slobodni radikali", 21. septembar 2009, Beograd, Srbija, Knjiga abstrakata, str. 74.
4. Radmila Glišić, Vesna Koko, Gordana Cvijić, Maja Čakić-Milošević, **Jasmina Obradović**. CCK-producing (I) cells of intestinal mucosa in dexamethasone-treated rats. Četvrti srpski kongres za mikroskopiju 11.-12. oktobar, 2010, Beograd, Srbija 4SCM-2010, P115-116.

Јасмина Обрадовић је коаутор практикума:

Глишић Радмила, **Обрадовић Јасмина**, Практикум из Биологије ћелије са радном свеском / Природно-математички факултет, 2011. 117стр. : илустр.; Тираж 100. - Библиографија: стр. 117. ISBN 978-86-6009-013-5; Цитологија – Вежбе; COBISS.SR-ID 186497036; CIP - Каталогизација у публикацији Народна библиотека Србије, Београд, 576.3(075.8) (076).



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ



Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈА

Редни број	
Тип записа	Текстуални штампани материјал
Врста рада	Докторска дисертација
Аутор	Јасмина Обрадовић
Ментор	Проф. др Владимир Јуришић
Наслов рада	Варијанте гена за рецептор епидермалног фактора раста код пацијената оболелих од немикроћелијског тумора плућа
Језик публикације	српски (ћирилица)
Језик извода	српски
Земља публиковања	Србија
Година публикације	2015
Издавач	Ауторски репринт
Место и адреса	Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија
Научна област	Биологија
Научна дисциплина	Биологија/ Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија 57/591.1/577.2
Предметна одредница/кључне речи	епидермални фактор раста; рецептор; немикроћелијски тумор плућа
Чува се	У Универзитетској библиотеци у Крагујевцу и у Библиотеци Природно-математичког факултета у Крагујевцу, Р. Домановића 12, 34000 Крагујевац,

Централа: 034 336 223 Деканат: 034 335 039 • Секретар: 034 300 245

Студентска служба: 034 300 260 • Факс: 034 335 040

www.pmf.kg.ac.rs • e-mail: pmfkrag@kg.ac.rs



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ



Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија

	Србија
Важна напомена	
Извод	
<p>Канцер плућа је тешко излечива болест и водећи узрок смртности, који поприма размере пандемије при чему је немикроћелијски канцер плућа (енгл. Non-small-cell lung cancer, NSCLC) најчешћи тип канцера плућа. Трансмемрански рецептор епидермалног фактора раста (енгл. epidermal growth factor receptor, EGFR) који је кључни молекул у каскадном преносу сигнала коришћен је као погодан биомаркер за развој и примену циљне терапије код NSCLC-а и то тирозин киназних инхибитора и моноклоналних антитела који спречавају пренос измењених сигнала. Пошто је примећено да не реагују сви NSCLC пацијенти подједнако на терапију, сугерисано је да полиморфизми могу да представљају узрок ових разлика јер могу да утичу на регулацију гена EGFR-а. Показано је да полиморфизми појединачних нуклеотида (енгл. single nucleotide polymorphisms SNP(s)) и то -216G>T (rs712829) и -191C>A (rs712830) смештених у промоторном региону и 181946C>T (D994D) (rs2293347) у егзону 25, могу да регулишу активност гена EGFR-а, а њихове дистрибуције су показале етничке разлике.</p> <p>На основу секвенцирања нечијег генома није могуће одредити којој етничкој групи припада, али су примећене интеретничке разлике у дистрибуцији полиморфизма гена EGFR-а, дистрибуцији мутација, али такође и у одговору на дејство лекова, тако да све ове разлике указују да постоје различити ризици између етничких група за развој болести. Осим генетичких фактора и фактори, спољашње средине попут конзумације дувана, могу да имају удела у пријемчивости за канцер плућа. Познато је да пушење може да буде узрок преране смрти, а Србија заузима високо место у годишњој смртности у Европи од канцера плућа. Један од циљева ове студије је био да се покаже фреквенца EGFR полиморфизама у популацији испитаника са територије Републике Србије и да се одреде потенцијални фактори ризика за настанак канцерозног фенотипа. Извршена је генотипизација ових полиморфизама и према нашим сазнањима, по први пут је приказана њихова фреквенција за пацијенте NSCLC-а са територије Републике Србије.</p> <p>За ову процедуру генотипизације, а и за будућа истраживања је потребна</p>	

Централа: 034 336 223 Деканат: 034 335 039 • Секретар: 034 300 245

Студентска служба: 034 300 260 • Факс: 034 335 040

www.pmf.kg.ac.rs • e-mail: pmfkrag@kg.ac.rs



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ



Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија

сензитивна, специфична и оптимизирана метода. Коришћена је ланчана реакција полимеразе праћена дејством рестрикционих ендонуклеаза (енгл. polymerase chain reaction-restriction length polymorphism, PCR-RFLP), која је погодна зато што дозвољава разне модификације мада када треба да се код компликованих узорака изврши амплификација, као што су били у овој студији, може да буде и временски и финансијски захтевна. Постоје два главна узрока која отежавају ову процедуру за одређивање два полиморфизма код пацијената оболелих од NSCLC-а и то - 216G>T и -191C>A. Наиме, ова промоторска секвенца гена EGFR-а има изузетно велики садржај гуанина и цитозина који могу да ометају амплификацију PCR-а. Други разлог је коришћење DNA изоловане из ткива плућа фиксираног формалином и прожетог парафином који може да оштети DNA за време припреме ткива. Међутим, ова ограничења су превазиђена успешном и оптимизованом PCR методом у овој студији.

Ова ретроспективна студија је обухватила 90 DNA узорка добијена од 47 оболела и 43 здрава контролна испитаника. Контролни испитаници су били добровољни даваоци крви, насумично одабрани и нису били у сродству. Клинички и патохистолошки подаци су добијени са Института за плућне болести Војводине, Клинике за пулмонарну онкологију, Медицинског факултета, Универзитета у Новом Саду из Сремске Каменице. Ова студија је одобрена од стране локалног етничког комитета.

За екстракцију DNA из ткива фиксираног формалином и прожетог парафином, а и за екстракцију контролних узорака DNA коришћени су комерцијални китови. PCR-RFLP анализе су спроведене након оптимизоване процедуре. Секвенце су потврђене директним секвенцирањем.

Ова процедура оптимизације је укључила подешавање адекватне температуре везивања прајмера, а за оптимизацију су биле потребне и адекватне концентрације DNA и MgCl₂. Такође, тестирано је осам адитива за амплификацију EGFR промоторног региона са високим садржајем GC (гуанин-цитозинских) парова. Сваки од ових тестираних адитива је додаван у одвојеним реакцијама са различитим концентрацијама: глицерол (5%, 10%, 15%, 20% и 25%), формаид (1.25%, 2.5%, 5%, 7.5% и 10%), Tween 20 (0.1%, 0.5%, 1% и 2%), Triton X-100 (0.1%,

Централа: 034 336 223 Деканат: 034 335 039 • Секретар: 034 300 245

Студентска служба: 034 300 260 • Факс: 034 335 040

www.pmf.kg.ac.rs • e-mail: pmfkrag@kg.ac.rs



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ



Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија

0,5%, 1% и 2%), BSA (0,1 ug/ul, 0,5 ug/ul, 0,8 ug/ul и 1 ug/ul), бетаин (0,5M, 1M, 1,5M, 2M и 2,5M), диметил сулфоксид (DMSO) (1%, 3% и 5%) и PEG (2,5%, 5%, 10%, 15% и 20%). PCR продукти су детектовани помоћу 2% агарозне гел електрофорезе, а рестрикциони фрагменти су одређени на 8% полиакриламидном и 3% агарозном гелу. Додавање глицерола у одвојеним реакцијама у концентрацијама од 15-20%, 1M-2M бетаина и 5% диметилсулфоксида, значајно је повећало принос и специфичност PCR-а, док су други испитивани адитиви били неефикасни. Резултати су показали да су неопходне концентрације DNA од најмање 2 $\mu\text{g/ml}$ за успешну PCR амплификацију. У складу са високим садржајем GC парова, оптимална температура анилинга је била 63°C, што је 7°C више него прорачунато, док су адекватне концентрације MgCl_2 износиле од 1,5 до 2.0 mM.

Статистичке анализе су изведене коришћењем програмског пакета SPSS-17 software (SPSS, Inc.). Све p вредности мање од 0,05 су сматране статистички значајним. Табеле контингенције и Хи квадрат тест (или Фишеров тест, када је било неопходно) су примењени да би се добио однос фреквенција генотипа између контрола и оболелих за сваки полиморфизам. Демографски подаци су поређени кроз генотипове, такође Хи квадрат тест тестом. На основу анализа литературних података по којима је пушење главни узрок обољевања од канцера плућа примењен је модел бинарне логистичке регресије само у оквиру пушача. Испитиване су дистрибуције генотипа између оболелих и контрола за сваки SNP користећи доминантни и рецесивни генетички модел и рачунајући количник шансе (енгл. odds ratios, OR) и 95% интервал поверења (confidence intervals, CI). Сва три SNP-а су тестирана помоћу Харди-Вајнбергове равнотеже. Сензитивност и специфичност су рачунати помоћу ROC криве. Резултати статистичких анализа су показали да постоји јак доказ повезаности између пушења и обољевања од канцера плућа (Pearson Chi square=28,594, df=1, $p<0,001$). Односи између здравих и оболелих испитаника нису били статистички значајно различити ($p>0,05$), што је у корелацији са другим студијама. Мада је у овој студији било више мушкараца пушача (63,3%) него жена пушача (47,1%), није било зависности између пола и пушачког статуса у укупној популацији (Pearson Chi square=2,612, df=2, $p=0,271$). Показало се да су старије особе чешћи пацијенти од канцера плућа ($p<0,05$), што је у корелацији са литературним подацима. Није било одступања од Харди-Вајнбергове равнотеже ($p>0,05$) за полиморфизме 216 G/T и 181946 G/A, што

Централа: 034 336 223 Деканат: 034 335 039 • Секретар: 034 300 245

Студентска служба: 034 300 260 • Факс: 034 335 040

www.pmf.kg.ac.rs • e-mail: pmfkrag@kg.ac.rs



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ



Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија

указује да су дистрибуције алела биле једнаке у групи контрола и у групи оболелих. За -191 С/А, примећено је одступање од Харди-Вајнбергове равнотеже, што је вероватно повезано са малим бројем испитаника.

Постојала је јасна веза између контрола и оболелих под доминантним генетичким моделом за -216 G>T (GG vs. GT + TT) на основу Хи квадрат теста $p=0.012$. Користећи бинарну логистичку регресију нађено је да су носиоци -216 G>T полиморфизма, (тачније носиоци GG генотипа) имали веће шансе (OR=3.5435, 95% CI 1.0710-11.7244, $p=0.038$), него они који су носиоци GT и TT генотипа за развој немикроћелијског канцера плућа, када је подешавање укључило пушачки статус. Показано је овом студијом да је комбинација GG генотипа EGFR полиморфизма -216G/T (rs712829), код оних носилаца који су пушачи, потенцијални фактори ризика да оболе од канцера плућа, тако да Т алел може да има заштитну улогу. На основу ове студије фактор спољашње средине као што је конзумација дувана и генетичка пријемчивост су важни фактори ризика за обољевање од NSCLC-а у популацији испитаника са територије Републике Србије.

Датум прихватања теме од стране ННВ

Датум одбране

Чланови комисије

1. Др Владимир Б. Јуришић, редовни професор на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Патолошка физиологија, и научни саветник - ужа научна област: Онкологија. (ментор)
2. Др Соња Павловић, научни саветник у Институту за молекуларну генетику и генетско инжењерство, Универзитет у Београду, ужа научна област: Молекуларна биологија.
3. Др Бранка Огњановић, ванредни професор на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња, човека и молекуларна биологија.
4. Др Наташа Ђорђевић, ванредни професор на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Фармакологија и токсикологија.
5. Др Радмила Глишић, доцент на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Биологија ћелије и ткива.

Централа: 034 336 223 Деканат: 034 335 039 • Секретар: 034 300 245

Студентска служба: 034 300 260 • Факс: 034 335 040

www.pmf.kg.ac.rs • e-mail: pmfkrag@kg.ac.rs



KEY WORDS DOKUMENTATION

Accession number	
Type of record	Textual material, printed
Contents code	PhD Thesis
Author	Jasmina Obradovic
Mentor	Prof. dr Vladimir Jurisic
Title	Epidermal growth factor receptor gene variants in non small cell lung cancer patients
Language of text	Serbian
Language of abstract	Serbian/English
Country of publication	Serbia
Publication year	2012.
Publisher	Copyright reprint
Publisher place	34000 Kragujevac, Serbia, Radoja Domanovića 12
Scientific field	Biology
Scientific discipline	Biology/ Physiology of animals and human and molecular biology: 57/591.1/577.2
Key words	
Holding data	Library of University of Kragujevac, Library of Faculty of Science, Kragujevac 34000 Kragujevac, Serbia, R. Domanovića 12

Phone: +381 34 336 223 • Dean's office +381 34 335 039 • Secretary Office +381 34 300 245

Administrative student office +381 34 300 260 • Fax +381 34 335 040



Note

epidermal growth factor; receptor; non small cell lung cancer.

Abstract

Lung cancer is poorly curable disease and leading cause of mortality, taking pandemic proportions worldwide and Non-small-cell lung cancer (NSCLC) is the most frequent lung cancer type. A transmembrane epidermal growth factor receptor (EGFR), receptor, a key molecule in signal transduction cascade was used as a potent biomarker for the development and implementation of NSCLC target therapy with tyrosine kinase inhibitors and monoclonal antibodies that block aberrant signals spreading. Still, it was noticed that not all of the NSCLC patients respond equally to therapy, so it was proposed that polymorphisms might be one of potential cause of these differences affecting EGFR gene regulation. It was shown that single nucleotide polymorphisms (SNPs), namely -216G>T (rs712829) and -191C>A (rs712830) located in promoter region and 181946C>T (D994D) (rs2293347) in exon 25, could regulate activity of *EGFR* and whose distributions showed ethnic differences.

Based on results of genome sequencing of ones DNA, it is not possible to categorize a person in any of ethnic group, but interethnic differences were evidenced in distribution of polymorphisms of *EGFR*, distribution of mutations, but also in drug response, so all of these differences implicate that there are different risks between ethnic groups for development a disease. Except genetic factors, environmental risks like tobacco smoking, indeed, are associated with susceptibility of lung cancer. Tobacco smoking is cause of premature death and Serbia takes high place in annual mortality in Europe from lung cancer. One of purposes of this study was to represent frequency of *EGFR* polymorphisms in population from Republic of Serbia and to identify potential risk factor for developing lung cancer phenotype. We have genotyped those SNPs and to our knowledge that was the first time to show their genotype frequencies for NSCLC patients in Republic of Serbia.

For this genotipisation procedure and for future investigations, sensitive, specific and optimized method was demanded. So we used polymerase chain reaction-restriction

Phone: +381 34 336 223 • Dean's office +381 34 335 039 • Secretary Office +381 34 300 245

Administrative student office +381 34 300 260 • Fax +381 34 335 040

www.pmf.kg.ac.rs • e-mail: pmfkrag@kg.ac.rs



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT FOR BIOLOGY AND ECOLOGY



Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac

length polymorphism (PCR-RFLP), that is very convenient method, because it allows wide modifications, but when difficult templates need to be amplified, like in this study, it might be time and cost consuming. Two main causes hamper this optimization procedure in order to detect single nucleotide polymorphisms -216G>T and -191C>A in NSCLC patients. Namely, this EGFR promoter sequence is featuring an extremely high guanine-cytosine content that affected PCR amplification. Second was use of genomic DNA, extracted from formalin-fixed paraffin-embedded lung tumor tissue that might damage DNA during preparation strategy, but all of those obstacles were overcome in optimized and successful PCR in this study, indeed.

This retrospective study included 90 DNA samples obtained from 47 cases and 43 healthy controls. Controls were volunteers, randomly chosen and not related. Clinical and pathophysiological data for NSCLC cancer patients were obtained from Institute for Pulmonary Diseases of Vojvodina, Clinic for Pulmonary Oncology, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Sremska Kamenica, Serbia. This study was approved by local Ethics Committees.

Commercial kits were used for extraction of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded lung tumor tissue and for control samples DNA were isolated from blood. PCR-RFLP analyses were performed under optimized procedures. Sequences were confirmed with direct sequencing.

This optimisation procedure included adjustments of annealing temperature, appropriate DNA concentration and MgCl₂ concentration, also were tested eight additives on amplification of difficult GC-rich *EGFR* gene promoter region. Each of the tested additives were included in the reaction separately at different concentrations, i.e. glycerol (5%, 10%, 15%, 20% and 25%), formamide (1.25%, 2.5%, 5%, 7.5% and 10%), Tween 20 (0.1%, 0.5%, 1% and 2%), Triton X-100 (0.1%, 0.5%, 1%, and 2%), BSA (0.1 ug/ul, 0.5 ug/ul, 0.8 ug/ul, and 1 ug/ul), betaine (0.5M, 1M, 1.5M, 2M and 2.5M) dimethyl sulfoxide (DMSO) (1%, 3% and 5%) and PEG (2.5%, 5%, 10%, 15%, and 20%). PCR products were detected by 2% agarose gel electrophoresis and restriction fragments on 8% polyacrilamide gel and 3% agarose gel.

Phone: +381 34 336 223 • Dean's office +381 34 335 039 • Secretary Office +381 34 300 245

Administrative student office +381 34 300 260 • Fax +381 34 335 040

www.pmf.kg.ac.rs • e-mail: pmfkrag@kg.ac.rs



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT FOR BIOLOGY AND ECOLOGY



Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac

Glycerol at concentration of 15-20%, 1M-2M betaine, and 5% DMSO, added in separate reactions, significantly enhanced yield and specificity of PCR reaction, other examined additives were ineffective. Results showed that DNA concentration in PCR reaction at least 2 µg/ml, were necessary for successful amplification. Due to high GC content, optimal annealing temperature was 63°C, which was 7°C higher than calculated, while adequate MgCl₂ concentration ranged from 1,5 to 2.0 mM.

Statistical analyses were performed using SPSS-17 software (SPSS, Inc.). All *p* values less than 0,05 were considered statistically significant. Contingency table analysis and Chi square test (or Fisher exact test, when necessary), were performed to assess the relationship of genotype frequencies between cases and controls for each polymorphism. Demographic data were compared across the genotype with Chi square test, as well. Using literature data that smoking is the main cause of NSCLC, we performed analyses with binary logistic regression model just in between smokers. We have examined genotype distributions between cases and controls for each single SNP using dominant and recessive genetic model and calculating odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI). The three SNPs were tested for Hardy-Weinberg equilibrium. Sensitivity and specificity was calculated with ROC curve.

Result showed that there was very strong evidence of association between smoking and lung cancer (Pearson Chi square=28,594, df=1, *p*<0,001). Our findings correlate with findings of other studies that frequencies of polymorphisms between the healthy individuals and lung cancer patients were not significantly different (*p*>0,05). Although there were more male smokers (63,3%) than women (47,1%), in this study there was not evidence of a relationship between gender and smoking status in total Serbian population (Pearson Chi square=2,612, df=2, *p*=0,271). It was shown that older age individuals are more often lung cancer patients (*p*<0,05) that correlate with literature data. No deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was observed (*p*>0,05) for two polymorphisms 216 G/T and 181946 G/A which implies that allele distributions were similar in cases and controls. For -191 C/A we have observed deviation from HWE, which is probably due to small sample size. Based on the analysis of ROC curve, PCR

Phone: +381 34 336 223 • Dean's office +381 34 335 039 • Secretary Office +381 34 300 245

Administrative student office +381 34 300 260 • Fax +381 34 335 040

www.pmf.kg.ac.rs • e-mail: pmfkrag@kg.ac.rs



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT FOR BIOLOGY AND ECOLOGY



Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac

method is highly specific and sensitive.

There was significant association between cases and controls under dominant genetic model for -216 G>T (GG vs. GT + TT) based on Pearson's Chi squared test $p=0.012$. With logistic regression model we have found that carriers of -216 G>T polymorphism, (particularly GG carriers) had higher odds (OR=3.5435, 95% CI 1.0710-11.7244, $p=0.038$), than non carriers (GT and TT) for developing non small cell lung cancer, when adjusted for the smoking history.

We have shown that GG genotype of EGFR polymorphisms -216G/T (rs712829), was a risk factor for smokers to develop non small call lung cancer, so T allele might have protective role. Based on this study, environmental factor like tobacco consumption and genetic susceptibility are potent risks for NSCLC patients in Republic of Serbia.

Accepted by Scientific Board on

Defended on

Commission

1. Dr Vladimir B Jurišić, Professor at the Faculty of Medical Sciences The University of Kragujevac, scientific field: Pathophysiology, and scientific advisor - Scientific Area: Oncology. (mentor)
2. Dr Sonja Pavlović, Scientific Advisor at the Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Field of Academic Expertise Molecular Biology.
3. Dr Branka Ognjanović, Associate professor at the Faculty of Science, University of Kragujevac, scientific field: Physiology of animals, humans and molecular biology
4. Dr Nataša Đorđević, Associate professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Scientific Area: Pharmacology and Toxicology.
5. Dr Radmila Glišić, docent at the Faculty of Science in Kragujevac, Field of Academic Expertise: Biology of cells and tissues.

Phone: +381 34 336 223 • Dean's office +381 34 335 039 • Secretary Office +381 34 300 245

Administrative student office +381 34 300 260 • Fax +381 34 335 040

www.pmf.kg.ac.rs • e-mail: pmfkrag@kg.ac.rs

ОБРАЗАЦ 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а: Јасмина Обрадовић

број уписа: 11/07

Изјављујем

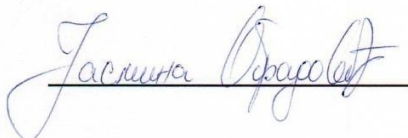
да је докторска дисертација под насловом

***Варијанте гена за рецептор епидермалног фактора раста код
пацијената оболелих од немикроћелијског тумора плућа***

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

Потпис аутора

У Крагујевцу, 23.04.2015.



ОБРАЗАЦ 2.

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

Име и презиме аутора Јасмина Обрадовић

Број уписа 11/07

Студијски програм Докторске академске студије биологије

Наслов рада

*Варијанте гена за рецептор епидермалног фактора раста код пацијената
оболелих од немикроћелијског тумора плућа*

Ментор Проф. др Владимир Јуришић

Потписани Јасмина Обрадовић

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

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

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

Потпис аутора

У Крагујевцу, 23.04.2015.



ОБРАЗАЦ 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Варијанте гена за рецептор епидермалног фактора раста код пацијената оболелих од немикроћелијског тумора плућа

која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, чији је кратак опис дат у обрасцу број 4).

Потпис аутора

У Крагујевцу, 23.04.2015,



ОБРАЗАЦ 4.

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

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

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

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

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

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

Претходно објављен научни рад приложен је уз докторску дисертацију по одобрењу издавача.

Previously published paper reproduced with permission from the publisher.

Optimization of PCR Conditions for Amplification of GC-Rich EGFR Promoter Sequence

Jasmina Obradovic,^{1,2} Vladimir Jurisic,¹ Natasa Tosic,³ Jasminka Mrdjanovic,⁴
Branislav Perin,⁵ Sonja Pavlovic,³ and Natasa Djordjevic^{1*}

¹Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

²Faculty of Science, Institute of Biology and Ecology, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

³Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

⁴Oncology Institute of Vojvodina, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Sremska Kamenica, Serbia

⁵Institute for Pulmonary Diseases of Vojvodina, Clinic for Pulmonary Oncology, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Sremska Kamenica, Serbia

Background: Polymerase chain reaction (PCR) is an extremely sensitive method that often demands optimization, especially when difficult templates need to be amplified. The aim of the present study was to optimize the PCR conditions for amplification of the epidermal growth factor receptor (EGFR) promoter sequence featuring an extremely high guanine-cytosine (GC) content in order to detect single nucleotide polymorphisms -216G>T and -191C>A. **Methods:** Genomic DNA used for amplification was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded lung tumor tissue and PCR products were detected by agarose gel electrophoresis. **Results:** Results showed

Key words: EGFR; GC-rich; genotyping; optimization; PCR

that addition of 5% dimethyl sulfoxide (DMSO), as well as DNA concentration in PCR reaction of at least 2 µg/ml, were necessary for successful amplification. Due to high GC content, optimal annealing temperature was 7°C higher than calculated, while adequate MgCl₂ concentration ranged from 1.5 to 2.0 mM. **Conclusion:** In conclusion, EGFR promoter region is a difficult PCR target, but it could be amplified after optimization of MgCl₂ concentration and annealing temperature in the presence of DMSO and the DNA template of acceptable concentration. J. Clin. Lab. Anal. 00:1–7, 2013. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

INTRODUCTION

Polymerase chain reaction (PCR) is an enzymatic in vitro method for exponential amplification of specific DNA target sequence, affordable and suitable for both basic research and various clinical applications (1). However, the method is extremely sensitive, thus, it could be a considerable challenge to optimize the conditions of the reaction in order to obtain the desired results, especially when difficult templates, such as GC-rich regions, need to be amplified. Namely, GC-rich regions, due to formation of stable and complex secondary structures within a DNA template, could block DNA polymerase during PCR reaction and lead to an ineffective amplification (2–6). PCR technique parameters that could affect its accuracy and efficacy are numerous, including concentration of DNA template, concentration of magnesium ions, PCR thermal

cycling conditions, as well as addition and concentration of PCR additives (7, 8). If there is a scientific or clinical need for specific and efficient amplification of GC-rich DNA template, tuning the PCR reaction could be highly demanding, yet, critically important.

Epidermal growth factor receptor (EGFR) expressed in several epithelial cancers, including lung, breast,

This work was supported by the grant No. 175056 of the Ministry of Science and Technology of the Republic of Serbia.

*Correspondence to: Natasa Djordjevic, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69,34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: natashadj2002@yahoo.com

Received 13 March 2013; Accepted 7 May 2013
DOI 10.1002/jcla.21632

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

2 Obradovic et al.

bladder, prostate, and colorectal, plays an important role not only in carcinogenesis, but also in the cancer treatment involving tyrosine kinase inhibitors (TKIs) (9–11). A number of mutations within the *EGFR* coding gene has been identified, including well-known nonsynonymous deletion/insertion of exon 19 and point mutations L858R (c.2573T>G, rs121434568) and T790M (c.2369C>T, rs121434569) in exon 21 (10–13). Due to their established clinical significance, EGFR is recognized as a biomarker for the development and implementation of targeted cancer therapies with EGFR-TKI, such as erlotinib or gefitinib (14, 15).

Previous studies reported several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the transcriptional start site region of the *EGFR* gene promoter, including -216G>T at the Sp1 transcription factor recognition site, and -191C>A, located 4 bp upstream of one of the transcriptional start sites (16, 17). Due to their location in a region essential for transcription, these polymorphisms were investigated both in vitro and in vivo for their suggested role in modification of promoter activity and response to EGFR-TKI therapy. In 2005, Liu et al. (16), employing transient transfection in human cancer and primary cell lines, observed a significantly higher promoter activity and *EGFR* expression in -216T compared to -216G allele. In two prospective clinical studies of cancer patients treated with erlotinib (17) or gefitinib (12), -216G>T and -191C>A were associated with higher frequency of adverse drug reactions, such as rash or diarrhea. Nevertheless, carriers of -216T allele had an improved progression-free survival on gefitinib (12). Similar results were reported by Jung et al. (18), as a higher response rate to gefitinib or erlotinib treatment and longer progression-free survival corresponded to -216G/T compared to G/G genotype. Based on these data, it would not be surprising if the observed potential to predict efficacy and safety of the cancer treatment nominates these two polymorphisms for possible pharmacogenetic biomarkers for EGFR-TKI activity. However, *EGFR* promoter region has an extremely high GC content of up to 88% (19), which makes it difficult target for PCR amplification, especially in the clinical setting. The aim of the present study was to optimize the PCR conditions for amplification of the *EGFR* promoter sequence comprising two SNPs of interest, namely, -216G>T and -191C>A.

MATERIALS AND METHODS

Samples and DNA Isolation

DNA from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) lung tumor tissue was extracted using the PureLink™ Genomic DNA Kits (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's recom-

mendations. DNA concentration was measured using Qubit® Fluorometer (Invitrogen/Life Technologies).

Bioinformatic Sequence Analysis

Melting temperature of the primers was calculated as $T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$ (7), and the annealing temperature was determined as $T_a = 0.3 \times (T_m \text{ of primer}) + 0.7 \times (T_m \text{ of product}) - 25$ (20). GC content and CpG nucleotide composition of the template DNA were determined and presented using the bioinformatic tool "EMBOSS CpGPlot /CpGReport/Isochore" program (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/>), with a sliding window of 100 nucleotides, shifted one nucleotide at a time.

Genotyping Method

Genotyping for -216G>T/-191C>A EGFR polymorphisms was carried out using the polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method according to Liu et al. (12), but with modifications due to necessity of protocol optimization. In brief, using the primers described in the article, the part of the *EGFR* promoter region spanning both SNPs was amplified in the PCR reaction on Techne Genius Thermocycler (Techne Ltd, Cambridge, UK).

PCR reactions were run in a final volume of 25 µl. The reaction mix consisted of 1 µl genomic DNA, 0.2 µM of each primer, 0.25 mM of each of the dNTPs, and 0.625 U of TaqDNA polymerase, and it was carried out in 1× PCR buffer. Concentrations of MgCl₂ and dimethyl sulfoxide (DMSO) ranged from 0.5 to 2.5 mM, and from 1% to 5%, respectively. The initial denaturation was performed at 94°C for 3 min; followed by 45 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, gradient annealing at 61°C/63°C/65°C/67°C/69°C for 20 sec, and extension at 72°C for 60 sec; and with a final extension at 72°C for 7 min. All reagents used for PCR amplification were purchased from Invitrogen.

PCR products of 197 bp were detected by gel electrophoresis on a 2% agarose gel stained with SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen/Life Technologies) and visualized under blue light on E-Gel® Safe Imager™ Real-time Transilluminator (Invitrogen/Life Technologies). To detect -216G>T or -191C>A, PCR products were later subjected to the restriction enzymes BseRI (New England Biolabs, Ipswich, MA) or Cfr42I (Fermentas/Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania), respectively (12) (data not shown).

Sequencing Analysis

In order to confirm the specificity of PCR amplification, direct sequencing analysis of the obtained PCR

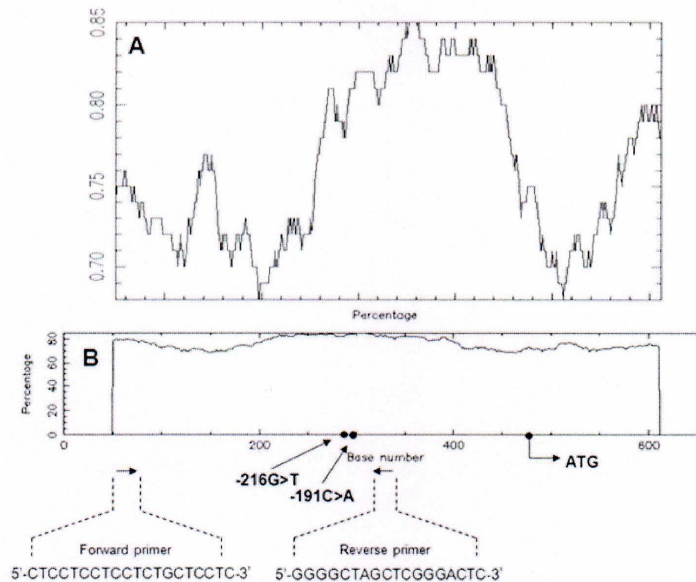


Fig. 1. GC content (A) and CpG nucleotide composition (B) of 660 bp epidermal growth factor receptor (EGFR) promoter region. Sequences and positions of primers used, as well as single nucleotide polymorphisms (SNPs) positions and translation start site ATG, are indicated in the graph.

products was performed. The PCR products were purified using QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) and directly sequenced on ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California). Sequencing was conducted using ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, California) in both forward and reverse direction, using the same primers that was used for the PCR amplification. Comparison of the obtained sequence with the reference sequence of *EGFR* promoter region (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; GenBank reference: M11234.1) revealed that the PCR amplification was highly specific.

RESULTS

Sequence analysis of the template DNA (Fig. 1) showed that the region is extremely GC rich, with 75.45% G + C content in a sequence of 660 bp (sum C + G = 421). The examined region contains a CpG island region spanning 558 bp (−450/+108 from translation start site), with an observed-to-expected ratio of CpG 0.97.

To determine the optimal concentration of DMSO, which proved to be necessary for successful amplification, separate PCR reactions were setup with addition of

1%, 3%, and 5% of DMSO. Final concentration of 5% DMSO was the only one to provide the desired amplicon yield without nonspecific amplification (Fig. 2).

The optimal annealing temperature was calculated to 56°C. Using gradient PCR method, five different annealing temperatures, ranging from 61°C to 69°C, were tested. The results revealed the optimal annealing at 63°C (Fig. 3). MgCl₂ concentrations ranging from 0.5 to 2.5 mM were tested, resulting in an optimum at 1.5 mM (Fig. 4).

DNA concentrations ranged from 0.25 to 28.20 µg/ml. Under the same conditions, which proved optimal for the templates with higher DNA quantity, samples with DNA concentration of less than 1.86 µg/ml gave no amplification results (Fig. 5).

DISCUSSION

Concentration of DNA Template

Recognized as “the golden standard” for sample preservation, formalin fixation and paraffin embedding of a tissue has been routinely used for over a century to enable long storage of samples for future investigations (21). These FFPE specimens have been successfully employed

4 Obradovic et al.

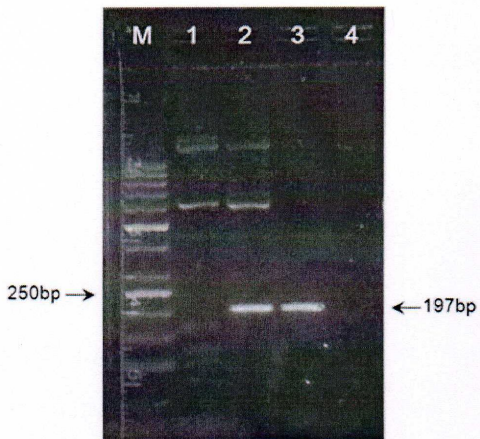


Fig. 2. Effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the polymerase chain reaction (PCR) amplification. Lane M: 50 bp DNA ladder; lane 1: 1% DMSO; lane 2: 3% DMSO; lane 3: 5% DMSO; lane 4: nontemplate control.

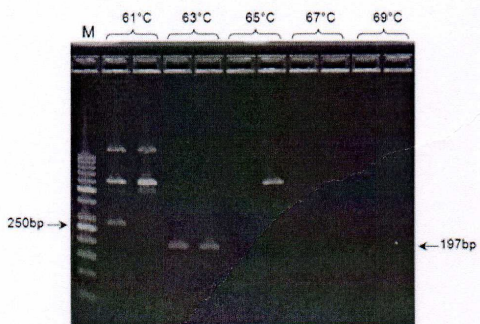


Fig. 3. Effects of annealing temperature on the polymerase chain reaction (PCR) amplification. Lane M: 50 bp DNA ladder.

in numerous research techniques, including PCR method (22). However, PCR in general require high-quality DNA as a template, which turned out to be a challenge for extraction from FFPE tissue. Namely, formalin used for tissue fixation often reduce the amount and quality of available DNA by causing formation of nucleoprotein complexes, cross-linking of nucleic acids with histones, methylene bridging of neighboring amino groups of bases, and further nucleic acid fragmentation (23–25). Nevertheless, the method of isolation seems not to be of a crucial importance, as comparison of different techniques, including phenol–chloroform protocol, salting out method,

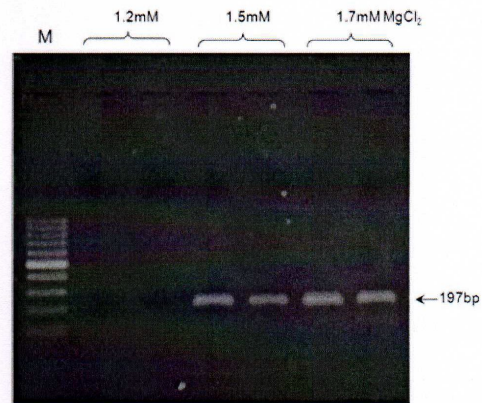


Fig. 4. Effects of $MgCl_2$ concentration on the polymerase chain reaction (PCR) amplification. Lane M: 100 bp DNA ladder.

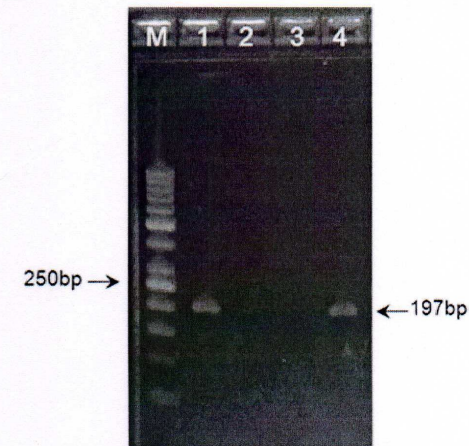


Fig. 5. Effects of template DNA concentration on the polymerase chain reaction (PCR) amplification. Lane M: 50 bp DNA ladder; lane 1: 11.3 $\mu\text{g/ml}$; lane 2: 1.0 $\mu\text{g/ml}$; lane 3: 1.4 $\mu\text{g/ml}$; lane 4: 5.7 $\mu\text{g/ml}$.

and commercial kit application, revealed no significant difference in terms of yield, quality, and length of the extracted DNA (26).

In the present study, DNA was extracted using commercial kit, designed to efficiently isolate genomic DNA from FFPE specimens. The successful amplification was observed only with the DNA concentration of $\geq 1.86 \mu\text{g/ml}$, which corresponded to 1.86 ng of genomic DNA per reaction, or approximately 0.07 $\mu\text{g/ml}$ of the final DNA

concentration. The increase in the starting volume of the DNA template did not result in satisfactory amplification, most probably due to accompanying excess in the EDTA-containing elution buffer residue, which has a potential to inhibit the PCR reaction by chelation of magnesium ions (27). In theory, even a single molecule of DNA could be successfully amplified, and the amount of genomic DNA appropriate for PCR has been determined to up to 1 μg (28, 29). Yet, here we dealt with a difficult DNA template, thus, good concentration DNA of at least 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proved to be a baseline condition for successful amplification.

Concentration of Magnesium Ions

MgCl_2 concentration has a significant influence on PCR amplification efficacy, serving as an essential cofactor that affects *Taq* DNA polymerase activity and fidelity, primer annealing, and melting temperatures, as well as the formation of artifacts (7, 28, 30, 31). MgCl_2 concentrations in PCR reactions usually range between 0.5 and 2.5 mM, depending on the concentration of both magnesium-binding reaction components, such as template DNA, primers, and dNTPs, and the residues of chelators, such as EDTA (7). If MgCl_2 concentration in the reaction is too high, reaction lacks specificity, while if it is too low, little or no amplification can be expected (7, 32). Therefore, it is recommended that each PCR setup begins with the optimization of MgCl_2 concentration, by running several separate reactions of different magnesium molarities.

In the present study, the MgCl_2 concentration was tested within the range of 0.5 to 2.5 mM, with the optimum observed at 1.5 mM. Yet, up to 2.0 mM MgCl_2 also resulted in satisfactory amplification, so the criteria for the selection were based on the subsequent restriction fragment length polymorphism reactions, which gave best results when performed on PCR products obtained with 1.5 mM MgCl_2 concentration (data not shown). The observed range of acceptable molarities was broad most probably due to the presence of enhancer DMSO, which is known to improve the success of PCR reaction even at different MgCl_2 concentrations (30).

PCR Conditions: Temperature of Annealing

To optimize the PCR thermal cycling conditions, one has to determine the optimal temperature and length of each of the program segments, as well as the number of cycles. Of those, the most important parameter seems to be the temperature of primer annealing, as even the smallest deviation of 1°C or 2°C could make a difference between specific and nonspecific amplification (8, 29). The primer annealing temperature that is optimal for particu-

lar PCR reaction directly depends on the base composition of primers and their sequence length, and is usually around 5°C below the calculated primers melting temperature, defined as the dissociation temperature of the primer/template duplex (7, 33). In general, the annealing temperatures usually range between 55°C and 72°C. However, since the G-C pair is bound by three hydrogen bonds, while A-T pairs by only two, high GC content corresponds to higher melting temperature and requests higher temperature for primer annealing (30, 33).

In the present study, the annealing temperature was calculated to 56°C, but due to the high GC content of the template, the optimum was proposed to be at least 5°C higher. Gradient PCR reaction showed that the optimal annealing temperature for our PCR reaction was 61°C, which was even higher than predicted. As expected (20), annealing at the lower temperature allowed nonspecific amplification, while higher temperatures completely disabled annealing, thus, yielding no PCR products. It could be of interest to mention that "touchdown" approach, which represents the PCR modification that includes progressive lowering of annealing temperature throughout the cycles in order to increase both specificity and yield, was tested as well, but with no success (data not shown).

PCR Additives: DMSO

It has been shown that some PCR reactions, especially those involving GC-rich template, cannot be optimized solely by adjusting concentration of components or cycling conditions (7, 34, 35). In such cases, PCR additives or cosolvents, including DMSO, glycerol, formamide, and many others, could act as enhancers of amplification, and have been commonly used in research practice to increase yield and specificity of PCR reaction (8, 36-39). DMSO is a well-described cosolvent that increases both specificity and productivity of PCR reaction, most probably by decreasing inter- or intrastrand reannealing and formation of the problematic secondary structure (7, 37, 40, 41). Consequently, it reduces the melting temperature of the primers and facilitates the PCR product strand separation, providing more efficient amplification (6, 7, 34, 41). It should be taken into account that the concentration of DMSO in the reaction is of ultimate importance, due to its potential to reduce *Taq* DNA polymerase activity of up to 50% (7, 37).

In the present study, addition of DMSO to the reaction mixture turned out to be essential for successful amplification, and none of the previously described optimization strategies could have been implemented without its presence. Optimal concentration of 5% was determined after testing three different options, and was within the recommended range of 1-10% (7, 28).

CONCLUSION

In conclusion, *EGFR* promoter region, due to its high GC content, proved to be an extremely difficult PCR target. The optimization of the PCR conditions included determination of optimal $MgCl_2$ concentration and annealing temperature, which, in the presence of 5% DMSO and the DNA template of acceptable concentration, resulted in successful amplification.

REFERENCES

- Coleman WB, Tsongalis GJ. The polymerase chain reaction. In: Coleman WB, Tsongalis GJ, editors. *Molecular Diagnostics for the Clinical Laboratorian*, edition, Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2006. p 47–56.
- Hube F, Reverdiu P, Iochmann S, Gruel Y. Improved PCR method for amplification of GC-rich DNA sequences. *Mol Biotechnol* 2005;31(1):81–84.
- Woodford K, Weitzmann MN, Usdin K. The use of K(+)-free buffers eliminates a common cause of premature chain termination in PCR and PCR sequencing. *Nucleic Acids Res* 1995;23(3):539.
- McDowell DG, Burns NA, Parkes HC. Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. *Nucleic Acids Res* 1998;26(14):3340–3347.
- Usdin K, Woodford KJ. CGG repeats associated with DNA instability and chromosome fragility form structures that block DNA synthesis in vitro. *Nucleic Acids Res* 1995;23(20):4202–4209.
- Kang J, Lee MS, Gorenstein DG. The enhancement of PCR amplification of a random sequence DNA library by DMSO and betaine: Application to in vitro combinatorial selection of aptamers. *J Biochem Biophys Methods* 2005;64(2):147–151.
- Grunewald H. Optimization of polymerase chain reactions. In: Bartlett JMS, Stirling D, editors. *Methods in Molecular Biology. PCR Protocols*, second edition, Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2003.
- Roux KH. Optimization and troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harb Protoc* 2009;2009(4):pdb ip66.
- Sweetman S, ed. *Martindale: The Complete Drug Reference* 36. London, UK: Pharmaceutical Press; 2009.
- Liu W, Wu X, Zhang W, et al. Relationship of *EGFR* mutations, expression, amplification, and polymorphisms to epidermal growth factor receptor inhibitors in the NCI60 cell lines. *Clin Cancer Res* 2007;13(22 Pt 1):6788–6795.
- Kotsakis A, Georgoulas V. Targeting epidermal growth factor receptor in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2010;11(14):2363–2389.
- Liu G, Gurubhagavata S, Zhou W, et al. Epidermal growth factor receptor polymorphisms and clinical outcomes in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Pharmacogenomics J* 2008;8(2):129–138.
- Han B, Zhou X, Zhang RX, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in NSCLC patients. *Oncol Lett* 2011;2(6):1233–1237.
- Keedy VL, Temin S, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: Epidermal growth factor receptor (*EGFR*) mutation testing for patients with advanced non-small-cell lung cancer considering first-line *EGFR* tyrosine kinase inhibitor therapy. *J Clin Oncol* 2011;29(15):2121–2127.
- Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labels [Internet]. The Food and Drug Administration [updated December 13, 2012]. Available from: <http://www.fda.gov/drugs/scienceresearch/researchareas/pharmacogenetics/ucm083378.htm>. Accessed on January 4, 2013.
- Liu W, Innocenti F, Wu MH, et al. A functional common polymorphism in a *SpI* recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter. *Cancer Res* 2005;65(1):46–53.
- Rudin CM, Liu W, Desai A, et al. Pharmacogenomic and pharmacokinetic determinants of erlotinib toxicity. *J Clin Oncol* 2008;26(7):1119–1127.
- Jung M, Cho BC, Lee CH, et al. *EGFR* polymorphism as a predictor of clinical outcome in advanced lung cancer patients treated with *EGFR*-TKI. *Yonsei Med J* 2012;53(6):1128–1135.
- Ishii S, Xu YH, Stratton RH, et al. Characterization and sequence of the promoter region of the human epidermal growth factor receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82(15):4920–4924.
- Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res* 1990;18(21):6409–6412.
- Magdeldin S, Yamamoto T. Toward deciphering proteomes of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. *Proteomics* 2012;12(7):1045–1058.
- Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, et al. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem* 1991;39(3):351–354.
- Chaw YF, Crane LE, Lange P, Shapiro R. Isolation and identification of cross-links from formaldehyde-treated nucleic acids. *Biochemistry* 1980;19(24):5525–5531.
- Brutlag D, Schlehuber C, Bonner J. Properties of formaldehyde-treated nucleohistone. *Biochemistry* 1969;8(8):3214–3218.
- Taga M, Eguchi H, Shinohara T, et al. Improved PCR amplification for molecular analysis using DNA from long-term preserved formalin-fixed, paraffin-embedded lung cancer tissue specimens. *Int J Clin Exp Pathol* 2013;6(1):76–79.
- Mirmomeni MH, Sajjadi Majd S, Sisakhtnezhad S, Doranegard F. Comparison of the three methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues. *Journal of Biological Sciences* 2010;10:261–266.
- Al-Soud WA, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* 2001;39(2):485–493.
- Kolmodin LA, Birch DE. Polymerase chain reaction. Basic principles and routine practice. *Methods Mol Biol* 2002;192:3–18.
- Lo YMD, Chan KCA. Introduction to the polymerase chain reaction. In: Lo YMD, Chiu RWK, Chan KCA, editors. *Clinical Applications of PCR*, second edition, Totowa, NJ: Humana Press; 2006.
- Kramer MF, Coen DM. Enzymatic amplification of DNA by PCR: Standard procedures and optimization. *Curr Protoc Mol Biol* 2001; Chapter 15: Unit 15 11.
- Innis MA, Gelfand D. Optimization of PCRs. In: Innes MA, Gelfand D, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols. A Guide to Methods and Application*, edition, San Diego, CA: Academic Press; 1990. p 3–13.
- Miller MC, Cunningham L. Introduction to polymerase chain reaction. *Methods Mol Med* 1999;22:1–25.
- Mamedov TG, Pienaar E, Whitney SE, et al. A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. *Comput Biol Chem* 2008;32(6):452–457.
- Sahdev S, Saini S, Tiwari P, et al. Amplification of GC-rich genes by following a combination strategy of primer design, enhancers and modified PCR cycle conditions. *Mol Cell Probes* 2007;21(4):303–307.

Optimization of PCR Conditions 7

35. Musso M, Bocciardi R, Parodi S, et al. Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences. *J Mol Diagn* 2006;8(5):544–550.
36. Sarkar G, Kapelner S, Sommer SS. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Res* 1990;18(24):7465.
37. Hung T, Mak K, Fong K. A specificity enhancer for polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 1990;18(16):4953.
38. Bachmann B, Luke W, Hunsmann G. Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents. *Nucleic Acids Res* 1990;18(5):1309.
39. Farrell EM, Alexandre G. Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. *BMC Res Notes* 2012;5:257. doi: 10.1186/1756-0500-5-257.
40. Bookstein R, Lai CC, To H, Lee WH. PCR-based detection of a polymorphic BamHI site in intron 1 of the human retinoblastoma (RB) gene. *Nucleic Acids Res* 1990;18(6):1666.
41. Jensen MA, Fukushima M, Davis RW. DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis. *PLOS ONE* 2010;5(6):e11024. doi: 10.1371/journal.pone.0011024.