

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Ivana Gunčić

6920/BT

**MIKROSATELITNA NESTABILNOST I GUBITAK
HETEROZIGOTNOSTI U GLIOBLASTOMA**

ZAVRŠNI RAD

Mentor: Izv.prof.dr.sc. Reno Hrašćan

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

MIKROSATELITNA NESTABILNOST I GUBITAK HETEROZIGOTNOSTI U GLIOBLASTOMA

Ivana Gunčić, 6920/BT

Sažetak: U ovom radu govorit ću o dvije genske promjene u glioblastoma i njihovom utjecaju na proces kancerogeneze. Riječ je o gubitku heterozigotnosti (LOH) i mikrosatelitnoj nestabilnosti (MSI). Cilj je iznijeti teorijsku pozadinu i sumirati neka od dosadašnjih istraživanja u području glioblastoma za navedene nestabilnosti. Naime, njihova pojava i učestalost varira u promatranim istraživanjima, no svakako doprinose genomske nestabilnosti. Daju uvid u genske promjene uključene u razvoj (i vraćanje) glioblastoma. Funkciju MSI teško je definirati i pretpostavlja se da je manje važan čimbenik pri razvoju glioblastoma, dok je LOH dokazano bitan čimbenik. Također, obje promjene služe kao markeri za bolje predviđanje progresije bolesti i ishoda preživljavanja. Može se zaključiti kako ove pojave i slični mehanizmi predstavljaju područje interesa u budućim istraživanjima glioblastoma.

Ključne riječi: glioblastom, mikrosatelitna nestabilnost, gubitak heterozigotnosti

Rad sadrži: 33 stranica, 6 slika, 1 tablica, 52 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Izv.prof.dr.sc. Reno Hrašćan

Rad predan: lipanj, 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory of Biology and Microbial Genetics

MICROSATELLITE INSTABILITY AND LOSS OF HETEROZYGOSITY IN GLIOBLASTOMA

Ivana Gunčić, 6920/BT

Abstract: This paper is based on two genetic changes in glioblastoma and their impact on the process of carcinogenesis: the loss of heterozygosity (LOH) and microsatellite instability (MSI). The aim is to present theoretical background and summarize some of the current research in the field of glioblastoma for specified instabilities. Their occurrence and frequency varies in observed studies, but they surely contribute to genomic instability. They provide insight into the genetic changes involved in the development (and recurrence) of glioblastoma. MSI function is difficult to determine and it is assumed to be a less important factor for developing glioblastoma, while LOH has proven to be a significant factor. In addition, both can be used as markers to predict disease progression and mortality rate. Therefore, these phenomena and similar mechanisms represent a promising area for future glioblastoma research.

Keywords: glioblastoma, microsatellite instability, loss of heterozygosity

Thesis contains: 33 pages, 6 figures, 1 table, 52 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Assoc.prof.dr.sc. Reno Hrašćan

Thesis delivered: June 2016

SADRŽAJ

1. UVOD.....	7
2. OPĆENITO O GLIOBLASTOMU.....	8
2.1. ASTROCITOMI.....	8
2.2. GLIOBLASTOMI.....	8
2.3. TUMOR SUPRESORSKI GENI.....	10
3. MIKROSATELITI.....	11
3.1. MIKROSATELITNA NESTABILNOST.....	12
4. HETEROZIGOTNOST.....	15
4.1. POLIMORFIZMI JEDNOG NUKLEOTIDA.....	15
4.2. GUBITAK HETEROZIGOTNOSTI.....	16
5. PROMATRANI EKSPERIMENTALNI RADOVI.....	18
5.1. TEORIJSKI UVOD U EKSPERIMENTALNE METODE.....	18
5.2. PROMATRAN EKSPERIMENTALNI RAD VEZAN UZ GENSKE NESTABILNOSTI U GLIOBLASTOMA.....	20
5.2.1. PROVOĐENJE ANALIZA.....	21
5.2.2. REZULTATI.....	22
5.3.3. ZAKLJUČAK RADA.....	24
5.3. PROMATRANA DOSTIGNUĆA VEZANA UZ POJAVU MIKROSATELITNE NESTABILNOSTI U GLIOBLASTOMA.....	25
5.3.1. MIKROSATELITNI LOKUSI KAO MARKERI.....	25
5.3.2. POVEZANOST NESTABILNOSTI PROTEINA MISMATCH REPAIR SUSTAVA S MIKROSATELITNOM NESTABILNOŠĆU PRI OTPORNOSTI GLIOBLASTOMA NA TERAPIJU.....	28
5.4. PROMATRANA DOSTIGNUĆA VEZANA UZ GUBITAK HETEROZIGOTNOSTI U GLIOBLASTOMA.....	30
5.4.1. GUBITAK HETEROZIGOTNOSTI NA KROMOSOMIMA 10 I 17.....	30
5.4.2. GUBITAK HETEROZIGOTNOSTI NA KROMOSOMU 9.....	30
5.4.3. ANALIZA STOPE PREŽIVLJAVANJA S OBZIROM NA UČESTALOST GUBITKA HETEROZIGOTNOSTI ODREĐENIH REGIJA.....	31
6. ZAKLJUČAK.....	32
7. LITERATURA.....	34

POPIS KRATICA

CAMLS - lokusi mikrosatelita specifični za tumor, povezani s tumorom (*cancer-associated microsatellite loci*)

CDKN2A - *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*

CDKN2C - *cyclin-dependent kinase inhibitor 2C*

CDKN2B - *cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B*

CFTR - transmembranski regulator cistične fibroze (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)

CIN - kromosomska nestabilnost (*chromosomal instability*)

CNL-LOH - LOH s gubitkom broja kopija (*copy number losses LOH*)

CNN-LOH - LOH neutralnog broj kopija (*copy number neutral LOH*)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (*deoxyribonucleic acid*)

EGFR - receptor epidermalnog faktora rasta (*epidermal growth factor receptor*)

GBM - glioblastoma multiforme

LOH - gubitak heterozigotnosti (*loss of heterozygosity*)

MMR - mismatch popravak (*mismatch repair*)

MSI - mikrosatelitna nestabilnost (*microsatellite instability*)

PCR - lančana reakcija polimerazom (*polymerase chain reaction*)

RFLP - polimorfizam veličine restrikcijskih fragmenata (*restriction fragment length polymorphism*)

RNA - ribonukleinska kiselina (*ribonucleic acid*)

SNP - polimorfizam jednog nukleotida (*single nucleotide polymorphism*)

SSCP - polimorfizam konformacije jednolančane DNA (*single strand conformation polymorphism*)

STRs - kratka uzastopna ponavljanja (*short tandem repeats*)

TCGA - *the Cancer Genome Atlas*

UDP - uniparentalna disomija (*uniparental disomy*)

VNTRs - promjenjivi broj ponavljajućih sekvenci (*variable number of tandem repeats*)

WHO - Svjetska zdravstvena organizacija (*World Health Organization*)

1. UVOD

Gliomi su najčešći oblici tumora srednjeg živčanog sustava. Riječ je o različitim vrstama tumora mozga koji potječu iz glija stanica te ih možemo podijeliti na astrocitome, oligodendrogliome, ependimome te miješane gliome (American Brain Tumor Association, 2014). Astrocitomi su tumori mozga koji se razvijaju iz subtipa glija stanica zvanih astrocite. Riječ je o stanicama zvjezdastog oblika koje su locirane u mozgu i leđnoj moždini. U ovom radu fokus je na najzloćudnijem predstavniku astrocitoma, glioblastomu, poznatom kao stupanj IV astrocitoma ili Glioblastoma multiforme (GBM). Riječ je o malignom, invazivnom i agresivno rastućem tumoru mozga koji čini više od 51% ukupnih glioma (Adamson, 2009). Govorit ću o dvije genske promjene u GBM-a i njihovom utjecaju na proces kancerogeneze. Naime, kancerogeneza je proces nastajanja tumora preobrazbom normalne tjelesne stanice u malignu. Zloćudna preobrazba započinje oštećenjem staničnog genoma, a završava gubitkom nadzora staničnog ciklusa i diferencijacije (Cooper, 2000). Tijekom kancerogeneze dolazi do promjena u genima koji kodiraju za proteine uključene u važne stanične i genske događaje. Oštećenje gena može dovesti do produkcije abnormalnih razina proteina (previše ili premalo), produkcije nenormalnih proteina (gubitak ili dobitak funkcije) ili do potpune odsutnosti proteina (Nowell, 1976). Genske promjene o kojima ću govoriti su gubitak heterozigotnosti (LOH, od eng. loss of heterozygosity) i mikrosatelitna nestabilnost (MSI, od eng. microsatellite instability). MSI stanje je genske hipermutabilnosti gdje dolazi do promjena u broju ponavljajućih jedinica mikrosatelita (Richard i sur., 2008) dok je LOH pojava gubitka jednog alela u lokusu određenog gena što dovodi do nastajanja lokusa s abnormalnom funkcijom (Ryland i sur., 2015).

2. OPĆENITO O GLIOBLASTOMU

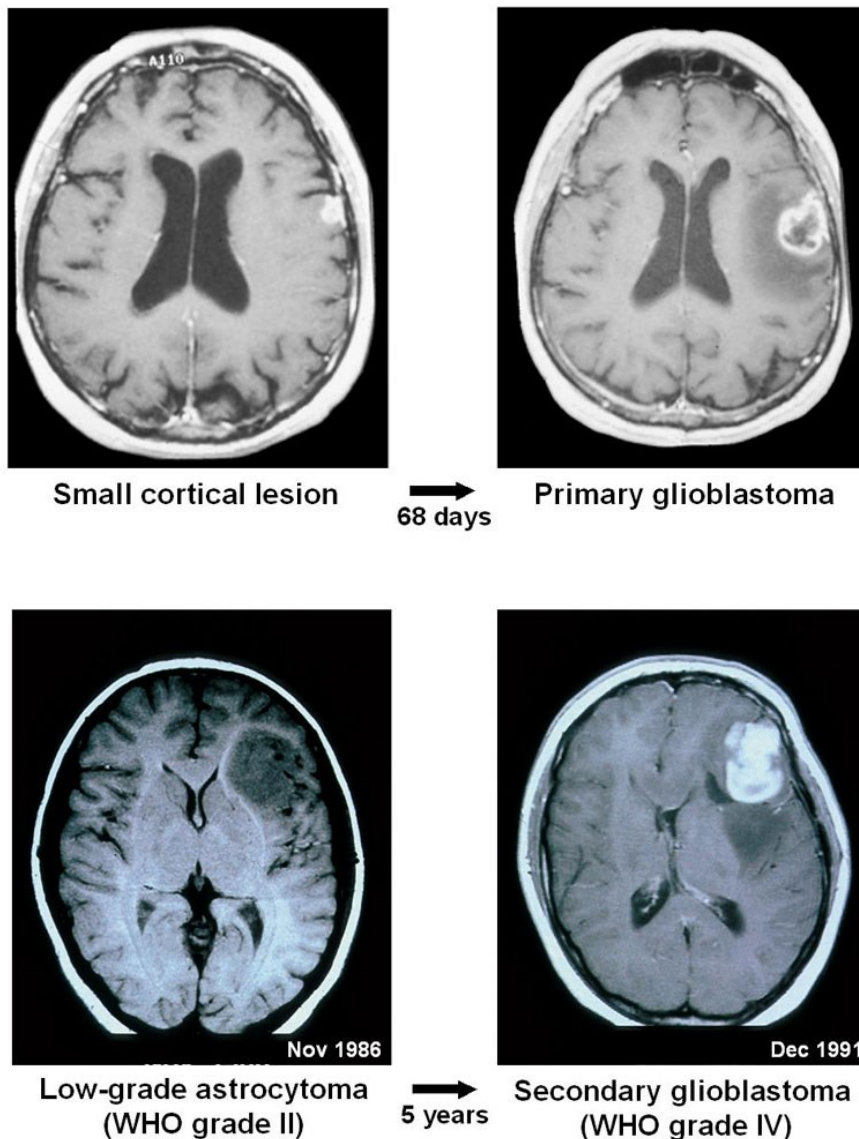
2.1. ASTROCITOMI

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO, od eng. World Health Organization) klasificira astrocitome prema njihovoj agresivnosti i histološkim karakteristikama, odnosno abnormalnostima, u stupnjeve ili graduse od I do IV. Oni se razlikuju prema morfologiji, lokaciji, genskim promjenama i odgovoru na terapiju. Gradus I predstavlja najmanje agresivne, sporo rastuće, benigne tumore. Oni se uspješno uklanjaju operacijom te kemoterapijom po potrebi. Gradus II ili tumori "niskog stupnja" relativno sporo rastu te se iz njih mogu razviti tumori "višeg stupnja". Blago invazivnog su karaktera, što znači da penetriraju u okolno tkivo mozga. Uklanjaju se operacijom nakon koje slijedi kemoterapija ili zračenje. Gradusi III i IV su maligni tumori koji brzo rastu i invazivni su. U III. stupanj pripadaju anaplastični tumori čije je liječenje manje uspješno u odnosu na graduse I i II. Konačno, gradus IV obuhvaća GBM (Louis i sur., 2007).

2.2. GLIOBLASTOMI

Kada govorimo o GBM-u, učestalost oboljenja je približno 3 odrasle osobe na njih 100,000 (Adamson, 2009). Pacijenti prežive oko godinu dana nakon što se provede operacija praćena tretmanom zračenja i kemoterapije te mali broj pacijenata preživi nekoliko godina. Razlog tome je otpornost GBM na trenutne protokole zračenja i kemoterapije. Tumor se ponovno vraća ili dalje napreduje (Kanu i sur., 2009b). Oko 90% glioblastoma razvija se nakon kratkog vremena i bez nekog pokazatelja o manje malignom prekursoru. To su primarni ili de novo GBM-i. Sekundarni GBM-i razvijaju se sporije iz astrocitoma "nižeg stupnja" ili iz anaplastičnih astrocitoma. Ove dvije vrste GBM-a razlikuju se s obzirom na način djelovanja i dob pacijenta kojeg pogađaju, razvijaju se kroz različite genske puteve, pokazuju različite profile ribonukleinske kiseline (RNA, od eng. ribonucleic acid) i ekspresije proteina te se mogu razlikovati u odgovoru na tretman zračenjem i kemoterapijom. Primarni oblik javlja se najčešće u muškaraca iznad 62 godine a sekundarni oblik češći je u žena iznad 45 godina starosti. Primjer razlike između primarnih i sekundarnih GBM-a ako se vrši promatranje na genskom nivou je u mutaciji tumor supresorskog gena *TP53*. Mutacija je identificirana kao rana genska promjena pri razvoju sekundarnog GBM-a, dok se ta mutacija rijetko nalazi u primarnih GBM-a (Ohgaki i Kleihues, 2013). Također, amplifikacija gena receptora epidermalnog faktora rasta (*EGFR*, od eng. epidermal growth factor receptor) češća je u

primarnom (učestalost pojave 40-60%) nego u sekundarnom tipu GBM-a (učestalost manja od 10%). Amplifikacija tog gena dovodi do strukturnih promjena tog gena, odnosno do mutacija. Nastajanjem *EGFR* mutanta (de2-7 ili $\Delta EFGR$) generiraju se specifični signali za koje se smatra da doprinose razvoju tumora. Iz tog razloga, *EGFR* signalizaciju korisno je promatrati u okviru samih puteva prijenosa signala te uloge tog gena u otpornosti na terapiju (Hatanpaa i sur., 2010).



Slika 1. Gornja slika prikazuje nagli razvoj primarnog GBM-a nakon samo 2 mjeseca. Vidi se nastanak centralne nekroze i značajno širenje tumora. Donji prikaz je nastanak sekundarnog GBM-a iz astrocitoma "nižeg stupnja" kroz 5 godina. Napredak sekundarnog GBM-a varira od osobe do osobe, u vremenskom rasponu od ispod godine dana do iznad 10 godina (Louis i sur., 2007).

Nadalje, histopatološka dijagnoza GBM-a ukazuje na njegove morfološke značajke. Maligne stanice astrocite koje ga čine su nediferencirane ili vrlo slabo diferencirane (stanice tumora ne nalikuju na normalne stanice tkiva iz kojeg nastaju), atipičnog su karaktera i visoke mitotične aktivnosti. Apoptoza stanica tumora je smanjena (programirana smrt stanice prirodnim putem) te dolazi do angiogeneze (formiranja krvnih žila u tkivu tumora) i nekroze (područje mrtvih stanica nastalih suprotno prirodnom putu apoptoze). Nekroza i vaskularna hiper-proliferacija su glavne osobine koje GBM razlikuju od glioma "nižeg stupnja". GBM je lociran najčešće u cerebralnoj hemisferi mozga, ali može se naći bilo gdje u mozgu i leđnoj moždini. Razlog zbog kojeg je operativno uklanjanje GBM-a neuspješno je njegova izrazito invazivna priroda. Stanice tumora migriraju kroz parenhim mozga na udaljene regije mozga, pri čemu zahvate i one regije esencijalne za preživljavanje. Može doći do takvog prodiranja stanica da u cijelom mozgu ne postoji neko definirano žarište tumora, već je cijeli mozak infiltriran stanicama tumora. Također, oko 25% pacijenata ima više centara GBM-a raspoređenih u mozgu (Holland, 2000). Kada se GBM promatra na genskom nivou, vidljivo je da se genske promjene događaju diljem genoma. Riječ je o gubicima dijelova kromosoma, cijelih kromosoma i gena. Ovi gubici dovode do gubitka tumor supresorskih gena i genske nestabilnosti tumorskih stanica. Rijetka pojava od navedenih gubitaka gena, no svakako bitna, je pretjerana ekspresija gena (duplikacija cijelih kromosoma, amplifikacija alela unutar kromosoma, pojačanje mutacija itd.). Također dolazi do pogrešaka prilikom replikacije deoksiribonukleinske kiseline (DNA, od eng. deoxyribonucleic acid), segregacije kromosoma i grešaka pri popravku DNA (npr. bazni ekscizijski popravak, nukleotidni ekscizijski popravak). Vidljive su i promjene signalnih puteva (primjerice Wnt signalni put) te epigenetske promjene poput hipermetilacije promotorskih regija (Kanu i sur., 2009a).

2.3. TUMOR SUPRESORSKI GENI

Vrstu gena koju je potrebno istaknuti u ovom radu su tumor supresorski geni. Funkcija tumor supresorskih gena je prevencija nekontroliranog rasta stanica. Njihova uloga je usporavanje diobe stanica i popravljavanje pogrešaka u DNA. Također "govore" stanici kada da umre, odnosno bitni su u procesu programirane stanične smrti ili apoptoze. Naime, apoptoza je način prirodne eliminacije abnormalnih stanica (samo-uništenje DNA i ostalih komponenata stanice). Kada su izbrisane, mutirane ili inaktivirane obje kopije tumor supresorskih gena, nedostatak njihovih produkata, proteina, uzrokuje nekontroliran rast stanica. Stoga, inaktivacija tih gena ključan je čimbenik u procesu kancerogeneze te ono što nastaje kao posljedica prekomjernog umnažanja abnormalnih stanica naziva se neoplazma ili novotvorina,

odosno tumor (Fearon i Bommer., 2008). Naime, većina novotvorina ili neoplazma nastaje iz jedne stanice (porijekla). Daljnja progresija proizlazi iz stečenih genskih varijabilnosti unutar originalnog klona pri čemu se selekcioniraju još agresivniji stanični subtipovi. Tumorske stanične linije su genski nestabilnije od normalnih, zbog aktivacije nekih specifičnih genskih lokusa unutar neoplazme, prisutnosti tumorskih gena te nutritivnog nedostatka unutar neoplazme. Zbog stečene genske nestabilnosti povezane s procesom selekcije, humane neoplazme su vrlo individualne biološki i kariotipski (Weathers i Gilbert, 2014). Također valja spomenuti proto-onkogene, gene koji također pomažu pri normalnom rastu stanica. Kada se proto-onkogen promijeni (mutira) ili je previše njegovih kopija on postaje onkogen, gen koji značajno povećava umnažanje tumorskih stanica. Onkogen postaje aktivan mutacijom proto-onkogena ili trajno ili u trenucima kada njegova aktivnost nije potrebna. Stoga, tumor supresorski geni djeluju kao anti-onkogeni jer suprimiraju nekontroliran rast (dijeljenje) tumorskih stanica. Također, razlikuju se od onkogena jer onkogeni nastaju aktivacijom proto-onkogena a tumor supresorski geni dovode do kancerogeneze kada su inaktivirani. Primjer tumor supresorskog gena koji je najviše izučavan i čije su mutacije najčešće uočene u tumorima je *TP53*. On kodira za protein p53 i pojavljuje se u različitim i mnogobrojnim vrstama tumora (Petitjean i sur., 2007).

3. MIKROSATELITI

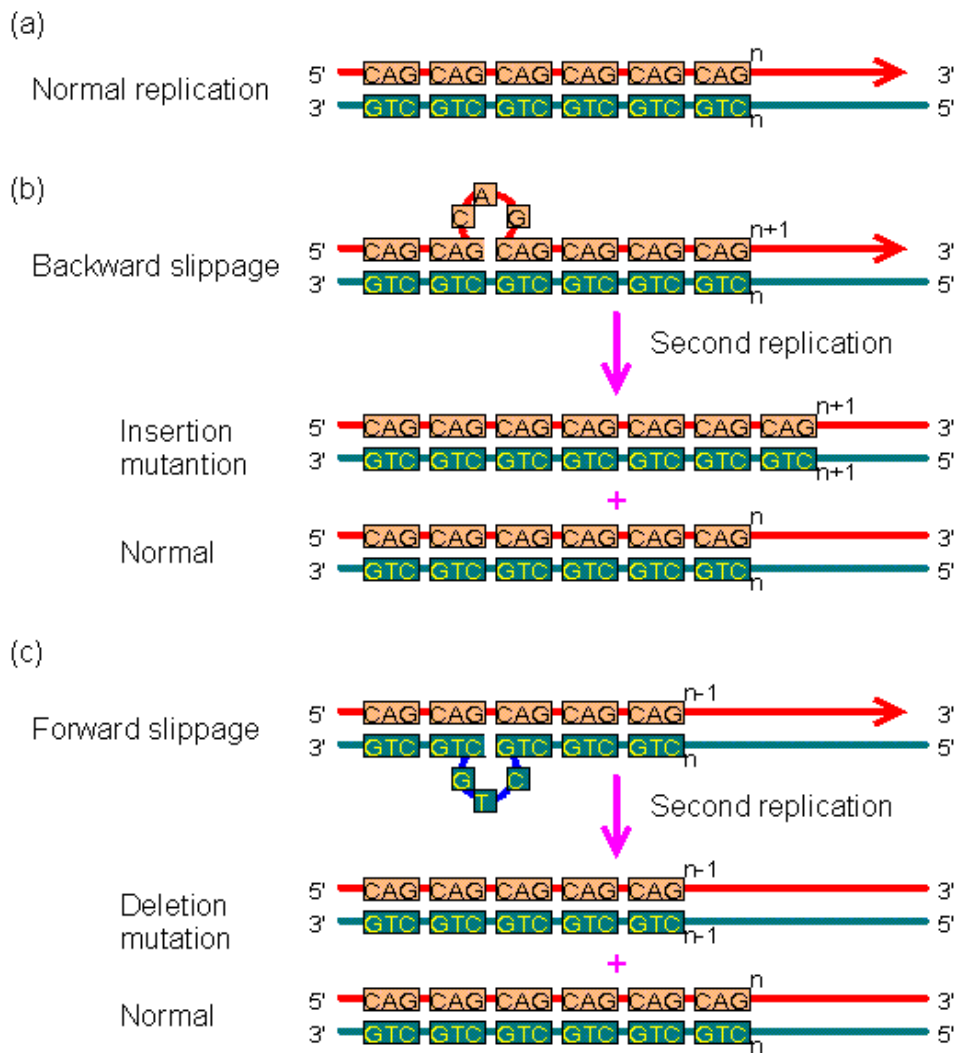
Mikrosateliti su ponavljajuće sekvence DNA građene od ponavljajućih nukleotidnih jedinica (oligonukleotida) čija duljina može biti od 2 do 5 parova baza, dok neka istraživanja kažu da je raspon duljine od 1 do 6 parova baza (Buecher i sur., 2013). Primjer dinukleotid mikrosatelita bila bi TATATATATA sekvenca, trinukleotid mikrosatelita GTCGTCGTCGTC te postoje tetra- i penta- nukleotid mikrosateliti. Pojavljuju se na desecima tisuća mjesta u ljudskom genomu te čine oko 3% ljudskog genoma, odnosno čine više od milijun fragmenata DNA. Dulje sekvece nazivaju se minisateliti (10-100 parova baza) te one još dulje nazivaju se satelitna DNA mjesta. Mikrosateliti i minisateliti zajedno se klasificiraju kao promjenjivi broj ponavljajućih sekvenci (VNTRs, od eng. variable number of tandem repeats) dok se mikrosateliti individualno nazivaju kratka uzastopna ponavljanja (STRs, od eng. short tandem repeats) (Kumar, 2015). Što je veći genom, mikrosatelitna gustoća je veća te se može naći duplo više mikrosatelita na krajevima kromosoma nego u njihovom središtu. Naime, telomere na krajevima kromosoma, koje se smatraju bitne u procesu starenja, sastoje se od ponavljajuće DNA, točnije heksanukleotid ponavljanih motiva TTAGGG. Te sekvence pripadaju

minisatelitima. Općenito, mikrosateliti pokazuju visok stupanj mutacija te se većina mutacija događa i u kodirajućim i nekodirajućim mikrosatelitima. Posebno su skloni pogreškama tijekom replikacije baš zbog svog čestog uzastopnog ponavljanja (Jarne i Lagoda, 1996). Oni mikrosateliti locirani u nekodirajućem dijelu genoma (introni) su biološki inertni i omogućuju nesmetano akumuliranje mutacija preko generacija i tako dovode do varijabilnosti. Upravo ta varijabilnost služi pri DNA identifikaciji (DNA otisak prsta) jer duljina mikrosatelita individualno ovisi o pojedincu - svaki pojedinac sadrži mikrosatelite zadane duljine u stanicama (Turnpenny i Ellard, 2005).

3.1. MIKROSATELITNA NESTABILNOST

Ono što nas zanima su pogreške koje nastaju u mikrosatelita lociranih direktno u kodonima gena (kodirajući dio genoma, eksoni) i regulatornim sekvencama. Nakupljanje mutacija u tih mikrosatelita naziva se mikrosatelitna nestabilnost (MSI) te predstavlja genski put kojim se akumuliraju pretpostavljeni onkogeni učinci u tumorima s MSI (Turnpenny i Ellard, 2005). Do takvog stanja ne dolazi ako stanica funkcionira normalno, odnosno MSI nastaje kao posljedica nemogućnosti stanice da popravi pogreške u redosljedu nukleotida nastale tijekom replikacije DNA. Niz nakupljenih pogrešaka može dovesti do maligne transformacije stanice te tumori u kojima dolazi do MSI pokazuju različite značajke od tumora u kojima je MSI izuzeta. Preciznije, MSI proizlazi iz nefunkcionalnog mismatch popravka (MMR, od eng. mismatch repair) DNA, odnosno prisutnost MSI dokaz je da MMR ne funkcionira normalno. Naime, funkcionalni MMR ispravlja greške koje se spontano događaju tijekom replikacije DNA (Richard i sur., 2008). Navedene greške su zapravo oštećenja DNA, odnosno promjene u DNA koje stanica može primjetiti. To su pogreške poput nesparenih i krivo sparenih baza, kratkih insercija i delecija. Proteini uključeni u MMR sustav prepoznaju krivo sparenu ili nesparenu regiju DNA tvoreći kompleks s njom, isprave pogrešku te insertiraju ispravne baze na potrebno mjesto. U stanicama gdje MMR sustav ne funkcionira ispravno, nastale pogreške tijekom replikacije DNA ne mogu se ispraviti što posljedično dovodi do nakupljanja tih pogrešaka, odnosno dolazi do mutacija. Učestalost (stopa) mutacija u lokusima mikrosatelita razlikuje se od drugih stopa mutacija, kao npr. zamjena baza. Stopa mutacija raste s povećanjem broja ponavljanja dok ne dosegne broj od 6 do 8 ponavljanja nakon čega stopa mutacija opada. Mutacije o kojima je riječ su promjene u broju ponavljajućih sekvenci mikrosatelita – insercije i delecije, odnosno promjene u duljini mikrosatelita. O stvarnom uzroku navedenih mutacija se raspravlja. Jedni predlažu kako ove promjene nastaju zbog replikacijskog klizanja koje je češće tijekom replikacije ponavljajućih sekvenca, kao što su

mikrosateliti (Forster i sur., 2015). Naime, klizanje se odvija u nekoliko koraka. Prvo, enzim zaslužan za sintezu DNA, DNA polimeraza, provodi replikaciju uzastopnih ponavljanja mikrosatelita dok u jednom trenu ne dođe do obustavljanja replikacije i privremenog disociranja polimeraze s lanca kalupa. Zatim se novosintetizirani lanac odvaja od lanca kalupa i sparuje s drugim direktnim ponavljanjem uzvodno na lancu kalupu (nastaje "omča"), slika 3.b). Iz tog razloga, polimeraza prilikom vraćanja na svoju poziciju na lancu kalupu, kako bi nastavila proces replikacije, ponovno dodaje deoksiribonukleotide koji su već dodani. Time dolazi do duple replikacije nekih sekvenci, odnosno insercije u novi lanac. S druge strane, u rijetkim slučajevima nastaje omča na lancu kalupu zbog neispravnog spajanja lanca kalupa s direktnim ponavljanjem na novom lancu, no time dolazi do gubitka slijeda nukleotida (delecije). Navedeno dovodi do neslaganja između novoga lanca i lanca kalupa. Posljedično, proteini koji vrše nukleotidni ekscizijski popravak prepoznaju nastale promjene te dolazi do nastajanja ili proširenja ili gubitka u sekvencama, pri čemu je češća pojava proširenje. Nakon drugog ciklusa replikacije, generiraju se sekvence s promjenama u njihovim duljinama u odnosu na ishodišnu sekvencu (Viguera i sur., 2001).



Slika 2. Mutacije uzrokovane replikacijskim klizanjem. Prikazano je neslaganje u jednom ponavljanju (općenito, klizanjem može doći i do nekoliko nesparenih ponavljanja). Narančastom bojom prikazan je novოსintetizirani lanac, a zelenom lanac kalup. a) Normalna replikacija. b) Klizanje unatrag što dovodi do insercije. c) Klizanje unaprijed što dovodi do delecije.

Kao drugi uzorak mikrosatelitnih mutacija pretpostavljaju se točkaste mutacije i supstitucije baza (rijeđe), gdje se samo jedan nukleotid pogrešno kopira tijekom replikacije. Razne studije pokazale su da pogreške u kratkim ponavljajućim sekvencama mikrosatelita nastaju zbog točkastih mutacija, a ne samo zbog replikacijskog klizanja (Amos, 2010). Naime, poznato je da u našem genomu postoje proteini za koje kodiraju geni sačinjeni od ponavljajućih sekvenci (najčešće je riječ o trinukleotid ponavljajućim sekvencama jer one kodiraju za aminokiseline). Ako se prethodno navedene mutacije dogode u takvim kodirajućim regijama, nakon

transkripcije i translacije dolazi do sinteze abnormalnih proteina što posljedično može dovesti do kancerogeneze. Kao što je rečeno, temeljni geni u kojima će mutacije rezultirati kancerogenezom su tumor supresorski geni. Posljedično, inaktivacijom tih gena, dolazi do napretka tumora (Buecher i sur., 2013). Također, mutacije u mikrosatelita lociranih u promotorima i drugim regulatornim sekvencama mijenjaju samu ekspresiju gena (Rockman i Wray, 2002). Iz toga se zaključuje kako su mikrosateliti korisni, ne samo u DNA profiliranju i forenzičkoj identifikaciji, već služe kao genska veza, odnosno markeri za pronalaženje gena ili mutacije odgovorne za neku bolest ili svojstvo (osobinu) (Turnpenny i Ellard, 2005). U ovom slučaju zanima nas njihova korist u boljem razumijevanju GBM-a.

4. HETEROZIGOTNOST

Potrebno je objasniti strukturu genoma ljudskih somatskih stanica kao uvod u gensku promjenu LOH-a. Naime, somatske stanice su većinom diploidne jer sadrže dvije kopije genoma od kojih svaka potječe od jednog roditelja, odnosno sadrže par kromosoma. To znači da za svaki gen postoje dva alela, odnosno dvije forme istoga gena, tj. genskog lokusa. Ako su oba alela identična govorimo o homozigotnosti, a ako se aleli razlikuju govorimo o heterozigotnosti (Malats i Calafell, 2003).

4.1. POLIMORFIZMI JEDNOG NUKLEOTIDA

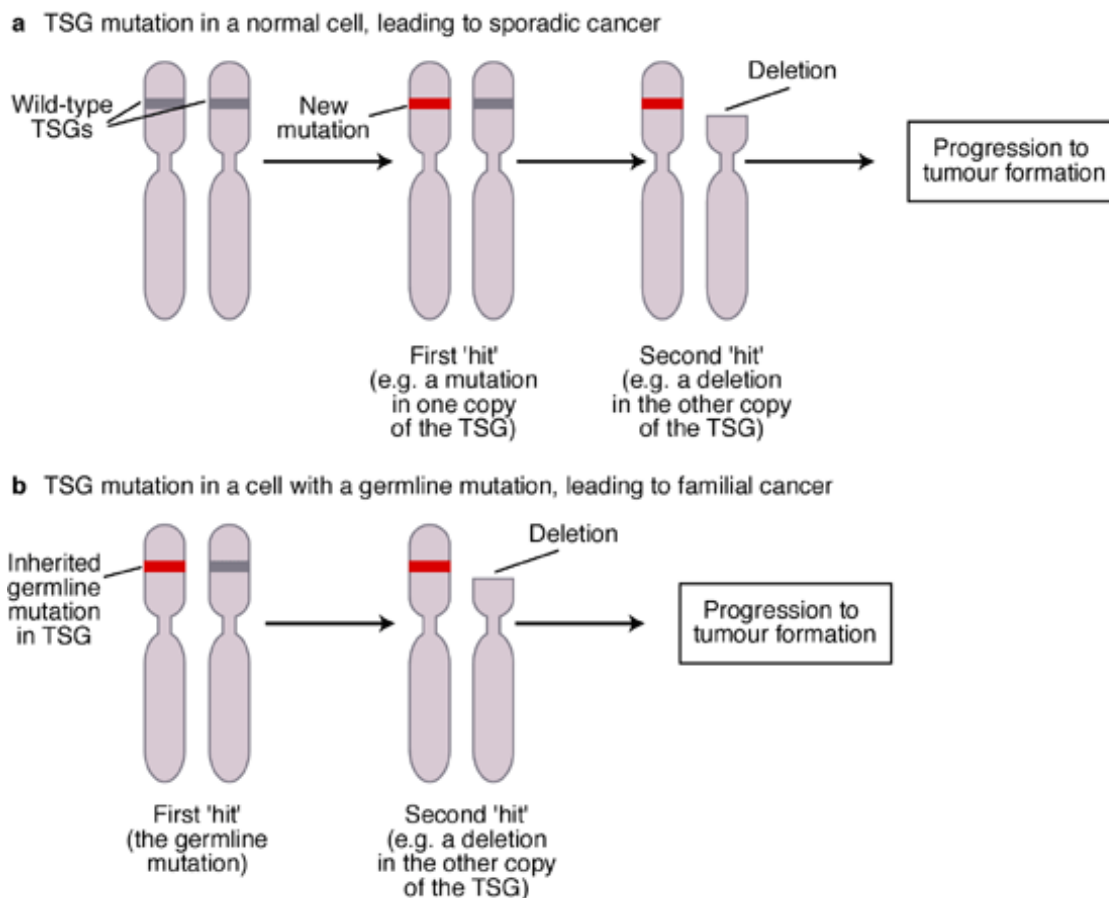
Svaka kopija cjeloukupnog genoma sadrži oko tri milijarde nukleotidnih baza (A- adenin, G- gvanin, C- citozin i T- timin). Za većinu pozicija u genomu, sastav nukleotidnih baza jednak je za sve pojedince, ali mali postotak genoma razlikuje se u sastavu baza ovisno o pojedincu. Pozicije u genomu koje mogu činiti tu razliku zovu se polimorfizmi jednog nukleotida (SNPs, od eng. single nucleotide polymorphisms) i one su najčešći tip genske varijabilnosti među ljudima. Svaki SNP predstavlja razliku u nukleotidu kao što je npr. zamjena nukleotida C nukleotidom T u određenom dijelu DNA. SNPs pojavljuju se normalno kroz DNA pojedinca te je učestalost njihove pojave u prosjeku jedan na tristo nukleotida, što znači u grubo deset milijuna SNPs u ljudskom genomu. Navedene varijacije služe kao biološki markeri koji znanstvenicima omogućuju lokaciju gena uključenih u neku bolest jer općenito prisutnost SNPs u genima i regulatornim regijama utječe na funkcije gena pa tako i razvoj bolesti. Većina SNPs nema utjecaj na razvoj bolesti, ali doprinose boljem proučavanju ljudskog zdravlja jer omogućuju predviđanje odgovora pojedinca na određene lijekove, okolišne čimbenike, toksine itd. Također se mogu predvidjeti rizici vezani za razvoj određene bolesti (Biad, 2016). Prethodno navedeni mikrosateliti, odnosno različite duljine mikrosatelitnih

regija za alele nekog gena, također dovode do heterozigotnosti, baš kao i SNPs. Kako kromosomi somatskih stanica većinom dolaze kao par, nasljeđivanjem se omogućuje potencijalna heterozigotnost za SNP i mikrosatelitne lokacije.

4.2. GUBITAK HETEROZIGOTNOSTI

Kao što je rečeno, heterozigotnost nastaje kada kopije genoma dobivene od svakog roditelja posjeduju različite alele za neki gen. S druge strane, stanje heterozigotnosti može nastati i zbog mutacija u samo jednom alelu gena, pri čemu drugi ostaje u funkcionalnoj formi, formi divljeg tipa. Međutim, jedna kopija nastale heterozigotne regije genoma može se izgubiti, što rezultira regijom koja sadrži samo jednu kopiju te ona kao takva ne može biti heterozigot, odnosno dolazi do gubitka heterozigotnosti (LOH). Preciznije, dolazi do pojave gubitka jednog alela u lokusu određenog gena. Kada dođe do gubitka alela divljeg tipa (funkcionalni alel) dolazi do nastajanja lokusa s abnormalnom funkcijom. To je čest genski događaj pri razvoju tumora i smatra se da je LOH u tumorima odgovoran za gubitak funkcije tumor supresorskih gena kroz gubitak preostalog funkcionalnog alela divljeg tipa (Ryland i sur., 2015). Mutacije koje dovode do LOH-a su rekombinacije, delecije, konverzije gena, translokacije, kromosomski lom, gubitak kromosoma itd. (Thiagalingam i sur., 2002). Rezultat LOH-a je transformacija iz heterozigotnog stanja za određenu regiju u homozigotno (identični aleli gena na oba kromosoma) ili hemizigotno stanje (prisutnost samo jedne kopije gena). LOH se smatra značajkom tumora u kojima dolazi do kromosomske nestabilnosti (CIN, od eng. chromosomal instability), koja je karakterizirana viškom ili gubitkom kromosomskih regija (Bleeker i sur., 2012). LOH općenito obuhvaća LOH s gubitkom broja kopija (CNL-LOH, od eng. copy number losses LOH) pri čemu nastaje hemizigotno stanje za određenu regiju te LOH neutralnog broja kopija (CNN-LOH, od eng. copy number neutral LOH), čija je posljedica homozigotno stanje. U CNL-LOH-u briše se cijela ili dio jedne kopije kromosoma dok CNN-LOH proizlazi ili iz homologne rekombinacije ili zbog umnažanja preostale kopije kromosoma prije ili nakon LOH-a. CNN-LOH posljedica je duplikacije ili majčinske ili očeve kopije kromosoma ili kromosomalne regije te istovremenog gubitka druge kopije. Naziv CNN-LOH proizlazi iz činjenice da se broj kopija ne mijenja, samo se mijenja njihov sadržaj duplikacijom. Pod pojmom CNN-LOH smatra se i uniparentalna disomija (UDP, od eng. uniparental disomy) koja je posljedica grešaka u mejozi I i II prilikom stanične diobe gdje osoba naslijedi dvije kopije kromosoma ili dijela kromosoma samo od jednog roditelja i nijednu kopiju od drugog roditelja. Tako stečena homozigotnost također može dovesti do razvoja tumora ako pojedinac naslijedi samo

nefunkcionalni alel tumor supresorskog gena (O'Keefe i sur., 2010). Kada govorimo o razvoju tumora, postoji Knudsonova hipoteza koja govori o dva "udarca" (two-hit hypothesis) koja dovode do kancerogeneze. Prvi udarac ("first hit") podrazumijeva točkastu mutaciju koja inaktivira jednu kopiju (alel) tumor supresorskog gena. Ako je riječ o nasljednim tumorima, osoba se već rađa s ovakvim stanjem. Pojedinaac u ovom trenutku ne razvija tumor jer je preostali alel tumor supresorskog gena aktivan i funkcionalan, ali je došlo do nastanka heterozigotnog stanja. Drugi udarac ("second hit") je mutacija koja rezultira gubitkom preostalog funkcionalnog alela tumor supresorskog gena, tj. LOH. (Pelengaris i Khan, 2013).



Slika 3. Pojednostavljen prikaz procesa kancerogeneze na temelju Knudsonove hipoteze sukladno s prethodno objašnjenim mehanizmom. Gornji niz (a) prikazuje razvoj tumora koji nije nasljedan, kao što je GBM gdje je "second hit" zapravo LOH. Donji slijed (b) mehanizam je razvoja nasljednih tumora (Richards, 2001).

5. PROMATRANI EKSPERIMENTALNI RADOVI

5.1. TEORIJSKI UVOD U EKSPERIMENTALNE METODE

Za početak, objasniti ću neke od metoda koje se provode pri eksperimentalnoj analizi MSI, LOH i ostalih genskih nestabilnosti te koje ću kasnije spominjati u radu. Prvenstveno, važna je metoda lančane reakcije polimerazom (PCR, od eng. polymerase chain reaction). PCR, općenito, metoda je za umnažanje točno određenog dijela genoma iz male količine genskog materijala. Dobiveni umnoženi fragmenti materijal su za provođenje daljnjih analiza. Za svoje provođenje, PCR zahtijeva prisutnost početnica (oligonukleotidi koji se komplementarno sparuju "lijevo i desno" od dijela DNA koji želimo umnožiti). Početnice potrebne za umnažanje sintetizirane su specifično za željene sekvence koje želimo umnožiti te su kao takve najčešće kupljene. Enzim koji provodi reakciju umnažanja je DNA polimeraza čija se aktivnost regulira promjenom temperature. Prva faza PCR-a je denaturacija DNA pri povišenoj temperaturi (94-95°C) nakon čega se temperatura spušta na optimalnu vrijednost za vezanje početnica (50-65°C). U zadnjoj fazi, temperatura se ponovno podiže i to na vrijednost koja je optimalna za rad DNA polimeraze (70-72°C) koja tada produljuje 3' kraj početnica i sintetizira dvolančanu DNA. Nakon trećeg ciklusa provođenja PCR-a, dolazi do sinteze željenog fragmenta DNA koji počinje s 3' krajem jedne a završava s 5' krajem druge početnice te se najčešće provodi oko tridesetak ciklusa umnažanja. Dakle, cilj PCR-a je umnožiti određeni fragment koliko god puta nam je potrebno u svrhu nesmetanog provođenja analiza, primjerice sekvencioniranja ili analize elektroforezom. PCR je ujedno i metoda detekcije određene sekvence DNA jer ako se fragment koji želimo umnožiti ne umnoži (početnice se nisu imale za što spariti), znači da fragment u uzorku nije prisutan (5. predavanje iz kolegija Genetičko inženjerstvo, 2015). Sljedeća metoda je elektroforeza, metoda za analizu, razdvajanje, pročišćavanje i izolaciju nukleinskih kiselina (i proteina). Elektroforeza služi za razdvajanje nabijenih molekula, u ovom slučaju DNA fragmenata, na temelju razlike u njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima (veličina, sastav i molekulska masa) prolaskom molekula kroz gel. Postoje dvije vrste gela, agarozni i poliakrilamidni, pri čemu agarozni služi za razdvajanje većih, a poliakrilamidni za razdvajanje manjih DNA fragmenata. Razdvajanje se odvija u prisutnosti električnog polja pa tako molekule putuju prema suprotno nabijenom polu nego što je to njihov naboj (DNA putuje prema pozitivnom polu). Molekule s obzirom na njihova svojstva prelaze različite duljine u gelu (zaustavljaju se na različitim pozicijama, nastaju tzv. vrpce) pri čemu manje molekule putuju brže. Nakon provedene elektroforeze i

detekcije dobivenih vrpca u gelu, može se provesti usporedba s fragmentima standarda kojima je poznata molekulska masa ili sama duljina te tako procijeniti masa ili duljina željenih fragmenata (3. predavanje iz kolegija Genetičko inženjerstvo, 2015). Nadalje, sekvencioniranje je metoda koja se zasniva na mogućnosti razdvajanja obilježenih polinukleotidnih lanaca čija se duljina razlikuje za samo jedan nukleotid pomoću elektroforeze u denaturirajućim uvjetima. Time se omogućuje određivanje točnog redosljeda nukleotida u željenom fragmentu DNA. Postoji više metoda sekvencioniranja te su razvijene i automatizirane metode (umjesto manualnih). Nakon provedenog sekvencioniranja, dobivene informacije služe za genomska istraživanja (analiza sekvence) ili za provođenje eksperimentalnih genomskih pristupa (inaktivacija gena - otkrivanje funkcije gena, ispitivanje interakcija proteina itd.) (11. predavanje iz kolegija Genetičko inženjerstvo, 2016). U novije vrijeme, za analizu GBM-a koristi se "SNP-based arrays" ili SNP bazirana mikropolja, čipovi – metoda hibridizacije DNA. Hibridizacija je postupak kojim se pomoću specifičnih sekvenca DNA detektiraju njima komplementarne sekvence čiju prisutnost provjeravamo (13. predavanje iz kolegija Genetičko inženjerstvo, 2016). U slučaju SNP baziranih čipova, DNA je hibridizirana na čipove koji sadrže oligonukleotidne sekvence sa SNPs. Ovisno o gustoći oligonukleotida, detektiraju se promjene u broju kopija, od malenih intragenjskih delecija do kromosomskih promjena. Ovim čipovima mogu se detektirati signali individualnih alela te CNN LOH (Bleeker i sur., 2012). Također, koriste se metode poput imunohistokemije. Imunohistokemija je proces lokalizacije antigena od interesa u tkivu pomoću ciljno usmjerenih antitijela. Bazira se na temelju vezanja specifičnog antitijela za ciljni antigen, nakon što ga antitijelo prepozna. Omogućuje dobivanje informacija prilikom analize tkiva da bi se našli stanični markeri za određenu bolest te da bi se bolje razumjela lokalizacija i ekspresija pojedinih proteina. Nadalje, metoda analize polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP, od eng. restriction fragment length polymorphism) je metoda za detektiranje razlika u manjem broju nukleotida za sekvence DNA tako da se restrikcijskim enzimima cijepa DNA i analizira gel elektroforezom. Riječ je o enzimima koji cijepaju DNA na točno određenom mjestu što rezultira fragmentiranjem DNA. Broj i veličina dobivenih fragmenata ovisi o tome gdje i na koliko mjesta enzim može cijepati (2. predavanje iz kolegija Genetičko inženjerstvo, 2015). RFLP se koristi za detekciju većih delecija, insercija, inverzija itd. iz razloga što je ovom metodom moguća detekcija točkastih mutacija samo u restrikcijskom mjestu te time nije pouzdana metoda za detekciju drugih točkastih mutacija. Ako postoji mutacija u specifičnoj sekvenci koju cijepa enzim, neće doći do cijepanja DNA (nastaje velik fragment DNA). S druge strane, mutacija može uzrokovati

nastajanje novog restrikcijskog mjesta pa time dolazi do dodatnog cijepanja DNA (nastajanje manjih fragmenata). Ove promjene detektiraju se kao polimorfizmi nakon usporedbe sa standardom pomoću elektroforeze te Southern blottinga. Southern blotting metoda je hibridizacije s obilježenom probom (komplementarna sekvenca DNA) na membrani nakon provedene elektroforeze. Služi za detekciju prisutnosti DNA sekvence od interesa u nekom uzorku. Naposljetku, analiza polimorfizma jednolančane DNA (SSCP, od eng. single strand conformation polymorphism) daje uvid u razliku između dvije jednolančane DNA jednake duljine ali različitih sekvenca nukleotida. Služi za detekciju točkastih mutacija te se za fragmente duljine od 200 do 300 nukleotida može detektirati oko 70% različitih točkastih mutacija. Detekcija se vrši pomoću elektroforeze u denaturirajućim uvjetima pri čemu jednolančane DNA formiraju različite konformacije (zbog razlika u slijedu nukleotida) te time različito putuju kroz gel (10. predavanje iz kolegija Genetičko inženjerstvo, 2015). Svrha provođenja navedenih metoda je detekcija nestabilnosti u tumorskoj DNA usporedbom zdrave i tumorske DNA.

5.2. PROMATRAN EKSPERIMENTALNI RAD VEZAN UZ GENSKE NESTABILNOSTI U GLIOBLASTOMA

Prvi rad kojem sam posvetila pažnju govori o molekularnim mehanizmima koji su povezani s kromosomskom i mikrosatelitnom nestabilnošću u sporadičnih GBM-a te obuhvaća neke od najčešće viđanih i istraživanih promjena u GBM-a. Naime, Martinez i sur., (2004) fokusirali su se na genske nestabilnosti koje igraju ključnu ulogu u patogenezi mnogih tumora te na proteine MMR sustava koji igraju važnu ulogu u održavanju stabilnosti DNA. Kada govorimo o promatranim genskim nestabilnostima, istraživani su CIN i MSI. Sveobuhvatna analiza molekularnih promjena povezanih s MSI, utjecaj MMR sustava i povezanost s CIN nije još bila provedena za GBM-e, već je samo opisana MSI za mali broj tumora ili je za analizu korišteno samo nekoliko polimorfnih ponavljanja. Stoga, Martinez i sur., (2004) analizirali su 109 novodijagnosticiranih GBM-a i 20 recidiva. Provodili su sljedeće: analizu MSI za 15 polimorfnih ponavljanja, imunohistokemiju za proteine MMR sustava (hMLH1, hPMS2, hMSH2 i hMSH6) i screening mutacija za gen *hMLH1*. Također su proveli analizu metilacije promotora *hMLH1* gena. Naime, metilacija je epigenetska promjena koja dovodi do utišavanja tog gena te se smatra povezanom s nastajanjem MSI fenotipa. Također, u svrhu jasnije ovisnosti između MSI i CIN, proveli su sljedeće: analizu LOH-a za lokuse *PTEN* i *TP53* uključene u patogenezu GBM-a (tumor supresorski geni), screening mutacija za gene *TP53* i *PTEN* te analizu amplifikacije *EFGR*-a. Kako bi dobili željene rezultate, navedene metode

paralelno su provodili za tumorsku i zdravu DNA te nakon detekcije MSI za tumore u kojima je MSI prisutna, odnosno izuzeta, radi usporedbe.

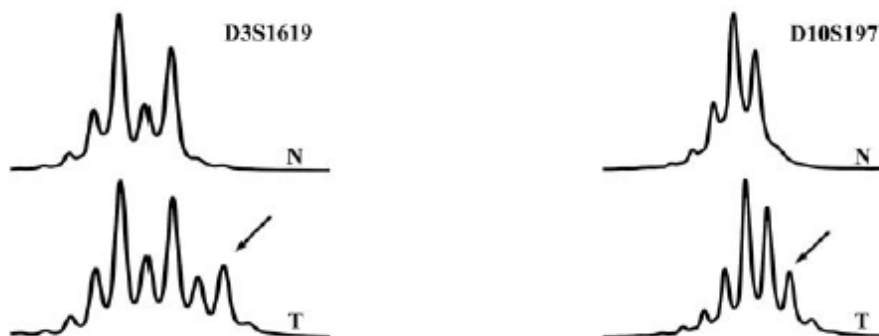
5.2.1. PROVOĐENJE ANALIZA

Što se tiče MSI analize, prethodno opisanom načinom PCR-a umnožili su fragmente DNA izolirane iz krvi te iz GBM-a koristeći 15 različitih početnica. Umnoženo je 6 vrsta mononukleotidnih ponavljanja, 8 vrsta dinukleotidnih i jedno tetranukleotidno ponavljanje. Nakon umnažanja, provedena je poliakrilamidna gel elektroforeza te analiza pogodnim software-om. Dobivene krivulje nakon analize upućuju na MSI ako su vidljivi pikovi (viška) u usporedbi s krivuljom normalne DNA. Sljedeća provedena analiza bila je imunohistokemija MMR proteina. Uzorci koji sadrže ispitivane fragmente DNA (antigeni) tretirani su odgovarajućim puferima te se proveo dodatak BSA proteina koji blokiraju nespecifično vezanje protutijela. Nakon toga, uzorci su inkubirani preko noći zajedno s mišjim monoklonskim protutijelima (IgG) od kojih je svako protutijelo specifično za jedan od fragmenata/antigena. Detekcija prisutnosti antigena omogućena je na temelju vezanja sekundarnog antitijela na spomenuto primarno antitijelo (IgG) pri čemu sekundarno antitijelo još na sebe veže molekulu koja omogućuje detekciju. Stanice u kojima nije detektirana ili je smanjena prisutnost analiziranih fragmenata/antigena nakon detekcije smatraju se promjenjene. Treća analiza, screening mutacija za gene *hMLH1*, *TP53* i *PTEN*, provela se sekvencioniranjem eksona i ekson-intron granica za navedene gene. Nadalje, status metilacije *hMLH1* promotora, određivan je cijepanjem DNA restrikcijским endonukleazama. Korišten je HpaII enzim osjetljiv na metiliranu DNA (ne može pocijepati DNA ako je ona metilirana na mjestu koji cijepa) i MspI koji nije osjetljiv na metiliranu DNA (Kessler i Manta, 1990). Nakon cijepanja, dobivene sekvence umnožene su PCR-om te podvrgnute analizi elektroforezom. Zatim, analiza LOH-a provedena je za lokus *PTEN* promatranjem pozicija 23 i 24 na duljem kraku kromosoma 10 (10q23-24) pomoću sljedećih markera za *PTEN*: dva markera za bočne regije *PTEN*, intrageniski marker *PTENCA* i dva markera za centromerne i telomerne regije u odnosu na *PTEN*. Također je provedena i analiza LOH-a za lokus *TP53* tako da su za poziciju 13 kraćeg kraka kromosoma 17 (17p13) korišteni markeri: *TP53* marker i intrageniski *TP53* marker. Navedeni markeri umnoženi su PCR-om pomoću početnica te analizirani na elektroforezi. Naposljetku, za otkrivanje amplifikacije *EGFR*-a korištena je PCR metoda gdje se umnažao gen transmembranskog regulatora cistične fibroze (*CFTR*, od eng. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Naime, *CFTR* gen općenito inhibira ekspresiju *EGFR*-a te ako je nakon analize omjer *EGFR/CFTR* veći nego što

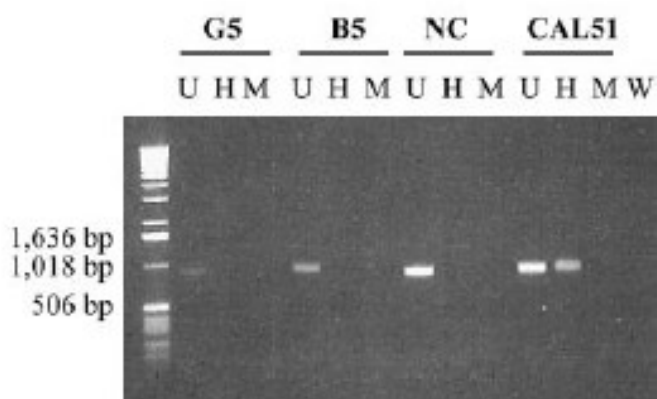
je to u zdravom tkivu, može se zaključiti da je višak kopija *EGFR* gena, odnosno došlo je do amplifikacije (Martinez i sur., 2010).

5.2.2. REZULTATI

Nakon analize, definirane su tri kategorije MSI: MSI visoke razine (MSI-H), MSI niske razine (MSI-L) i mikrosatelitna stabilnost (MSS, bez MSI). Rezultati su ukazali da je ukupni postotak prisutnosti MSI (MSI+ GBM-i) 8,5% (11/129 pacijenta), s time da je riječ o 11 "divovskih stanica" tumora. Postotak MSI-L iznosio je 5,5% za novodijagnosticirane GBM-e te 25% za recidive, dok MSI-H nije uočena. Najnestabilnijima su se pokazali dinukleotidni markeri, dulja ponavljanja kao tetranukleotid mutirala su povremeno, a mononukleotidna nestabilnost nije uočena. Primjeri uočene MSI vidljivi su na slici 4. Kako je među analiziranim tumorima bilo pacijenata s primarnim i sekundarnim GBM-om, uočen je veći udio MSI za sekundarne GBM-e nego za de novo GBM-e. Što se tiče imunohistokemije, 10/11 MSI+ GBM-a pokazalo je pozitivan rezultat na MMR proteine, dok je u samo jednom pronađen gubitak hPMS2 i smanjena ekspresija hMLH1. Sve "ne-divovske" stanice bile su pozitivne na sve MMR proteine. Također, analizom ekspresije hMLH1 proteina usporedbom "divovskih" i "ne-divovskih" stanica utvrđeno je značajno smanjenje ekspresije hMLH1 u "divovskih stanica". S druge strane, metilacija promotora *hMLH1* nije pronađena (slika 5.), kao ni mutacije gena *hMLH1* nakon sekvencioniranja.



Slika 4. Prikaz rezultata analize MSI za dinukleotidne markere D3S1619 i D10S197. N označava konstitutivnu, zdravu DNA a T predstavlja tumorsku DNA. Strijelice prikazuju nove pikove detektirane u tumorskoj DNA. Oni se objašnjavaju kao promjena u broju ponavljajućih sekvenci, točnije povećanje broja ponavljanja (inercije).



Slika 5. Rezultat analize metilacije *hMLH1* promotora.

U- nepocijepana DNA, NC- negativna kontrola (DNA zdrave osobe), CAL51- stanica raka dojke u kojoj je pronađena metilacija *hMLH1* promotora (pozitivna kontrola), G5- testirana DNA iz "divovske stanice" GBM-a, H- cijepanje od strane HpaII, M- cijepanje od strane MspI. Nije došlo do metilacije *hMLH1* promotora s obzirom da na gelu nakon cijepanja s HpaII nije vidljiv fragment promotora (metilacija nije blokirala njegovo djelovanje).

Tablica 1. Rezultati analize genskih promjena povezanih s kromosomskom nestabilnošću te rezultati analize amplifikacije *EGFR*-a usporedbom 11 MSI+ i 26 MSS GBM-a izraženi u postocima.

	LOH <i>p53</i>	Mut. <i>p53</i>	<i>EGFR</i> amplification	LOH <i>PTEN</i>	Mut. <i>PTEN</i>
MSI+ GBM	3/11 (27.3%)	1/11 (9.1%)	4/11 (36.4%)	8/11 (72.7%)	2/11 (18.2%)
MSS GBM	4/26 (15.4%)	7/26 (26.9%)	12/26 (46.2%)	21/26 (80.8%)	12/26 (46.2%)

Mut. = Mutation.

Mutacije u *TP53* pronađene su u jednom MSI+ pacijentu i to: zamjene para baza na petom eksonu za kodon 175 (CGC→CAC, posljedično zamjena arginina histidinom) te šestom eksonu za kodon 199 (GGA→AGA, zamjena glicina argininom) zajedno s LOH-om na 17p13. LOH je također pronađen za još 2 MSI+ GBM-a na 17p13, ali bez prisutnosti mutacija za *TP53* te za 4 MSS GBM-a. Kao što je vidljivo za MSS tumore, mutacije za *TP53* bile su učestalije (sveukupno 7 mutacija) i to: 6 zamjena para baza na drugom, četvrtom i osmom eksonu što je u ovom slučaju dovelo do zamjene pet aminokiselina te delecija na sedmom

eksonu. Što se tiče gena *PTEN*, 2 MSI+ slučaja pokazala su mutacije na petom eksonu dok je u MSS GBM-a učestalost *PTEN* mutacija veća. Riječ je o 10 zamjena para baza na drugom, petom, šestom i sedmom eksonu što je predviđanjem dovelo do zamjena 8 aminokiselina. Također je došlo do dvije heterozigotnosti nastale mutacijom spojnog mjesta na petom eksonu (promjena broja nukleotida nepravilnim izrezivanjem introna u pre-mRNA prilikom njenog procesiranja u mRNA) (Berget, 1995). Valja nadodati kako je učestalost *PTEN* mutacija bila veća za MSS primarne GBM-e i MSS recidive nego za MSI+ tumore dok je LOH na 10q23-24 pronađen u oba tumora s većim postotkom za MSS GBM-e. Što se tiče amplifikacije *EGFR*-a, rezultati su pokazali kako je omjer *EGFR/CFTR* veći od normalnog za 4 MSI+ i 12 MSS tumora što upućuje na amplifikaciju *EGFR*-a. Amplifikacija je općenito bila učestalija u MSI+ tumorima ali je jača (većeg stupnja) za primarne tumore MSS tipa u usporedbi s MSI+ tipom.

5.2.3. ZAKLJUČAK RADA

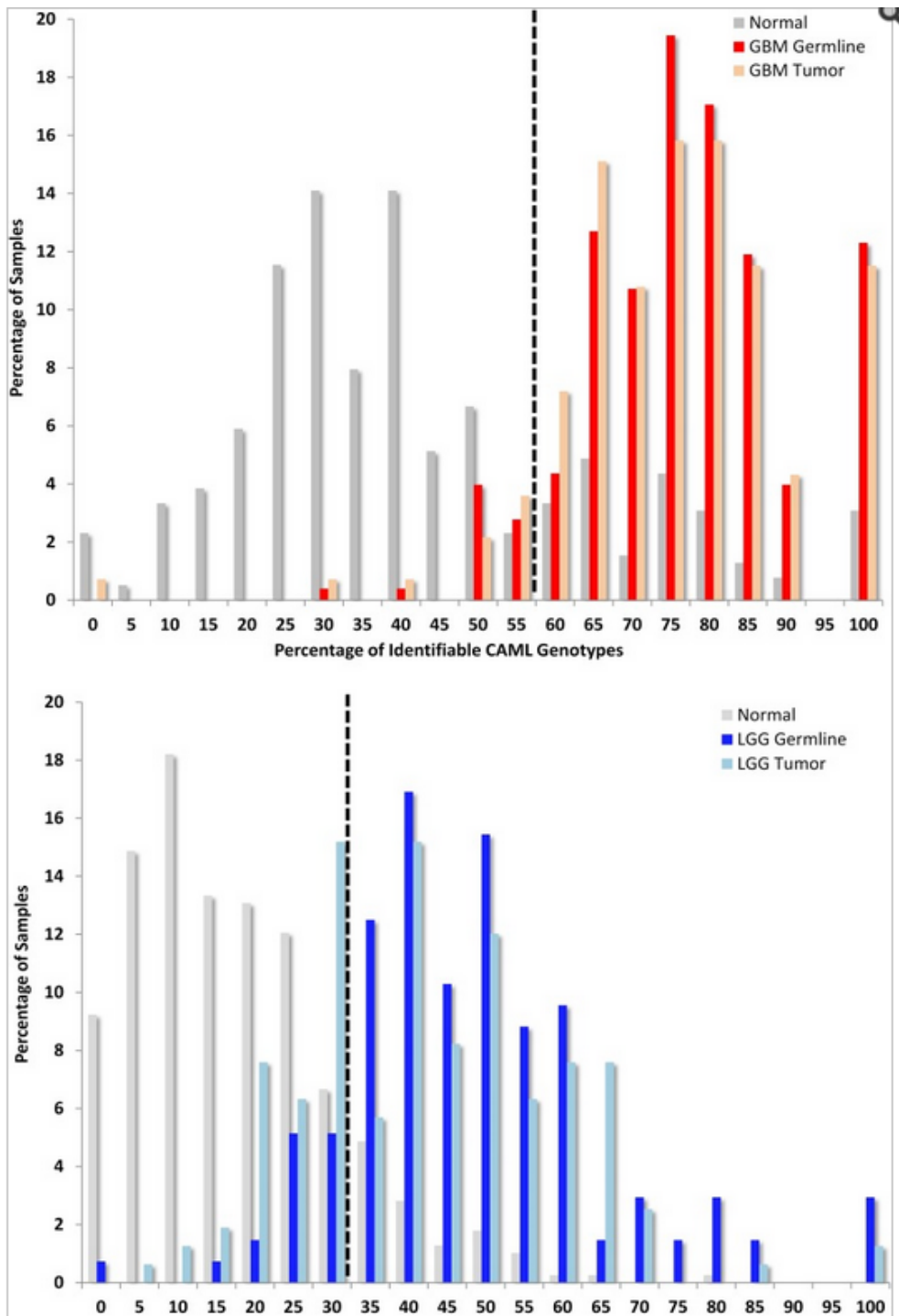
Kao zaključak valja istaknuti nekoliko činjenica koje proizlaze iz rada Martineza i sur., (2004). Učestalost MSI veća je za pacijente koji su prethodno liječeni za astrocitome stupnja II ili III, nego za *de novo* GBM-e što ukazuje na vezu između MSI i razvoja tumora nižeg stupnja u GBM. Nadalje, samo "divovska stanica" pokazala je nenormalnu ekspresiju MMR proteina. Riječ je o stanicama koje su subtip, posebna varijanta normalnih GBM stanica te čine oko 5% ukupnih GBM stanica. Zajedno čine rijetku neoplazmu karakteriziranu dominacijom neobičnih multinukleinskih "divovskih stanica" s obilnom citoplazmom (Kozak i Moody, 2009). Iako metilacija i mutacije promotora *hMLH1* nisu nađene, njihova prisutnost u "divovskim stanicama" ne treba se isključiti s obzirom na histološke karakteristike tih stanica i činjenicu da je ekspresija tog promotora utišana. Što se tiče MMR proteina, za većinu MSI+ tumora ekspresija im je pozitivna, što pokazuje sličnost s istraživanjima želučanih karcinoma (prema Katabuchi i sur., 1995). Ovakav rezultat dovodi do toga da bi se pojava MSI za većinu analiziranih GBM-a mogla opisati kao posljedica inaktivacije nekih manjih gena MMR sustava koji ovdje nisu analizirani, npr. *hMSH3* i *hPMS1* (prema Marra i sur., 1998). Nadalje, uočena je inverzna povezanost između MSI i mutacija u *TP53* jer je učestalost tih mutacija manja za MSI+ GBM-e u odnosu na MSS GBM-e. Kao dodatak, samo su "missense" mutacije u *TP53* uočene, dok delecije i insercije u ponovljenih baza nisu. Također, mutacije u *TP53* detektirane su samo za MSI+ "divovske stanice" što je i tipično za taj subtip stanica (Peraud i sur., 1999). Mutacije u *PTEN* također su pokazale obrnutu povezanost s MSI te nije uočena mutacija na osmom eksonu česta za MSI+ tumore – mutacija u poli-

adeninskom ponavljanju. Prema tome, GBM se razlikuje od ostalih tumora koji pokazuju ovakvu mutacija u *PTEN*, kao što je tumor endometrija (prema Kong i sur., 1997). LOH kao promatrani CIN put detektiran je i smatra se kao jedan od razloga koji dovodi do nestabilnosti gena *TP53* i *PTEN*. Nadalje, amplifikacija *EGFR*-a bila je češća u MSI+ recidivima, nego u MSS te ovakva povezanost prije nije dokumentirana. Što se tiče vremenske povezanosti između MSI i razvoja tumora teško je doći do točnog zaključka. U ovom radu, učestalost MSI bila je veća za recidive u odnosu na primarne GBM-e, no kako su svi pacijenti bili izloženi zračenju nakon operacije, može biti da je došlo do oštećenja induciranih zračenjem. S druge strane, sekvencioniranjem nisu uočene promjene poput delecije para baza koje inače nastaju oštećenjem DNA od strane zračenja što je i u skladu s prijašnjim radovima. Stoga, povećana učestalost MSI u recidivima može se objasniti kao mutatorski fenotip koji je predispozicija za vraćanje, progresiju tumora, ali upitno je koliko doprinosi samoj kancerogenezi. Također, dosad navedeno upućuje kako MSI i CIN doprinose stanju genske nestabilnosti u GBM-a, no riječ je o nezavisnim putevima s obzirom na inverzan odnos između MSI i mutacija u *TP53* i *PTEN* (Martinez i sur., 2004).

5.3. PROMATRANA DOSTIGNUĆA VEZANA UZ POJAVU MIKROSATELITNE NESTABILNOSTI U GLIOBLASTOMA

5.3.1. MIKROSATELITNI LOKUSI KAO MARKERI

U sljedećem promatranom radu, Karunasena i sur., (2014) krenuli su od hipoteze da varijabilnost mikrosatelita može pomoći u boljem razumijevanju glioma te dati saznanja o predispoziciji za razvoj glioma. Fokus je bio na analizi DNA iz "germlines", što se može prevesti kao stanica klica. Sekvencionirana zdrava "germline" DNA uspoređivana je sa sekvencama "germline" tumorske DNA i same tumorske DNA pacijenata oboljelih od glioma stupnja II i III (136 pacijenata) te stupnja IV, GBM-a (252 pacijenta). Svrha je bila identificirati lokuse mikrosatelita za koje je poznato da su povezani s određenim gliomima, specifični za određene gliome (CAMLs, od eng. cancer-associated microsatellite loci) i koji se razlikuju od zdrave DNA. Dakle, riječ je o ne-nasumičnoj identifikaciji. Što se tiče "germline" DNA, identificirano je 48 specifična lokusa za GBM (GBM CAMLs), 42 CAMLs glioma nižeg stupnja te 29 CAMLs koji razlikuju GBM od glioma nižeg stupnja. Postotci detektiranih CAMLs u pojedinim tumorima prikazani su na slici 6.



Slika 6. Ovisnost postotka analiziranih uzoraka u kojima je detektiran određeni udio poznatih CAMLs genotipova. Gornji prikaz je udio detektiranih CAMLs specifičnih za GBM-e (postotak detektiranih genotipova od ukupno mogućih) za zdravu DNA, GBM "germline" DNA i GBM DNA (sukladno s mapom u desnom kutu slike). 19% GBM "germline" DNA sadrži > 75% GBM CAMLs genotipova te 16% tumorske DNA također sadrži >75% tih lokusa. Svi specifični lokusi za GBM, znači 100% GBM CAMLs, nađeni su u 12% GBM

"germlines" dok je samo 3% zdrave DNA pokazalo slične rezultate. Donji prikaz je udio detektiranih CAMLs specifičnih za gliome nižeg stupnja u zdravoj DNA, "germlines" DNA glioma nižeg stupnja te DNA glioma nižeg stupnja. Najveći postotak od približno 18% "germlines" DNA ima 40-50% CAMLs genotipova specifičnih za gliome nižeg stupnja te malo niži postotak tumorske DNA ima iste postotke navedenih CAMLs. 100%-tni CAMLs nađeni su za 3% "germlines" tumorske DNA te za nijedan uzorak zdrave DNA.

Također, pronađena je razlika između glioma stupnja II (67 pacijenata) i GBM-a i to u 8 lokusa. Kao što i slika prikazuje, uočena je razlika u lokusima mikrosatelita zdrave "germlines" DNA i tumorske "germlines" DNA. S druge strane, usporedbom "germlines" tumorske DNA i njoj pripadajuće tumorske DNA, u svih glioma, nije pronađena značajna razlika u CAMLs, odnosno varijabilnost mikrosatelita ostala je očuvana.

Nadalje, u svrhu boljeg razumijevanja važnosti navedenih CAMLs, Karunasena i sur., (2014) identificirali su biološke procese u koje su uključeni geni s takvim lokusima. Rezultati analize upućuju na to da neki od analiziranih gena u kojima su viđeni CAMLs utječu na procesiranje RNA i ubikvitin proteasom sistem. Obje navedene funkcije važne su za identifikaciju i degradaciju/ispravljavanje nepravilno spakiranih makromolekula (DNA, RNA, proteina) te je nefunkcionalan ubikvitin proteasom sistem često povezan s gliomima i neuropatijom (oštećenje živaca). Jednako tako, pronađeno je 6 modificiranih gena za helikaze (enzimi zaslužni za razdvajanje lanaca nukleinskih kiselina u procesima replikacije, transkripcije, translacije, popravka DNA itd.) koji sadrže GBM CAMLs. Nadalje, uspoređivali su ekspresiju gena koji sadrže CAMLs s pripadajućim normalnim genima te je pronađena smanjena ili pretjerana ekspresija za neke od gena. Zatim, za poznate gene čije mutacije doprinose gliomogenezi (npr, *IDH-1* te MMR geni) analizirali su prisutnost CAMLs. Za uzorke GBM-a u tim genima nađeno je 80% GBM CAMLs genotipova, a za gliome nižeg stupnja 60% CAMLs glioma nižeg stupnja, neovisno o broju mutacija u analiziranim genima. Samo za pojedince s više od 5 mutacija, uočeno je povećanje CAMLs što upućuje na stanje cjeloukupne nestabilnosti genoma tih pojedinaca. Važno je reći kako je bilo minimalno prisutnih mutacija za MMR gene u GBM-a i glioma nižeg stupnja u odnosu na prethodno navedene CAMLs u helikazama. To dovodi do toga da su helikaze u usporedbi s MMR-om od značajnog utjecaja pri održavanju stabilnosti DNA te mutacije u njima doprinose gliomogenezi. Također, moguće je kako je nedovoljno istraženih proteina MMR sustava koji bi također imali značajan utjecaj. Nadalje, za gene *BRWD2* (tumor supresorski gen) i *FGFR2*

(onkogen) pronađeni su GBM CAMLs. Ovi geni smješteni su kao par na lokusu gdje delecijom *FGFR2* dolazi do inaktivacije *BRWD2*, stoga specifični GBM CAMLs za ove gene mogu poslužiti kao markeri za razvoj GBM-a. Zaključno, CAMLs se smatraju komponentama koje specifično obilježavaju različite stupnjeve glioma i tako omogućuju razliku između stupnjeva. Također, čine razliku između zdravog pojedinca i pojedinca s tumorom. S druge strane, kako su za oboljele pacijente CAMLs isti za "germline" i tumorsku DNA (očuvana varijabilnost) može se zaključiti da postoje glioma inicirajuće populacije stanica i svojstvene su za pojedinca i bolest. Stoga, kako se pomoću CAMLs mogu detektirati stanice porijekla glioma, ti lokusi mogu poslužiti kao geni markeri. One gene u "germline" DNA čiju mikrosatelitnu varijabilnost treba istraživati su: geni važni za preživljavanje stanica tumora, geni koji doprinose tumorskom fenotipu (invaziji, heterogenosti i agresivnosti) te tkivno specifični geni (geni povezani sa samo jednim tipom tumora ili tkivom porijekla). Time se može predvidjeti rizik ili predispozicija za razvoj specifičnog tumora i sama progresija tumora (stupanj) te bolje planirati terapija u novodijagnosticiranih pacijenata (Karunasena i sur., 2014).

5.3.2. POVEZANOST NESTABILNOSTI PROTEINA MISMATCH REPAIR SUSTAVA S MIKROSATELITNOM NESTABILNOŠĆU PRI OTPORNOSTI GLIOBLASTOMA NA TERAPIJU

Sljedeće što želim istaknuti na temelju promatranih radova je kako se za terapiju liječenja GBM-a često koristi citotoksični alkilirajući agens temozolomid (TMZ). Riječ je o oralnom kemoterapijskom sredstvu koje povećava stopu preživljavanja oboljelih pacijenata od GBM-a. Funkcionira na način da sprječava nastanak nove DNA u tumorskim stanicama i time ne dolazi do diobe, umnažanja tumorskih stanica. Postotak preživljenja od 2 godine za pacijente podvrgnute zračenju u kombinaciji s TMZ kemoterapijom iznosi 26,5%, dok je taj postotak za pacijente koji prolaze samo zračenje 10,4% (Stupp i sur., 2005). Problem je u tome što se GBM ponovno vraća i to u rezistentnoj formi nakon tretmana TMZ-om. Iz tog razloga znanstvenici su u zadnjih nekoliko godina istraživali utjecaj genskih nestabilnosti na otpornost GBM-a pri liječenju TMZ-om. Primjerice, istraživali su nestabilnosti proteina MMR sustava *MSH6* i *MSH2* te povezanost tih nestabilnosti s MSI (Yip i sur., 2009 te McFaline-Figueroa i sur., 2015). Prvenstveno, Yip i sur., (2009) paralelno su analizirali lokus *MSH6* i provodili detekciju MSI u GBM-a prije i nakon tretmana TMZ-om. Pri analizi *MSH6*, provodili su PCR i sekvencioniranje, a za detekciju MSI provodili su PCR i analizu odgovarajućim software-om. Također, analizom *in vitro* promatrali su kako inaktivacija *MSH6* gena utječe na ishod

tretmana TMZ-om. Rezultat istraživanja bile su mutacije u *MSH6* genu za GBM-e tretirane TMZ-om, ali ne i za netretirane GBM-e. Odsutnost mutacija prije tretmana TMZ-om ukazuje na to da *MSH6* mutacije ne doprinose samoj kancerogenezi, već da je riječ o *de novo* promjenama u već razvijenom GBM-u. Magnetskom rezonancom utvrđeno je da tumori u kojima ne dolazi do *MSH6* mutacija pokazuju napredak u liječenju, dok oni u kojima se mutacije ispoljavaju postoji rezistentnost na TMZ i nema napretka pri liječenju. Nadalje, *in vitro* rekonstrukcija ekspresije *MSH6* gena dovela je do ponovne osjetljivosti na TMZ. Što se tiče MSI, detektirana su samo dva manja pomaka u lokusima za dva slučaja te nije detektirana MSI-H. Sukladno s prethodnim istraživanjima, MSI nije povezana s mutatorskim fenotipom *MSH6* (prema Maxwell i sur., 2008). Naime, u radu Yip i sur., (2009) za lokus *MSH6*, riječ je o mutatorskom fenotipu gdje dolazi do tranzicije nukleotida C u T (C:G>T:A) i to najčešće na mjestu CpC (dinukleotidni slijed citozina). Stoga, mutacije u *MSH6* u skladu su s njegovom inaktivacijom, odnosno mutatorskim fenotipom i nisu uzrokovane promjenama u duljini mikrosatelita. Zaključak rada je kako uloga *MSH6* u tretmanu TMZ-om nije povezana s MSI te inaktivacija *MSH6* dovodi do rezistentnosti na liječenje TMZ-om, odnosno razlog je povratka GBM-a. Iz tog razloga, važno je sekvencioniranje gena u svrhu otkrivanja sličnih mehanizama koji će pomoći u budućem tretiranju GBM pacijenata (Yip i sur., 2009). Također, McFaline-Figueroa i sur., (2015) detektirali su sličnu korelaciju, samo za gen *MSH2*. *In vitro* analizom te analizom stanica GBM-a u ljudi nakon TMZ tretmana, detektirali su smanjenje ekspresije *MSH2*. Uočeno je da prisutnost smanjenja ekspresije dovodi do rezistencije na TMZ. U uvjetima *in vitro*, bilo je potrebno iznimno malo smanjenje *MSH2* proteina za pojavu rezistencije. S druge strane, u recidivima GBM-a, detektirana je odsutnost MSI (standardni marker nedostatka funkcionalnih MMR proteina) što je dovelo do sumnje da MMR ipak ne utječe na pojavu rezistentnog fenotipa recidiva. S druge strane, puno radova kao i ovaj pokazuje nedostatak MMR proteina u recidivima GBM-a (prema Felsberg i sur., 2011 te Stark i sur., 2015). U skladu s ovim i ostalim radovima, pretpostavlja se da je riječ o mehanizmu koji dovodi do rezistencije na TMZ, no pri tome ne dolazi do pojave MSI (McFaline-Figueroa i sur., 2015). Zaključno, promatranjem ekspresije i *MSH6* i *MSH2*, bez obzira na odsustvo MSI, može se predvidjeti odgovor pacijenta na tretman TMZ-om pri liječenju GBM-a (Yip i sur., 2009 te McFaline-Figueroa i sur., 2015).

5.4. PROMATRANA DOSTIGNUĆA VEZANA UZ GUBITAK HETEROZIGOTNOSTI U GLIOBLASTOMA

5.4.1. GUBITAK HETEROZIGOTNOSTI NA KROMOSOMIMA 10 I 17

Što se tiče istraživanja vezanih uz LOH, LOH na kromosomu 10 najčešća je genska promjena (učestalost 61%) nađena u primarnih i sekundarnih GBM-a te se smatra kasnim događajem u sekundarnim GBM-ima. Jednako tako, povezan je s lošijom stopom preživljavanja pacijenata jer su različite regije izgubljene na kromosomu 10, kao što je tumor supresorski gen *PTEN*. Naime, smatra se da izgubljene regije sadrže još nedetektiranih tumor supresorskih gena koje bi trebalo identificirati. Vezano uz pojavu LOH-a, Fults i sur., (1992) analizirali su 45 pacijenata različitih stupnjeva astrocitoma. Provodili su RFLP za kromosome 10 i 17 kako bi detektirali LOH. Isto tako, provodili su analizu mutacija tumor supresorskog gena *TP53* metodom SSCP te sekvencioniranjem. RFLP analizom različitih lokusa na kromosomima 10 i 17 uočen je LOH. LOH na 17p pronađen je u 40% malignih astrocitoma. Mutacije za *TP53* pronađene su u 28% (7/25) GBM-a, 36% anaplastičnih astrocitoma (5/14) te nijedna u astrocitoma nižeg stupnja. U 62% pacijenata s pronađenim LOH-om na 17p nađene su i mutacije za *TP53*. Stoga, smatra se da su mutacije povezane s LOH-om na 17p, pri čemu je jedna kopija gena *TP53* uklonjena kromosomskom delecijom (LOH) a druga kopija inaktivirana mutacijom. Zaključno, inaktivacija *TP53* čest je događaj prilikom progresije astrocitoma te navedene promjene mogu služiti kao signal tranzicije benignih astrocitoma u maligne. Što se tiče LOH-a na kromosomu 10, detektiran je u 61% GBM-a, 23% anaplastična te u nijednom astrocitomu nižeg stupnja. Također, LOH na kromosomu 10 pojavljuje se zajedno s mutacijama u *TP53* samo u GBM-a (učestalost 22%). Ova korelacija upućuje na to kako navedeni događaji uzrokuju progresiju tumora u zadnju fazu (GBM). S druge strane, ova dva događaja nisu nađena istovremeno za sve GBM-e i to se može objasniti time kako postoji više puteva koji uzrokuju progresiju tumora u zadnju fazu, pri čemu su LOH na kromosomu 10 i mutacije u *TP53* nezavisni putevi (Fults i sur., 1992).

5.4.2. GUBITAK HETEROZIGOTNOSTI NA KROMOSOMU 9

Nadalje, osim za opisane kromosome 10 i 17, uočen je LOH na kromosomu 9p kao tipična molekularna pojava u GBM-a. Ono što nije dokazano je povezanost LOH-a na 9p s lošijom stopom preživljavanja GBM pacijenata. U tu svrhu, Huang i sur., (2015) obradili su podatke 13 znanstvenih radova objavljenih do 2015. vezanih uz navedenu temu te je u radovima sveukupno analizirano 1465 glioma. Analiza glioma je pokazala da postoji značajna

povezanost LOH-a na 9p s lošijom prognozom pacijenata oboljelih od glioma dok je analiza subtipova glioma pokazala značajnu povezanost LOH-a na 9p s lošijom prognozom GBM pacijenata. Dakle, LOH na 9p koristan je marker pri predviđanju preživljavanja pacijenata (Huang i sur., 2015). Naime, kromosom 9p sadrži gene poput *CDKN2A* i *CDKN2B*. Navedeni geni kodiraju za tri važna tumor supresora, p14ARF, p16INK4A i p15INK4B koji igraju važnu ulogu u reguliranju staničnog ciklusa. Delecija *CDKN2A* i *CDKN2B* rezultira delecijom *CDKN2C* na kromosomu 1p32 koji pak kodira za još jedan protein staničnog ciklusa, p18INK4C. LOH na 1p kromosomu nađen je i u primarnih i sekundarnih GBM-a (Bleeker i sur., 2012). Stoga, LOH na jednom kromosomu posljedično uzrokuje niz nestabilnosti u stanici.

5.4.3. ANALIZA STOPE PREŽIVLJAVANJA S OBZIROM NA UČESTALOST GUBITKA HETEROZIGOTNOSTI ODREĐENIH REGIJA

Nasuprot spomenutog LOH-a na 9p koji predstavlja marker lošije prognoze za pacijente, također je detektiran LOH na 19q u GBM-a i u korelaciji je s boljom stopom preživljavanja. To su u svom radu pokazali Burton i sur., (2002) gdje su okarakterizirali 39 tumora rijetkih pacijenata s većom stopom preživljavanja (>3 godine) koristeći gensku hibridizaciju. Usporedili su učestalost i tip nestabilnosti tih tumora s 24 tumora tipičnih ili kraće preživjelih pacijenata (<1,5 godina). U grupi kraće preživjelih detektirana je povećana učestalost LOH-a na kromosomima 9p i 10 te povećana učestalost LOH-a na 6q. Također, za ovu grupu detektiran je dobitak kopije 19q kromosoma. S druge strane, za grupu duže preživjelih detektiran je LOH na 19q što dovodi do toga da je LOH na 19q u korelaciji s dužim preživljavanjem pacijenata. Time je broj kopija 19q koristan marker pri predviđanju stope preživljavanja pacijenata. Što se tiče spomenutog LOH-a na 6q, on se povezuje s mnogim malignim tumorima te je u ovom radu nađeno čak 5 različitih izgubljenih regija na tom kromosomu. S druge strane, iako je LOH na 6q bio učestaliji u kraće preživjelih pacijenata, razlika u učestalosti za analizirane grupe preživjelih nije dostigla statističku važnost. Ponekad, dolazi do istovremene delecije u kromosoma 1p i 19q, no to nije u korelaciji s produljenim vijekom pacijenata (Burton i sur., 2002).

6. ZAKLJUČAK

Postoji sve više dokaza kako je razlog neuspješnog liječenja GBM-a njegova molekularna heterogenost. Heterogenost se očituje ne samo unutar tumorskih stanica kao niz genskih promjena tokom vremena već i u vanjskim morfološkim karakteristikama tumora. Mala je vjerojatnost da se kod pacijenata može terapijom uspješno naciljati isti specifični stanični ili genski događaj. Sve to predstavlja veliki izazov u razvoju uspješnih terapija za liječenje (Weathers i Gilbert, 2014). U tu svrhu, provode se mnoge analize koje pokušavaju razvrstati tumorske profile u podrazrede kako bi se na temelju karakteristika podrazreda terapijom naciljali ključni događaji. TCGA (od eng. The Cancer Genome Atlas) je tako na temelju molekularnih abnormalnosti GBM-a definirao podrazrede: proneurološki, neurološki, klasični i mezenhimski GBM. Svaki podrazred razlikuje se s obzirom na genske, epigenetske i transkripcijske karakteristike (Verhaak i sur., 2010). Naime, klasifikacija se i dalje razvija, u novije vrijeme uključuje i širu grupu od 6 podrazreda u koje je uključen i pedijatrijski GBM (Sturm i sur., 2012). Značaj ovih podrazreda u prognozi i samoj terapiji je trenutno nejasan i ima malu ulogu, no svakako pobuđuje važnost tumorskog profiliranja u budućnosti (Weathers i Gilbert, 2014). Svaki pacijent zahtijeva specifičnu terapiju pri čemu i dalje postoji velika mogućnost razvoja otpornosti na terapiju. Istraživanja bi se trebala usmjeriti na praćenje procesa evolucije GBM-a, tj. njegovu gensku pozadinu (genotip) individualno za pacijenta kako bi se taj proces kontrolirao i zaustavio prije dostizanja konačne faze. Posebno je bitno istraživanje molekularnih biljega, ne samo u svrhu postavljanja što ispravnije dijagnoze, već i posljedičnog planiranja što učinkovitije terapije (Wang i sur., 2015). Analiza mutacija i njihov odnos s fenotipom tumora i ishodom liječenja trebala bi obuhvaćati lokuse tumor supresorskih gena poput *TP53*, pojavu LOH-a, prisutnost spomenutih CAMLs, metilacije specifičnih promotora i sl. Naravno, za to je potrebno provoditi detaljne genske analize što dovodi do potrebe za razvojem novih poboljšanih tehnologija. Već spomenute metode poput PCR-a, SSCP-a, sekvencioniranja itd. zasad predstavljaju zlatni standard za identifikaciju genskih promjena, no one nisu prikladne za kliničku praksu jer zahtijevaju puno vremena i rada. Isto tako, te metode nisu najprikladnije za procjenu LOH-a, stoga se razvijaju nove tehnike koje bi mogle olakšati rutinske analize, kao što je metoda bazirana na mikročipovima (Weathers i Gilbert, 2014). U zadnjih 20 godina istražuje se posebna disciplina pri liječenju GBM-a, a to je genska terapija. Riječ je o eksperimentalnoj tehnici koja koristi unošenje DNA u stanice pacijenta u svrhu liječenja. Kada govorimo o GBM-u, dosad je istraženo unošenje genskog materijala (gena) u tumor u

svrhu ubijanja tumorskih stanica ili pobuđivanja imunog sustava protiv tumorskih stanica (tumor supresorski geni, "samoubojice" geni, replicirajući onkolitički virusi itd.) (Kwiatkowska i sur., 2013). Cilj ovog rada bio je iznijeti neka od dosadašnjih istraživanja u području analize GBM-a za dvije genske promjene u GBM-a. Ono što je jasno je da se LOH i MSI pojavljuju u GBM-a i doprinose stanju genske nestabilnosti. Naime, MSI se u nekim analizama pojavljuje u manjoj zastupljenosti nego što je to očekivano te se ne može točno definirati funkcija MSI pri samom razvoju GBM-a. Osim toga, ne može se ni definirati točan uzrok MSI u GBM-a s obzirom da promatrani radovi ukazuju kako MSI nije povezana s nestabilnošću proteina MMR sustava, što se inače smatra uzrokom nastanka MSI. S druge strane, specifični varijabilni mikrosatelitni lokusi predstavljaju koristan marker za predispoziciju (razvoj GBM-a). Što se tiče LOH-a, široko je rasprostranjen u GBM-a i uključen je u proces kancerogeneze. Ukazuje na pozadinske genske mehanizme pri razvoju tumora jer je razlog inaktivacije nekih ključnih tumor supresorskih gena. Također, LOH na specifičnim kromosomima služi kao marker za bolje predviđanje ishoda bolesti u pacijenata. Upravo zato, bitno je fokusirati se dalje, ne samo na poznate markere, već i na pronalaženje novih. Paralelno s time, trebaju se razvijati tehnologije koje će olakšati i pospješiti liječenje GBM-a u budućnosti.

7. LITERATURA

1. Adamson, C., Kanu, O.O., Mehta, A.I., Di, C., Lin, N., Mattox, A.K. i Bigner, D.,D. (2009) Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs* 18(8):1061-1083.
2. American Brain Tumor Association, <<http://www.abta.org/brain-tumor-information/types-of-tumors/glioblastoma.html>>. Pristupljeno 15. ožujka 2016.
3. Amos, W. (2010) Mutation biases and mutation rate variation around very short human microsatellites revealed by human-chimpanzee-orangutan genomic sequence alignments. *J Mol Evol.* 71(3):192-201.
4. Applied Biosystems, <<http://www.umassmed.edu/uploadedfiles/genemapperlohanalysisguide.pdf>>. Pristupljeno 1. svibnja 2016.
5. Berget, M.S. (1995) Exon recognition in vertebrate splicing. *J Biol Chem.* 10:270(6):2411-2414.
6. Biad, R.A. (2016) Debugging Human DNA, Lulu Press Inc., Blackwood NJ.
7. Bleeker, F.E., Molenaar, J.R. i Leenstra, S. (2012) Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *J Neurooncol.* 108(1): 11–27.
8. Buecher, B., Cacheux, W., Rouleau, E., Dieumegard, B., Mitry, E. i Lievre, A. (2013) Role of microsatellite instability in the management of colorectal cancers. *Dig Liver Dis* 45 (6): 441–449.
9. Burton, C.E., Lamborn, R.K., Feuerstein G.B., Prados, M., Scott, J., Forsyth, P., Passe, S., Jenkins, B.R. i Aldape, D.K. (2002). Genetic Aberrations Defined by Comparative Genomic Hybridization Distinguish Long-Term from Typical Survivors of Glioblastoma. *Cancer Res* 62:6205.

10. Cancer research UK,
<[http://www.nhs.uk/ipgmedia/National/Cancer%20Research%20UK/assets/Temozolomid
e%28Temodal%29%28CRUK3Pages%29.pdf](http://www.nhs.uk/ipgmedia/National/Cancer%20Research%20UK/assets/Temozolomid
e%28Temodal%29%28CRUK3Pages%29.pdf)>. Pristupljeno 30. svibnja 2016.
11. Cooper, G. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd edition., Sinauer Associates, Sunderland MA.
12. Fearon, E.R., i Bommer, G.T. (2008) *Progressing from Gene Mutations to Cancer. Elsevier* 207-222.
13. Forster, P., Hohoff, C., Dunkelmann, B., Schürenkamp, M., Pfeiffer, H., Neuhuber, F. i Brinkmann, B. (2015) Elevated germline mutation rate in teenage fathers. *Proc Biol Sci.* 282(1803).
14. Fults, D., Brockmeyer, D., Tullous, W.M., Pedone, A.C. i Cawthon, M.R. (1992) p53 Mutation and Loss of Heterozygosity on Chromosomes 17 and 10 during Human Astrocytoma Progression. *Cancer res* 52: 674-679.
15. Hatanpaa, K.J., Burma, S., Zhao, D. i Habib, A.A. (2010) Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging and radioresistance. *Neoplasia* 12(9):675-684.
16. Holland, S.E. (2000) Glioblastoma multiforme: The terminator. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(12): 6242–6244.
17. Huang, T., Li, S., Yang, Z., Liu, J. i Han, Y. (2015) Loss of Heterozygosity of 9p Is Associated with Poorer Survival in Patients with Gliomas. *Molecular Neurobiology* 1-6.
18. Jarne, P. i Lagoda, P.J.L. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol* 11: 424-429.

19. Kanu, O.O., Hughes, B., Chunhui, D, Lin, N., Fu, J., Bigner, D.D, Yan, H. i Adamson, C. (2009a) Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin Med Oncol.* 3: 39–52.
20. Kanu, O.O., Mehta, A., Di, C., Lin N, Bortoff, K., Bigner, D.D., Yan, H. i Adamson, D.C. (2009b) Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* 13(6):701-718.
21. Karunasena, E., McIver, J.L., Rood, R.B., Wu, X., Zhu, H., Bavarva, H.J. i Garner, R.H. (2014) Somatic intronic microsatellite loci differentiate glioblastoma from lower-grade gliomas. *Oncotarget.* 5(15): 6003–6014.
22. Kessler, C. i Manta, V. (1990) Specificity of restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases — a review (edition 3). *Gene* 92(1-2): 1–248.
23. Kozak, R.K. i Moody, S.J. (2009) Giant cell glioblastoma: A glioblastoma subtype with distinct epidemiology and superior prognosis. *Neuro Oncol.* 11(6): 833–841.
24. Kumar, A. (2015) Assessment of genetic variability in Indian Karonda (*Carissa opaca* L.) accessions using DNA based inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Intl J Engg Sci Adv Research* 1(4):17-22.
25. Kwiatkowska A., Nandhu, S.M., Behera, P., Chiocca, A.E. i Viapiano, S.M. (2013) Strategies in Gene Therapy for Glioblastoma. *Cancers (Basel)* 5(4).
26. Louis, D.N., Ohgaki H., Wiestler, D.O., Cavenee, K.W., Burger, C.P., Jouvét, A., Scheithauer, W.B. i Kleihues P. (2007) The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* 114(2): 97–109.
27. Malats, N. i Calafell, F. (2003) Basic glossary on genetic epidemiology. *J Epidemiol Community Health* 57: 480-482.

28. Martinez, R., Schackert, K.H., Plaschke, J., Baretton, G., Appelt, H. i Schackert, G. (2004) Molecular Mechanisms Associated with Chromosomal and Microsatellite Instability in Sporadic Glioblastoma multiforme. *Oncology* 66:395–403.
29. Martinez, R., Rohde, V. i Schackert, G. (2010) Different molecular patterns in glioblastoma multiforme subtypes upon recurrence. *J Neurooncol.* 96(3):321–329.
30. McFaline-Figueroa, L.J., Braun J.C., Stanciu, M., Nagel, D.Z., Mazzucato, P., Sangaraju, D., Cerniauskas, E., Barford, K., Vargas, A., Chen, Y., Tretyakova, N., Lees, A.J., Hemann, T.M., White, M.F. i Samson, D.L. (2015) Minor changes in expression of the mismatch repair protein MSH2 exert a major impact on glioblastoma response to temozolomide. *Cancer Res.* 75(15):3127-3138.
31. Nowell, P.C. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194(4260):23-28.
32. Ohgaki H. i Kleihues, P. (2013) The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 19(4):764-772.
33. O'Kefee, C., McDevitt, A.M. i Maciejewski P.J., (2010) Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood.* 115(14): 2731–2739.
34. Osnove imunohistokemijskih metoda,
<http://www.medri.uniri.hr/files/NASTAVA/PATOLOGIJA/NASTAVNO_GRADIVO/I_MUNOHISTOKEMIJA_I_IN_SITU_HIBRIDIZACIJA.pdf>. Pristupljeno 2. svibnja 2016.
35. PDQ Cancer Information Summaries - Dictionary of Genetics Terms,
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK82217/>>. Pristupljeno 10. veljače 2016.

36. Pelengaris, S. i Khan, M. (2013) Tumor suppressors. U: *The Molecular Biology of Cancer: A Bridge from Bench to Bedside*. Second edition. (Roussel, F.M., ured.) Wiley-Blackwell, Hoboken NJ, str. 239-266.
37. Peraud, A., Watanabe, K., Schwechheimer, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P. i Ohgaki, H. (1999) Genetic profile of the giant cell glioblastoma. *Lab Invest.* 79(2):123–129.
38. Petitjean, A., Achatz, M.I.W., Borresen-Dale, A.L., Hainaut, P. i Olivier, M. (2007) TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 26(15): 2157–2165.
39. Richards, M.F. (2001) Slika 3., <http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM3_08/S1462399401002654sup004.htm>. Pristupljeno 20.travnja 2016.
40. Richard, G. F., Kerrest, A. i Dujon, B. (2008) Comparative Genomics and Molecular Dynamics of DNA Repeats in Eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 72(4):686–727.
41. Rockman, V.M. i Wray, A.G. (2002) Abundant Raw Material for *Cis*-Regulatory Evolution in Humans. *Mol Biol Evol.* 19(11):1991-2004.
42. Ryland, L.G., Doyle, A.M., Goode, D., Boyle, E.S., Choong, Y.H.D., Rowley, M.S., Li, J., Bowtell, D., Tohill, W.R., Campbell, G.I. i Gorringer, L.K. (2015) Loss of heterozygosity : what is it good for? *BMC Med Genomics* 8:45.
43. Slika 2., <<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch7F3.htm>>. Pristupljeno 24.ožujka 2016.

44. Stupp, R., Mason, W.P., Bent, M.J., Weller, M., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *Lancet Oncol.* 352(10):987-996.
45. Sturm, D., Witt, H., Hovestadt, V., Khuong-Quang, D., Jones D.T.W, Konermann, C., Pfaff, E. (2012) Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell.* 22:425–437.
46. Thiagalingam, S., Foy, R.L., Cheng, K.H., Thiagalingam, A. i Ponte, J.F. (2002) Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: molecular basis of its occurrence. *Curr Opin Oncol.* 14(1):65-72.
47. Turnpenny, P.D. i Ellard, S. (2005) Emery's Elements of Medical Genetics, 12th edition, Elsevier Churchill Livingstone Press, Edinburgh UK.
48. Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T. (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* 17:98–110.
49. Viguera, E., Canceill D. i Ehrlich D.S. (2001) Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO J.* 20(10): 2587–2595.
50. Weathers, S.P. i Gilbert, R.M. (2014) Advances in treating glioblastoma. *F1000 Prime Rep.* 6: 46.
51. Yip, S., Miao, J., Cahill, P.D., Iafrate J.A., Aldape, K., Nutt, L.C. i Louis, N.D. (2009) *MSH6* mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. *Clin Cancer Res.* 15(14): 4622–4629.
52. 2.,3.,5.,10.,11. i 13. predavanje iz kolegija Genetičko inženjerstvo (2015,2016)