

Broj 2 • septembar 2022. N° 2 • September 2022.



Trendovi u **molekularnoj biologiji**  
Trends in **Molecular Biology**



Beograd • Belgrade • 2022.  
IMGGI • IMGGE

<p>Pedesetogodišnjica osnivanja studijskog programa molekularna biologija i fiziologija <b>Gordana Matić</b></p>	<p>8</p>	<p>50th anniversary of the molecular biology and physiology study program</p>
<p>TRPV1: Ciljno mesto dejstva lekova u terapiji različitih stanja <b>Branislava Medić Brkić, Katarina Savić Vujović, Dragana Srebro, Sonja Vučković</b></p>	<p>15</p>	<p>TRPV1: A Promising drug target for the treatment of various conditions</p>
<p>Geni-modifikatori <math>\beta</math>-talasemijskih sindroma – novi terapijski pristupi <b>Milena Ugrin</b></p>	<p>32</p>	<p>Gene modifiers in <math>\beta</math>-thalassemia syndromes – a new therapy approach</p>
<p>Novi uvid u genetiku naslednih perifernih neuropatija <b>Milica Keckarević Marković, Miljana Kecmanović, Dusan Keckarević</b></p>	<p>51</p>	<p>Genetics of inherited peripheral neuropathies: renewed data</p>
<p>Savremeni pristupi u istraživanju molekularne osnove karcinoma prostate <b>Zorana Dobrijević, Suzana Matijašević-Joković, Ana Branković, Ana Djordjević, Milica Popović i Goran Brajušković</b></p>	<p>63</p>	<p>Modern approaches in research of the molecular basis of prostate cancer</p>
<p>Uticaj tumorske mikrosredine na razvoj i progresiju maligniteta <b>Ilona Đorić, Tijana Išić Denčić, Sonja Šelemetjev</b></p>	<p>75</p>	<p>The effects of tumor microenvironment on malignancy formation and progression</p>
<p>Uloga hsa-miR-93-5p u kolorektalnom karcinomu <b>Jovana Despotović</b></p>	<p>90</p>	<p>Role of hsa-miR-93-5p in colorectal cancer Jovana Despotović</p>
<p>Antitumorski potencijal novih derivata steroidnih hidrazona <b>Marijana B. Živković</b></p>	<p>104</p>	<p>Antitumor potential of new steroidal hydrazone derivatives</p>
<p>Molekularna dijagnostika glioblastoma – klinički uticaji <i>IDH</i> mutacija i epigenetičkog utišavanja aktivnosti <i>MGMT</i> gena <b>Nikola Jovanović, Tatjana Mitrović</b></p>	<p>125</p>	<p>Molecular diagnostics of glioblastoma – clinical impact of <i>IDH</i> mutations and epigenetic silencing of <i>MGMT</i></p>
<p>Molekularni profil timoma <b>Jelena Perić</b></p>	<p>143</p>	<p>Molecular profile of thymoma</p>
<p>Ekspresija i funkcija insulina u centralnom nervnom sistemu <b>Tamara Dakić, Predrag Vujović</b></p>	<p>155</p>	<p>Insulin expression and action in the central nervous system</p>
<p>Neuroprotektivni potencijal progesterona <b>Ivana Guševac Stojanović, Dunja Drakulić</b></p>	<p>168</p>	<p>Neuroprotective progesterone potential</p>
<p>Uloga dehidroepiandrosterona u moždanoj ishemiji/reperfuziji <b>Marina Zarić Kontić, Jelena Martinović</b></p>	<p>186</p>	<p>Effect of dehydroepiandrosterone on cerebral ischemia/reperfusion</p>
<p>Hemijski profil i antioksidativna aktivnost crvenih vina klonova autohtone i internacionalnih sorti vinove loze <b>Neda Đorđević</b></p>	<p>206</p>	<p>Chemical profile and antioxidative activity of red wines obtained from autochthonous and international grape clone varieties</p>
<p>Dihidrohalkoni jabuke florizin i floretin kao nove alelopatske supstance <b>Mariana Stanišić, Slavica Ninković, Nevena Banjac</b></p>	<p>223</p>	<p>Apple dihydrochalcones phloridzin and phloretin as novel allelochemicals</p>
<p>Dosadašnja postignuća na promeni boje cvetova biljaka metaboličkom modulacijom biosinteze karotenoida <b>Milena Trajković, Sladjana Jevremović, Aleksandar Cingel</b></p>	<p>238</p>	<p>Recent advances in flower color alteration by metabolic manipulation of carotenoid biosynthesis</p>
<p>Bioinformatički alati za analizu mikroRNK <b>Katarina Zeljić</b></p>	<p>255</p>	<p>Bioinformatics tools for the analysis of microRNA</p>
<p>Marker porekla kao adut u forenzičkim analizama DNK u kompleksnim slučajevima iz perspektive Y hromozoma <b>Miljana Kecmanović, Milica Keckarević Marković, Dušan Keckarević</b></p>	<p>275</p>	<p>Lineage marker as a key player in complex forensic cases from the perspective of Y chromosome</p>

## **Predgovor**

Uspostaviti tradiciju je mnogo teže nego realizovati inicijativu. Pokazalo se da je prvi broj tematskog zbornika **Trendovi u molekularnoj biologiji 1** pobudio interesovanje naučne zajednice u Srbiji, tako da drugi broj nije bilo teško sastaviti. Broj poglavlja u tematskom zborniku **Trendovi u molekularnoj biologiji 2** je premašio očekivanja. Kao da je Tematski zbornik simbolično postao - Ko je ko u molekularnoj biologiji u Srbiji. I ponovo se pokazalo da se naučnici u našoj zemlji bave aktuelnim istraživačkim temama i aktivno doprinose napretku molekularne biologije na mnogim poljima. I mladi molekularni biolozi su prikazom svojih doktorskih teza pokazali da prate svetske trendove i savremene naučne pristupe.

Posebnost ovog broja je što se objavljuje u vreme kada obeležavamo jubilej, pedesetogodišnjicu Beogradske škole molekularne biologije, o čemu svedoči tekst u kome je prikazan put razvoja programa za molekularnu biologiju na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Pre više godina na jednom naučnom skupu se govorilo o tome kako saznanja iz molekularne biologije prožimaju sve naučne oblasti koje se bave živim organizmima i kako se može predvideti da će njena primena obeležiti novi vek. Iz auditorijuma je stigao komentar: „Proći će i vaše“. Vreme svedoči da je era molekularne biologije tek počela.

**„I šta ćemo sad?“**

**Sonja Pavlović**

## **Iz recenzija Tematskog zbornika** ***Trendovi u molekularnoj biologiji***

Drugi broj tematskog zbornika „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ predstavlja nastavak prikazivanja i objavljivanja najznačajnijih naučnih radova proisteklih iz doktorskih disertacija mladih naučnika Srbije, kao i najznačajnijih naučnih rezultata ostvarenih u svetu u oblasti molekularne biologije, u protekloj godini, u kojima su naši naučnici dali svoj doprinos. U ovom broju, prikazano je 18 naučnih radova, od kojih je 12 iz oblasti biomedicine, koji su posvećeni rezultatima ostvarenim u oblasti molekularne biologije retkih bolesti, tumora i centralnog nervnog sistema. Ovi rezultati su od ogromnog značaja za unapređenje dijagnostike i terapije bolesti.

Rezultati koje su naši naučnici ostvarili u oblasti molekularne biologije biljaka prikazani su kroz tri rada, a akcenat u njima je na mogućnosti primene tih rezultata u oblasti ekologije, hortikulture i unapređenja zdravlja ljudi (potraga za ekološki prihvatljivim bioherbicidima, modifikacija boje cveta, biološka aktivnost prirodnih supstanci).

Dva rada su posvećena naprednim metodama u oblasti molekularne biologije i prikazana su u posebnom poglavlju, što smatram veoma važnim.

Posebno bih istakla poglavlje u kojem je prikazan jedan od najznačajnijih naučnih rezultata u svetu u protekloj godini (otkiće receptora za temperaturu i dodir), za koji je dodeljena Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu 2021. godine. Uvodno poglavlje ovog tematskog zbornika posvećeno je značajnom jubileju – pedesetogodišnjici Beogradske škole molekularne biologije, i u njemu je prikazan razvojni put studijskog programa Molekularna biologija i fiziologija na Univerzitetu u Beogradu – Biološkom fakultetu.

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ nastavlja svoju misiju naučne avangarde započetu prošlogodišnjim brojem. Prikazivanjem najkvalitetnijih i najznačajnijih naučnih rezultata ostvarenih u oblasti molekularne biologije u protekloj godini u kojima su naši mladi naučnici dali svoj ogromni doprinos, prenose se informacije širem krugu istraživača i zaposlenih u različitim oblastima (medicina, farmacija, poljoprivreda), čime se otvaraju mogućnosti za saradnju, a samim tim za primenu rezultata, kao i za nova istraživanja.

Svojom koncepcijom i odabirom radova „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ prate napredak u oblasti molekularne biologije i ne samo da prenose najznačajnije naučne rezultate, već i inspirišu i podstiču nova istraživanja i šire interesovanje za ovu veoma značajnu naučnu oblast. Ovaj zbornik opravdava svoj naziv i nadam se da će se nastaviti trend njegovog objavljivanja i narednih godina.

**Dr Svetlana Radović, redovni profesor,**  
**Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu**

Monografija/Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ je drugi broj u nizu izdanja koje ima za cilj da prikaže naučne rezultate iz oblasti molekularne biologije koje su ostvarili naučnici iz Srbije u prethodnoj godini. Sačinjen je od 18 poglavlja, od kojih 8 predstavlja revijske radove proizašle iz doktorskih disertacija mladih doktora nauka u kojima je prikazan njihov doprinos određenoj naučnoj oblasti molekularne biologije koja je povezana sa temom njihove disertacije. Preostalih 7 poglavlja su prikazi aktuelnih tema iz molekularne biologije u kojima su naši naučnici dali svoj značajni doprinos. Uvodno poglavlje je posvećeno jubileju, pedesetogodišnjici Beogradske škole molekularne biologije, u kome je prikazan put razvoja programa za molekularnu biologiju na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Veliki broj poglavlja iz Zbornika (12) je posvećen istraživanjima iz oblasti biomedicine. Posebno je značajno poglavlje u kome je prikazan doprinos naših istraživača u oblasti kojoj je dodeljena Nobelova nagrada iz medicine za 2021. godinu (receptori za temperaturu i dodir).

Doprinos koji je molekularna biologija dala modernoj medicini je izuzetno veliki. Danas su u kliničkoj praksi u svetu mnogobrojni dijagnostički, prognostički i terapijskih molekularni markeri. Posebno je značajno što je medicina u Srbiji pratila svetske trendove, i to zahvaljujući i velikim naporima molekularnih biologa u našoj zemlji. Ovaj Tematski zbornik je svedočanstvo o značajnim postignućima molekularnih biologa u Srbiji koji su doneli napredak našoj medicini i drugim naučnim oblastima.

Monografija/Zbornik je izuzetno zanimljivo koncipiran sa sadržajem koji je na visokom naučnom nivou i koje je značajan izvor informacija za veliki broj naučnika u Srbiji čija se istraživanja više ne mogu zamisliti bez molekularne biologije. Primeri primenljivosti rezultata istraživanja u praksi (medicinskoj i drugima) je poseban kvalitet ovog Zbornika.

Prvi broj Tematskog zbornika „Trendovi u molekularnoj biologiji 1“ je doživeo veliko interesovanje. Interesovanje autora da objave svoj doprinos svetskoj nauci u broju 2 govori da je ovakav sadržaj bio neophodan našoj naučnoj javnosti. Sigurno je da će ovako koncipiran Tematski zbornik imati budućnost, jer je napredak medicine i drugih oblasti (biotehnologija, poljoprivreda, farmacija) nemoguće zamisliti bez novih dostignuća molekularne biologije

**Dr Vesna Škodrić Trifunović, redovni profesor,  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu**

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ sadrži naučne rezultate koji su prepoznati na svetskom nivou, a koje su istraživači iz Srbije ostvarili u prethodnoj godini iz ove oblasti. Zbornik je sačinjen od 18 poglavlja, preglednih radova, grupisanih u pet celina. Prva celina je posvećena važnom jubileju, pedesetogodišnjici osnivanja Beogradske škole molekularne biologije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, dok druga sadrži prikaz rezultata naših istraživača iz oblasti fiziologije i medicine za koju je u 2021. godini dodeljena Nobelova nagrada. Najveći broj poglavlja je u okviru treće celine koja se bavi biomedicinom i to molekularnom biologijom retkih bolesti, tumora i centralnog nervnog sistema. Preostale dve celine su posvećene molekularnoj biologiji biljaka i naprednim metodama molekularne biologije. Važno je istaći da su mladi doktori nauka aktivno učestvovali u izradi ovog Zbornika, tako da 8 poglavlja u okviru biomedicine i molekularne biologije biljaka predstavljaju revijske radove proizašle iz njihovih doktorskih disertacija.

Značaj ovog Zbornika je višestruk. Najpre, već drugu godinu za redom se objavljuju najrelevantnija saznanja iz navedenih oblasti koja su proizašla iz rada istraživača iz Srbije i dostupna su široj javnosti na maternjem jeziku. Takođe, svoje radove su napisali istraživači iz različitih naučnih instituta (5) i fakulteta (5) iz Srbije, što ohrabruje da će se u našoj zemlji i dalje nastaviti sa istraživanjima u molekularnoj biologiji koja su aktuelna u svetu.

„Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ je Tematski zbornik u kome su objedinjeni rezultati fundamentalnih i primenjenih istraživanja u molekularnoj biologiji ostvarenih u našoj zemlji u prethodnoj godini. Korišćenjem najnovijih metodoloških pristupa u ovoj oblasti, ali i bioinformatičkih i drugih softverskih alata, postignut je značajan napredak u dijagnozi i primeni novih strategija lečenja mnogih bolesti, forenzičkim analizama, razvoju novih lekova. Ovaj sveobuhvatni prikaz istraživanja, koja se aktivno sprovode u naučnim institutima i na fakultetima u Srbiji, doprinosi saznanjima o značaju koji molekularna biologija ima kako u humanoj i veterinarskoj medicini, poljoprivredi, farmaciji, tako i u razvoju biotehnologije, očuvanju životne sredine i biodiverziteta.

Poseban doprinos Zbornika se ogleda u tome što se u njemu nalaze aktuelni podaci o dostupnosti navedenih savremenih metodologija, čime se otvaraju realne mogućnosti za uspostavljanje novih saradnji među istraživačima, kao i u uspostavljanju inter- i multi-disciplinarnosti i daljem razvoju nauke u Srbiji.

**Dr Gordana Nikčević, naučni savetnik**

**Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu**

## Molekularna dijagnostika glioblastoma –klinički uticaji IDH mutacija i epigenetičkog utišavanja aktivnosti MGMT gena

**Nikola Jovanović, Tatjana Mitrović**

Departman za Biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet,  
Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija

Kontakt: nikolajov90@gmail.com

### Apstrakt

Savremeni terapijski pristupi u lečenju pacijenata obolelih od glioblastoma (GBM) oslanjaju se na primenu alkilirajućih agenasa poput Temozolomida ("Stupp"-ov protokol). Sveobuhvatnim studijama izučavanja genomske asocijacije (GWAS) i randomizovanim kliničkim ispitivanjima otkriven je uticaj statusa nekoliko važnih molekularnih markera na terapijski odgovor i klinički ishod kod GBM pacijenata. Najvažnijim takvim markerom smatra se status mutacije gena za izocitrat-dehidrogenazu 1 (*IDH1-R132H*), koji je uvršten u važeću Klasifikaciju tumora centralnog nervnog sistema Svetske zdravstvene organizacije. Određivanjem njegovog statusa moguće je razlikovati primarne od sekundarnih GBM koje odlikuju značajne razlike u toku i ishodu bolesti. Takođe, pokazano je da je *IDH1-R132H* mutacija usko povezana sa mehanizmima epigenetičkog utišavanja aktivnosti gena za reparacioni enzim O<sup>6</sup>-metilguanin-metiltransferazu (MGMT) putem metilacije njegovog promotornog regiona. Zbog direktnog suprotstavljanja MGMT enzima dejstvu alkilirajućih agenasa, navedena inaktivacija njegove aktivnosti predstavlja povoljan prognostički i predikcioni faktor GBM. Predmet ovog revijskog rada biće pregled aktuelnih saznanja o ulozi navedenih markera u etiologiji GBM, značaja njihove udružene evaluacije i problema šire implementacije njihovog određivanja u kliničkoj praksi.

**Ključne reči:** glioblastom, molekularni markeri, epigenetika, *MGMT*, *IDH1*

## Molecular diagnostics of glioblastoma – clinical impact of IDH mutations and epigenetic silencing of MGMT

**Nikola Jovanović, Tatjana Mitrović**

Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics,  
University of Niš, 18000 Niš, Serbia  
Correspondence: nikolajov90@gmail.com

### Abstract

Current therapy protocols for the management of glioblastoma (GBM) patients mostly rely on the use of alkylating agents, such as Temozolomide (Stupp protocol). During the past several decades, comprehensive genome-wide association studies (GWAS) and randomized clinical trials have revealed and confirmed the impact of numerous molecular markers on the therapy response in GBM patients. Among them, the mutation status of the isocitrate dehydrogenase 1 gene (IDH1-R132H) was presented as the most important molecular marker of GBM. Due to its importance, in 2016 it was introduced to the World Health Organisation (WHO) Classification of Tumours of the Central Nervous System (CNS), which is still valid. Through IDH1-R132H mutation evaluation, it is possible to distinguish the primary from the secondary GBM which significantly differ in the clinical course and outcome. Moreover, it was shown that IDH1-R132H mutation is closely related to the molecular mechanisms which drive epigenetic silencing of the O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase gene (MGMT) through methylation of its promoter region. Due to the direct opposition of the MGMT enzyme to the alkylating agents' activity, its inactivation represents a favorable prognostic and predictive factor in GBM. This review article discusses the current insights on the role of IDH1 mutation and MGMT epigenetic silencing in GBM etiology, the importance of their mutual evaluation, and the challenges of their evaluation in clinical practice.

**Keywords:** glioblastoma, molecular markers, epigenetics, MGMT, IDH1



## KLINIČKI NAJZNAČAJNIJA GENETIČKA I MOLEKULARNA OBELEŽJA GBM

U jeku ubrzanog razvoja molekularnih metoda istraživanja humanog genoma začetog s kraja XX veka, klinička dijagnostika i klasifikacija glioblastoma (GBM) pretrpela je korenite promene s ciljem unapređenja prognostičke stratifikacije i predikcije odgovora na terapiju. Tome je doprinelo pronalaženje pouzdanih molekularnih markera GBM poput statusa mutacije gena za izocitrat dehidrogenazu 1 i 2 (*IDH1/2*) i statusa metilacije promotornog regiona gena za O<sup>6</sup>-metilguanin-DNK metil-transferazu (*MGMT*) koji se, uz amplifikaciju *EGFR* gena i prisustva kodelecije p kraka hromozoma 1 (1p) i q kraka hromozoma 19 (19q) ubrajaju u najizraženija molekularna obeležja GBM od kliničkog značaja [1]. Zbog njihove važnosti je "Klasifikacija tumora centralnog nervnog sistema" (CNS) iz 2016. godine, iza koje stoji Svetska Zdravstvena Organizacija (WHO), prvi put uključila i molekularne parametre u nomenklaturu tumora, nakon čitavog veka klasifikacije tumora pretežno na osnovu mikroskopske analize eozin/hematoksilin obojenih histoloških preparata. Ova nomenklatura podrazumeva da se histopatološkom nazivu tumora, koje se prvo navodi, u nastavku nakon zapete i u obliku opisnog prideva dodaje specifična genetička osobina (npr. Glioblastoma, IDH mutant) [2]. Najkrupnije promene u ovoj klasifikaciji u odnosu na prethodnu (iz 2007. godine) ogledaju se u klasifikaciji difuznih glioma (gliomi II-IV gradusa). Dok su ranije svi astrocitni tumori bili u jednoj zasebnoj grupi, prema trenutno važećoj klasifikaciji svi tipovi difuznih glioma svrstani su u jednu grupu [2]. Grupi difuznih glioma pripadaju astrocitni tumori II i III gradusa WHO, oligodendrogliomi II i III gradusa kao i glioblastomi (gradus IV). Ova grupa je definisana na osnovu zajedničkih osobina rasta ali i na osnovu zajedničkih molekularnih karakteristika i to upravo obrazaca mutacija gena *IDH 1* i *IDH 2* [2]. Rasvetljavanje uloge mutacije *IDH1/2* u procesu gliomogeneze, izazivanju globalnih epigenetičkih modifikacija i korelaciji sa metilacijom promotornog regiona *MGMT* omogućilo je dodatno prilagođavanje terapijskih procedura individualnim karakteristikama GBM pacijenata - personalizovanoj terapiji, konceptu lečenja koji predstavlja jedan od najaktuelnijih trendova savremene medicine.

### IDH1/2 MUTACIJE

Izocitrat dehidrogenaza predstavlja metabolički enzim - enzim Krebsovog ciklusa koji katalizuje oksidativnu dekarboksilaciju izocitrata do  $\alpha$ -ketoglutarata, uz istovremenu redukciju NAD koenzima do NADH [3]. Ovaj enzim egzistira u tri izoforme (IDH 1-3) pri čemu je IDH1 izoforma lokalizovana u citoplazmi i peroksisomima, dok su IDH2/3 izoforme smeštene u mitohondrijama. Pored uloge u Krebsovom ciklusu i smanjenju oksidativnog stresa, IDH1 ima funkciju u metabolizmu lipida i glukoze [3].

Mutacije *IDH1/2* gena mogu biti monoalelske, somatske i "missense" mutacije (*missense, eng.* - mutacije promene smisla). Otkrivene su 2009. godine prilikom analize genoma uzoraka GBM, a kasnije studije identifikovale su prisustvo ovih mutacija u različitim tipovima tumora poput kancera prostate, holangiokarcinoma, akutne mijeloidne leukemije, kartilaginoznih tumora, papilarnog karcinoma dojke, akutne limfoblastne leukemije, angioimunoblastičnog T-ćelijskog limfoma i primarne mijelofibroze [1,4].

Najčešća i klinički najznačajnija *IDH* mutacija u GBM ćelijama je *IDH1-R132H* (G395A), mutacija u *IDH1* genu smeštenom na hromozomu 2 (2q33) koja za posledicu ima „missense“ supstituciju kodona 132 za aminokiselinu arginin [1]. Kodon za arginin na poziciji 132 je evoluciono konzervisan i odgovoran za interakciju sa supstratom enzima – izocitratom. *IDH1-R132H* mutacija predstavlja najvažnije molekularno obeležje sekundarnih glioblastoma (prisutna je kod 80% niskogradusnih glioma) dok se ona znatno ređe javlja kod primarnih GBM (5%) [5]. Određivanje statusa mutacije *IDH1-R132H* ključno je za razlikovanje sekundarnih od primarnih GBM, koje nije moguće razlikovati na osnovu histopatoloških karakteristika. Do-

datni pozitivni prognostički značaj ovoj mutaciji daje činjenica da je ona obično asocirana sa mutacijom u *TP53* i kodelecijom del(1p)/del(19q) koji predstavljaju tipične molekularne odlike sekundarnih GBM. Pored toga, prisustvo *IDH1* mutacije povezano je sa metilacijom *MGMT* promotornog regiona i odsustvom amplifikacije *EGFR* i gubitka hromozoma 10. Mutacije u *IDH2* genu (hromozom 15q26) pogađaju kodone R172 i R140. One su u GBM retko zastupljene i međusobno isključive u odnosu na *IDH1* mutacije.

## **IDH MUTACIJE – POKRETAČKE MUTACIJE GBM?**

Povezanost *IDH* mutacija sa povećanim vremenom preživaljavanja GBM pacijenata otvorilo je pitanje njihove prirode: Da li se radi o pokretačkim (*driver, eng.*) mutacijama gliomogeneze, usputnim (*passenger, eng.*) mutacijama, ili čak korisnim mutacijama po tok bolesti? Brojne studije su potvrdile ulogu *IDH1/2* mutacija kao direktnih pokretača gliomogeneze niskogradusnih glioma i sekundarnih GBM. U prilog „onkogenoj“ teoriji govori činjenica da je somatski mozaicizam za *IDH1* i *IDH2* mutacije odgovoran za sindrome enhondromatoze, Olijerov i Mafučijev sindrom. Ovi sindromi se odlikuju pojavom hemangioma i kartilaginoznih tumora i povezani su sa povećanim rizikom od nastanka glioma. Takođe, introdukcija mutirane forme *IDH* gena u normalne ćelijske linije podstiče njihovu proliferaciju i formiranje kolonija ćelija uz smanjenje sposobnosti diferencijacije [4].

Mutacije *IDH* gena predstavljaju neomorfične mutacije. One rezultuju zadobijanjem novih funkcija (*gain-of-function, eng.*) *IDH* enzima koje su ključne za pokretanje onkogene transformacije u GBM. *IDH1-R132H* mutacija rezultuje zadobijanjem sposobnosti enzima da katalizuje reakciju redukcije 2-oksoglutarata do (D)-2-hidroksiglutarata (D-2HG) [4,6].

Trenutno preovlađujuće stanovište jeste da je mutacija *IDH1-R132H* onkogene prirode i da spada u najranije genetičke događaje koji podstiču inicijaciju i rast niskogradusnih glioma odnosno sekundarnih GBM [6,7]. U prilog tome govore dokazi da se ova mutacija u sekundarnim glioblastomima može registrovati pre *TP53* mutacija i izmena u broju kopija *PTEN* i *EGFR* gena koji takođe nastupaju rano u gliomogenezi. Pored toga, ona predstavlja jedinu genetičku karakteristiku koju dele inicijalni sekundarni glioblastomi i njihovi recidivi [6].

Uzimajući u obzir njihovu potencijalnu ulogu kao pokretača onkogeneze, intrigantno je da je prisustvo *IDH* mutacija povezano sa poboljšanjem vremena preživljavanja GBM pacijenata. Iako sekundarni GBM dele zajedničke kliničke karakteristike sa primarnim glioblastomima, ispostavilo se da se oni jasno razlikuju u molekularnoj patogenezi i izmenama u signalnim putevima. Te razlike za posledicu imaju smanjenu stopu infiltracije, progresije i rasta GBM, kao i povoljnije parametre toka bolesti u odnosu na primarne GBM. U cilju otkrivanja mehanizma uticaja *IDH* mutacija u gliomima, izvršena je komparativna analiza TCGA podataka za 286 slučajeva *IDH1*-mutiranih i *IDH1*-nemutiranih (*wildtype, eng.*) glioma [8]. Otkriveno je da je *IDH1-R132H* asocirana sa pozitivnim prognostičkim faktorima glioma: povećanjem ekspresije tumor-supresornih gena *NF1*, *PTEN* i *PIK3R1* (*phosphoinositide-3-kinase regulatory Subunit 1, eng.* – regulatorna subjedinica 1 fosfatidilinozitol 3-kinaze) i smanjenjem ekspresije onkogenih gena *AKT2* (AKT serine/threonine kinase 2, eng. – AKT serin/treonin kinaza 2), *ARAF* (*serine/threonine protein kinase A-Raf, eng.* – serin/treonin proteinska kinaza A-Raf), *ERBB2* (*Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2, eng.* – Erb-B2 receptor proteinske kinaze 2), *FGFR3* i *PDGFRB* (*platelet derived growth factor receptor beta, eng.* – receptor trombocitnog faktora rasta beta) kao i gena koji podstiču progresiju glioma *FOXM1* (*forkhead box M1, eng.*), *IGFBP2* (*insulin-like growth factor binding protein 2, eng.* – protein vezivanja faktora rasta nalik insulinu) i *WWTR1* (*WW domain containing transcription regulator 1, eng.* – regulator transkripcije 1 sa WW domenom) [8].

## D-2HG KAO ONKOMETABOLIT

Smatra se da je *IDH1-R132H* jedan od ključnih pokretača gliomogeneze zahvaljujući produkciji „onkometabolita“ D-2HG koji indukuje epigenetičke, metaboličke i transkripcione promene u mutiranim ćelijama. Prisustvo D-2HG je i do stotinu puta povišeno kod *IDH1-R132H* mutiranih glioma u odnosu na nemutirane gliome [4,6]. D-2HG predstavlja kompetitivni inhibitor 2-oksoglutarat-zavisnih dioksigenaza, u koje spadaju prolil hidrosilaze (PHD), histon demetilaze i TET (*Ten-eleven translocation, eng.*) familija 5-metilcitozin hidrosilaza [6,9]. Od navedenih grupa enzima, najveću senzitivnost na D-2HG pokazuju histon demetilaze (i do 200 puta više u odnosu na PHD). D-2HG indukuje metilaciju histona i direktno zaustavlja proces ćelijske diferencijacije. Otkriveno je da je prisustvo D-2HG korelisano sa povećanom akumulacijom represivne trimetilacije lizinskog ostatka na poziciji 9 histona 3 (H3K9me3) koja prethodi promenama u obrascu DNK metilacije genoma [9]. Takođe, prisustvo inhibitora *IDH1-R132H*, *AGI-5198* rezultovalo je demetilacijom histona H3K9me3 i indukcijom ekspresije gena koji regulišu ćelijsku diferencijaciju [10]. Inokulacija *IDH1-R132H* mutacije u immortalizovane ćelijske linije humanih astrocita bila je dovoljna za izazivanje epigenetičkog šablona sličnog CpG metilacionom fenotipu (G-CIMP) koji je karakterističan za GBM sa prisustvom *IDH1* mutacije [8].

Međutim, ponuđeni su i dokazi da D-2HG nije ključan za progresiju glioma i da utiče na smanjenje stope ćelijske proliferacije glijalnih ćelija, makar u *in vitro* uslovima [11,12]. Ovim se može objasniti uloga *IDH* mutacija kao pozitivnih prognostičkih faktora. Otkriveno je da D-2HG predstavlja inhibitor enzima ATP sintaze i aktivator AMPK signalnog puta koji snižavaju aktivnost mTOR. signalnog puta koji podstiče proliferaciju tumorskih ćelija (*Mammalian target of rapamycin complex 1, eng.*- proteinski kompleks u sisarskim ćelijama koje inhibira rapamycin, imunosupresorni lek koji deluje tako što inhibira progresiju iz G1 i S fazu ćelijskog ciklusa B i T limfocita) [7].

## KONTRADIKTORNA PRIRODA IDH MUTACIJA – MOGUĆE OBJAŠNENJE

Iako preovlađujuće, trenutno shvatanje o ulozi *IDH* mutacija kao pokretača gliomogeneze nailazi na suprotstavljena mišljenja. Jedno o objašnjenja porekla zabune o kontradiktornoj prirodi *IDH1-R132H* mutacija tiče se različitih model-sistema kojima su istraživači pribegavali: upotrebe egzogene transdukcije *IDH1-R132H* mutiranog gena nasuprot endogene, heterozigotne *IDH1-R132H* [6].

Endogena, heterozigotna *IDH1-R132H* mutacija je česta u gliomima. Međutim, ona se gubi i izuzetno teško održava u ćelijskim kulturama ili ksenograftima (transplantacija organa ili tkiva s jednog živog bića na drugo) poreklom od pacijenata. Zbog toga je transdukcija ćelijskih kultura egzogenom *IDH1-R132H* postala standard u istraživanjima, a većina dostupnih podataka o onkogenoj prirodi *IDH* mutacija dobijena je primenom egzogene *IDH1-R132H* u eksperimentalnim model sistemima glioma. Pokazano je da transdukcija egzogenom *IDH1-R132H* rezultuje sferoidnim rastom *MYC*-immortalizovanih humanih neuralnih progenitornih ćelija (*Myelocytomatosis viral oncogen, eng.*- protoonkogen čije mutacije imaju ulogu u razvijanju Burkittovog limfoma, kodira transkripcioni faktor, nuklearni fosfoprotein koji ima ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa i apoptoze, humani homolog virusnog onkogeno mijelocitomatoze ili *v-myc*), kao i rastom nezavisnim od podloge (anchorage-independent growth, eng.) kod immortalizovanih ćelijskih linija humanih astrocita u poređenju sa *IDH1* nemutiranom kontrolom. [13, 14]. Ove osobine su jaki i dokazani pokazatelji tumorogenosti i govore u prilog onkogenoj teoriji [13].

Sa druge strane, takve rezultate nije bilo moguće reprodukovati u eksperimentalnim model sistemima koji su uključivali endogenu heterozigotnu *IDH1-R132H*. Štaviše, takve studije su navodile na potpuno

suprotne zaključke. Zapanjujuće je da su heterozigotne *IDH1-R132H* ćelijske linije pokazale suprotan efekat na rast neuralnih progenitorskih ćelija, sprečavajući sferoidni rast [13]. Uticaj heterozigotne *IDH1-R132H* na inhibiciju rasta nezavisnog od podloge objasnilo je poreklo problema spomenutog održavanja heterozigotne *IDH1-R132H* u ksenograftima i ćelijskim kulturama, ali i pružilo uvid u drugačiji funkcionalni značaj *IDH1-R132H* i moguću antitumorsku i antiproliferativnu, odnosno blagotvornu ulogu na tok bolesti.

U prilog tome govori da je kod *IDH1-R132H* heterozigotnih miševa zabeleženo odsustvo razvijanja tumora, uprkos visokoj koncentraciji D-2HG. Takođe, pacijenti oboleli od D-2-hidroksiglutarne acidurije, retkog autozomno-recesivnog sindroma koji se karakteriše visokom koncentracijom D-2HG u urinu, krvnoj plazmi i cerebrospinalnoj tečnosti, nisu pokazali predispoziciju za razvoj tumora [11]. Ovakvi dokazi govore u prilog tvrdnji da je *IDH1-R132H* mutacija u suštini tumor-supresivna i da ne poseduje sposobnost direktne inicijacije i promocije gliomageneze [12].

Pokazano da inaktivacija *TP53* i *RB* signalnih puteva (karakteristika sekundarnih GBM) u imortalizovanim ćelijskim linijama humanih astrocita prikriva *IDH1-R132H* tumor-supresivnu aktivnost te je najverovatnije da tumor-supresivnu aktivnost *IDH1-R132H* poništava prisustvo drugih genetičkih i mikrosredinskih činioca uključenih u proces gliomageneze [15]. Takođe, visoka koncentracija ekstracelularnog glutamata poništava *IDH1-R132H* indukovanu supresiju rasta nezavisnog od podloge i podstiče proliferaciju tumora [12]. To otkriće je naročito značajno ukoliko su uzme u obzir da su *IDH1-R132H* mutirani glioblastomi najčešće lokalizovani u čeonom režnju mozga za koji je karakterističan visok protok ovog neurotransmitera.

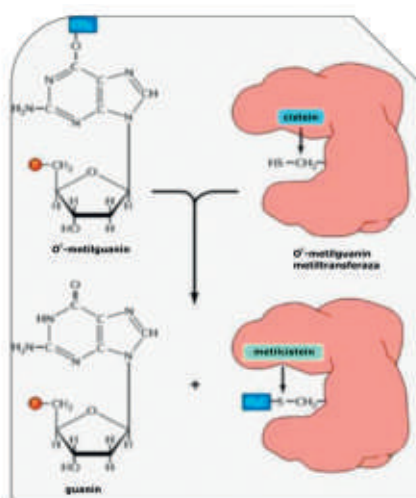
Navedeni rezultati studija navode na zaključak da je funkcionalni gubitak aktivnosti *IDH1-R132H* enzima, a ne nedostatak funkcije divljeg tipa *IDH1* enzima razlog za zastupljenost i očuvanje *IDH1-R132H* mutacija od stadijuma inicijacije do progresije GBM. Zbog toga istraživanja usmerena na mehanizme poništavanja *IDH1-R132H* tumor-supresivne funkcije predstavljaju izuzetno važan pristup u razvijanju načina prevencije progresije glioma i definisanju personalizovanih terapijskih protokola [6].

## HIPERMETILACIJA PROMOTORNOG REGIONA MGMT

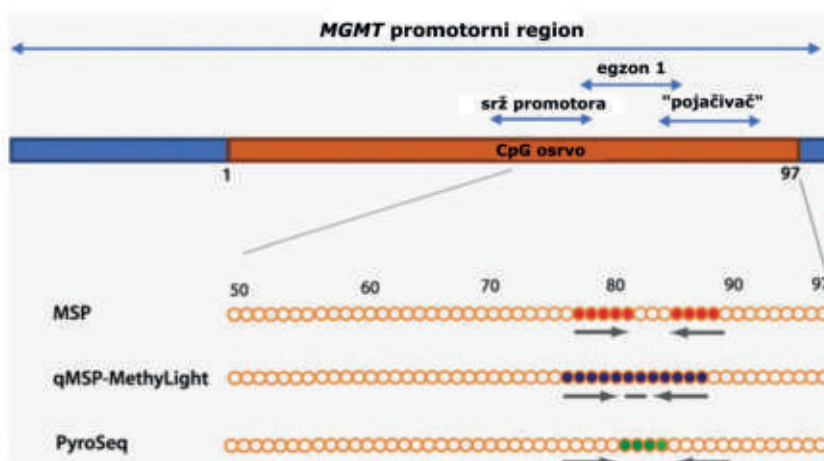
Status metilacije promotornog regiona *MGMT* predstavlja jedan od najznačajnijih prognostičkih faktora GBM i moćan predikcioni faktor odgovora na terapiju alkilirajućim agensima, derivatima nitrozouree i TMZ, ili njihovom kombinacijom [1,16]. Ovi lekovi deluju citotoksično na proliferativne ćelije dodavanjem alkil-grupe (alkil-adukata) na nekoliko pozicija u molekulu DNK, od kojih je najčešća O<sup>6</sup>-pozicija guanina. Alkilacija guanina dovodi do mutacije pogrešno sparenih baza (*mismatch mutation*, eng.), dvostrukog prekida u molekulu DNK i apoptoze proliferativnih ćelija GBM. Gen *MGMT*, smešten na q kraku hromozoma 10 (10q26.3), kodira evoluciono visoko-konzervisani reparacioni enzim O<sup>6</sup>-metilguanin-DNK metil-transferazu. Ovaj enzim otklanja alkil-adukate sa O<sup>6</sup>-pozicije guanina, poništavajući citotoksičnost spomenutih alkilirajućih agenasa. Tokom tog procesa alkil-grupa biva ireverzibilno prebačena sa molekula DNK na *MGMT* (samoubilačka inhibicija), čime *MGMT* postaje nepovratno inhibiran (Slika 1).

U čak 50% slučajeva GBM je aktivnost *MGMT* epigenetički utišana putem metilacije specifičnih CpG pozicija (*Cytosine-phosphate-guanine*, eng. - citozin-fosfat-guanin) od ukupno 97 pozicija unutar CpG niza koji čini CpG ostrvo (*CpG island*, eng.) dužine 777bp, smeštenog u promotornom regionu *MGMT* gena (Slika 2.) [17,18,19].

Metilacija CpG pozicija u rasponu od -251 do -101 pozicije promotornog regiona *MGMT* ključna je za njegovo transkripciono utišavanje. Taj region je dobio naziv DMR1 (*differentially methylated region 1*, eng. - diferencijalno metilovan region 1). Uz njega, otkriveno je prisustvo i regiona od +97 do +196 koji je nazvan



**Slika 1.** Mehanizam direktne reparacije DNK oštećenja koju katalizuje enzim MGMT (preuzeto sa <https://www.slideshare.net/aljeirou/mutation-and-dna-repair-mechanisms>)



**Slika 2.** Mehanizam direktne reparacije DNK oštećenja koju katalizuje enzim MGMT (preuzeto sa <https://www.slideshare.net/aljeirou/mutation-and-dna-repair-mechanisms>)

DMR2 region [18]. Epigenetičko utišavanje *MGMT* za posledicu ima smanjenje funkcije *MGMT* enzima čime se onemogućava adekvatna reparacija oštećenja DNK prouzrokovanih alkilirajućom terapijom.

Hipermetilacija *MGMT* je kod primarnih GBM najčešće praćena gubitkom jedne kopije alela usled delecije q kraka hromozoma 10 (*chromosome 10q deletion*, eng.) koji nosi *MGMT* lokus (10q26) [18]. U takvim slučajevima, metilacija preostalog *MGMT* alela u potpunosti inhibira reparacionu funkciju *MGMT* što potvrđuje značaj epigenetičkog vida regulacije ekspresije *MGMT* gena [4,19].

Zbog visoke zastupljenosti u GBM i potencijalnog direktnog uticaja na uspeh hemioterapije, prognostički i predikcioni značaj metilacije *MGMT* promotora je intenzivno ispitivan. Prve dokaze o uticaju metilacije *MGMT* promotora na terapijski odgovor pružilo je „Stupp“-ovo kliničko ispitivanje u kome je pozitivan status metilacije povezan sa dužim vremenom preživljavanja pacijenata bez obzira na vid terapije, radiote-

rapiju ili radioterapiju kombinovanu sa TMZ [20]. Prognostička uloga metilacije *MGMT* promotora u slučajevima terapije Temozolomidom dodatno je potvrđena potonjim kliničkim ispitivanjima (RTOG0525) [21]. Sa druge strane, pokazano je da je pozitivan status metilacije *MGMT* promotora takođe povoljan predikcioni faktor odgovora na radioterapiju u odsustvu hemioterapije kod GBM pacijenata [22]. To navodi na zaključak da je *MGMT* potencijalno uključen i u reparaciju oštećenja DNK prouzrokovanih radioterapijom [1].

## EVALUACIJA METILACIJE PROMOTORNOG REGIONA *MGMT* U KLINIČKOJ PRAKSI

Uprkos pouzdanim dokazima o povoljnom prognostičkom značaju metilacije promotornog regiona *MGMT*, rutinska laboratorijska evaluacija ovog markera GBM nije široko zastupljena, najpre zbog nedostataka tehničke standardizacije. Opštu usaglašenost oko načina evaluacije ovog biomarkera onemogućavaju varijacije u metodama detekcije između različitih laboratorija i razlike u definicijama graničnih vrednosti pozitivnog statusa metilacije *MGMT* [18]. Standardizaciju dodatno onemogućava visoka heterogenost uzoraka GBM kao i nedostatak preciznije identifikacije promotornih regiona *MGMT* čija metilacija ima prediktivni značaj [23]. Takođe, postoje dokazi da je šablon ekspresije *MGMT* nezavisan od metilacionog statusa i ishoda lečenja, ukazujući na moguću regulaciju njegove ekspresije putem drugih molekularnih mehanizama izuzev metilacije promotornog regiona i delecije q kraka hromozoma 10 [1]. Uz to, visoka pouzdanost statusa metilacije *MGMT* kao nezavisnog prognostičkog markera otežava njegovu evaluaciju kao samostalnog predikcionog faktora [24, 25, 26].

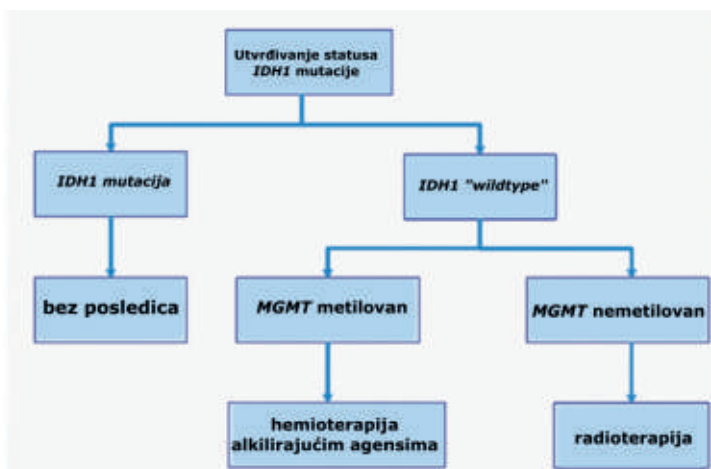
Zbog svega navedenog, implementacija evaluacije ovog parametra u kliničkom donošenju odluka je znatno usporena. Kako terapija temozolomidom može biti od koristi i u odsustvu metilacije *MGMT* promotora, standardni vid tretmana svih GBM pacijenata, bez obzira na status metilacije *MGMT* predstavlja spomenuti „Stupp“ protokol, odnosno radioterapija kombinovana sa primenom TMZ [1,27].

## KOMBINACIJA *IDH1-R132H* I STATUSA METILACIJE *MGMT*

Sve više dokaza upućuje na to da status metilacije *MGMT* može imati znatno pouzdaniji predikcioni značaj u kombinaciji sa drugim molekularnim markerima GBM [18]. Najvažniji takav marker predstavlja status mutacije *IDH1-R132H*. Pokazano je da je kod gotovo svih visokorizičnih *IDH1-R132H* pacijenata obolelih od niskogradusnih glioma registrovana i hipermetilacija *MGMT* promotornog regiona. [28;29]. Randomizovano kliničko ispitivanje Neuroonkološke radne grupe NOA-04 (*The Neurooncology Working Group of the German Cancer Society*, eng.) i NOA-08 pokazali su da je kod *IDH1-R132H* mutiranih GBM (sekundarnih GBM) status metilacije *MGMT* povezan sa poboljšanim vremenom preživljavanja bez progresije tumora (PFS) bez obzira na primenjeni vid terapije - hemioterapije, radioterapije li njihove kombinacije [30]. To dokazuje prognostičku vrednost statusa metilacije *MGMT* kod sekundarnih GBM [31].

Sa druge strane, kod *IDH1* „wildtype“ GBM (primarnih GBM), status metilacije *MGMT* povezan je sa poboljšanjem PFS vremena kod pacijenata koji su primali hemioterapiju alikilirajućim agensima, ali ne i onih koji su primali isključivo radioterapiju kao inicijalni vid terapije GBM [32]. To ukazuje na ulogu statusa metilacije *MGMT* promotora kao predikcionog markera odgovora na hemioterapiju kod *IDH1* „wildtype“ GBM (primarnih GBM) [31].

Na osnovu rezultata NOA-04 kliničkog ispitivanja, predstavljen je interaktivni model formiranja terapijske strategije zasnovan na biomarkerima *IDH1-R132H* mutacije i statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* (Slika 3) [30,31]. Takav model omogućava prilagođavanje modela terapije (alikilirajući agensi, radioterapija) u zavisnosti od statusa metilacije promotora *MGMT* i tipa GBM (primarni ili sekundarni GBM).



Slika 3. NOA-04 interaktivni model izbora terapijske strategije zasnovan na najvažnijim biomarkerima GBM (preuzeto iz rada Rhun i sar., 2015.) [31]

Širu implementaciju ovog modela u kliničkoj praksi onemogućava činjenica da za razliku od pouzdanih metoda utvrđivanja statusa mutacije *IDH1-R132H* (metode sekvenciranja DNK, imunohistohemija), dogovor oko optimalne metode evaluacije statusa metilacije *MGMT* promotora još uvek nije postignut [18]. Kao jedno od mogućih rešenja, predložen je algoritam evaluacije statusa ovog markera koji uključuje više različitih metoda detekcije u zavisnosti od čistoće uzorka, statusa *IDH1* mutacije i kliničkih parametara pacijenta [18].

## METODE DETEKCIJE METILACIJE *MGMT* PROMOTORNOG REGIONA

U najzastupljenije metode detekcije statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona ubrajaju se: metilaciono specifična polimerazna lančana reakcija ili MSP (*Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*, eng.), kvantitativni „real-time“ MSP ili qMSP (*Quantitative MSP*, eng.), bisulfitno sekvenciranje i pirosekvenciranje ili PSQ (*Pyrosequencing*, eng.) i HMR (*High-resolution melt*, eng. – Real-Time PCR sa analizom topljenja visoke rezolucije). Uprkos razlikama u principu očitavanja rezultata, kvantitativnoj ili kvalitativnoj evaluaciji i ceni analize, ove metode dele zajedničke inicijalne korake: izolaciju genomske DNK, kvalitativnu i kvantitativnu proveru izolata DNK i bisulfitnu konverziju DNK izolata. U tabeli 1 prikazane su prednosti i mane različitih metoda određivanja statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona. U metode evaluacije metilacionog statusa *MGMT* promotora koje se ne oslanjaju na proces bisulfitne konverzije spada imunohistohemijska detekcija, MS-MLPA (*methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification*, eng. - metilaciono specifično višestruko umnožavanje proba nezavisno od ligacije), zatim metode hromatinske imunoprecipitacije (Chip) poput „Infinium MethylationEPIC BeadChip“ tehnologije i druge (Tabela 1) [18].

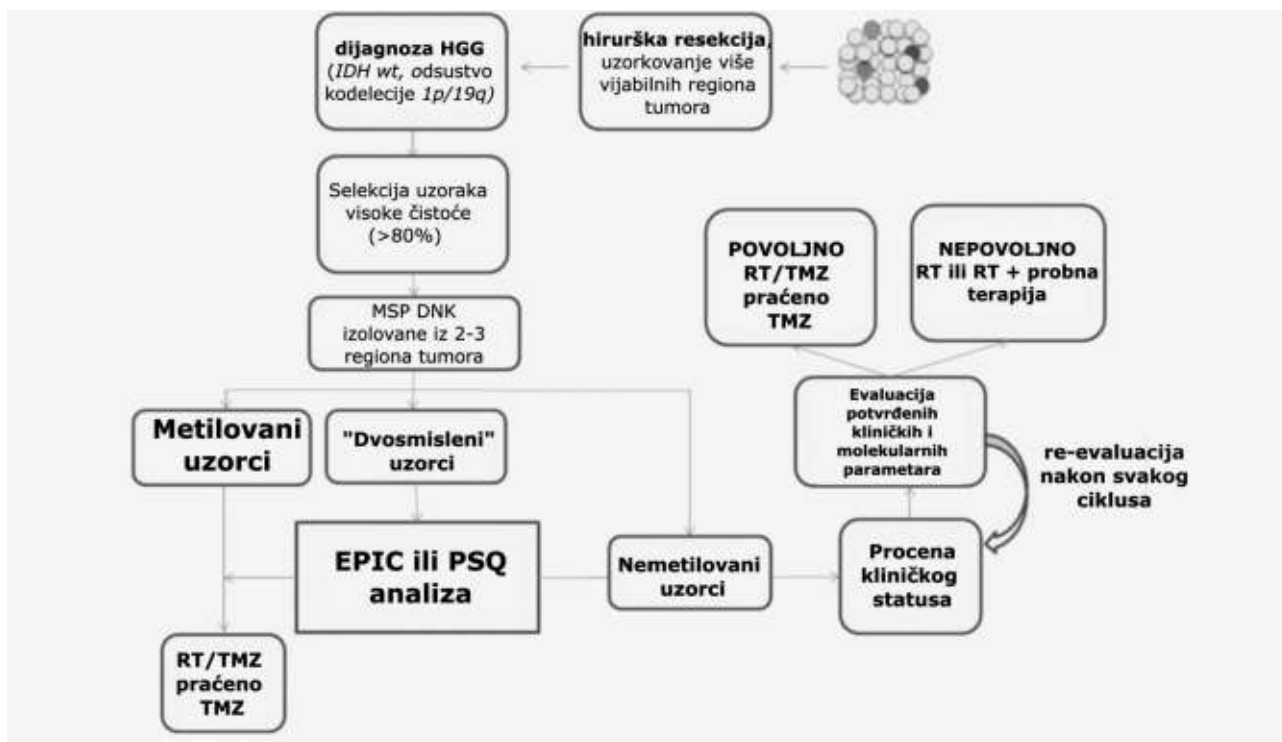
Pirosekvenciranje se smatra najpouzdanijom metodom ili „zlatnim standardom“ evaluacije statusa metilacije, zbog mogućnosti analize individualnih CpG pozicija unutar CpG ostrvaca. Međutim, u kliničkoj rutini interpretacija i određivanje značaja takvih rezultata mogu biti otežani usled pojave uzoraka sa parcijalno metilovanim promotornim regionom *MGMT* [18,33]. Takođe, ova metoda zahteva intenzivni laboratorijski rad, veliko iskustvo i podrazumeva značajna inicijalna ulaganja u opremu. Zbog toga je, uprkos svojim prednostima, PSQ metoda slabo zastupljena u kliničkoj praksi i istraživanjima [18, 33]. U poređenju sa PSQ, MSP i qMSP metode su isplativije, podrazumevaju manji utrošak vremena i korišćenje jednostavnije i dostupnije opreme, zbog čega predstavljaju najbolje kandidate za uvođenje u svakodnevnu kliničku praksu [33]. Na Slici 4. nalazi se šematski prikaz postupka evaluacije metilacionog statusa DMR2 regiona.

Metoda	Vreme izvođenja	Prednosti	Nedostaci	Procenjeni troškovi po uzorku (USD)
<b>Konvencionalni MSP</b>	2 dana	- Pokazana prediktivna i prognostička vrednost - Pristupačna cena	- Nepouzdana rezultati - Slaba pouzdanost analize FFPE uzoraka	\$5/uzorak
<b>Real-Time MSP</b>	2 dana	- Granične vrednosti potvrđene u kliničkim ispitivanjima	- Nepouzdana rezultati za uzorke sa mozaičnim šablonom metilacije - Slaba pouzdanost analize FFPE uzoraka	\$10–20/uzorak
<b>Pirosekvenciranje</b>	5 dana	- Kvantitativna evaluacija	- Visoka cena - Duže vreme do dobijanja rezultata - Granične vrednosti nisu potvrđene u kliničkim ispitivanjima - neophodan centralni objekat za visokoprotočne ( <i>high-throughput</i> , eng.) analitičke metode	\$10–30/uzorak
<b>Real-Time PCR sa analizom topljenja visoke rezolucije</b>	2 dana	- Kvantitativna evaluacija	- Granične vrednosti nisu potvrđene u kliničkim ispitivanjima	\$20–30 /uzorak
<b>EPIC</b>	5 dana	- Omogućava analiziranje dodatnih biomarkera (1p/19q, G-CIMP) - Kompatibilna sa različitim načinima pripreme uzoraka	- Duže vreme dobijanja rezultata - Visoka cena - neophodan centralni objekat za visokoprotočne ( <i>high-throughput</i> , eng.) analitičke metode - Granične vrednosti nisu potvrđene u kliničkim ispitivanjima	\$500–700/uzorak
<b>IHC</b>	2 dana	- Niska cena	- Varijabilnost u evaluaciji od strane različitih posmatrača - Nekonzistentna korelacija sa kliničkim ishodima	\$10–30/uzorak
<b>MLPA</b>	2 dana	- Nije neophodna bisulfitna konverzija uzoraka - Niska cena	- Prediktivna upotrebljivost nije dokazana	\$10–30/uzorak

Tabela 1. Prednosti i mane različitih metoda određivanja statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona [18]

Mansouri i saradnici su 2019. godine na osnovu dostupnih podataka o pristupima evaluaciji statusa metilacije *MGMT*, predložili optimalni model njegove kliničke evaluacije. Oni su pritom naglasili važnost uzimanja u obzir drugih molekularnih markera GBM, poput *IDH1* mutacije i predložili dijagnostički protokol za slučajeve gde je evaluacija statusa *MGMT* nejasna (Slika 5.) [18].





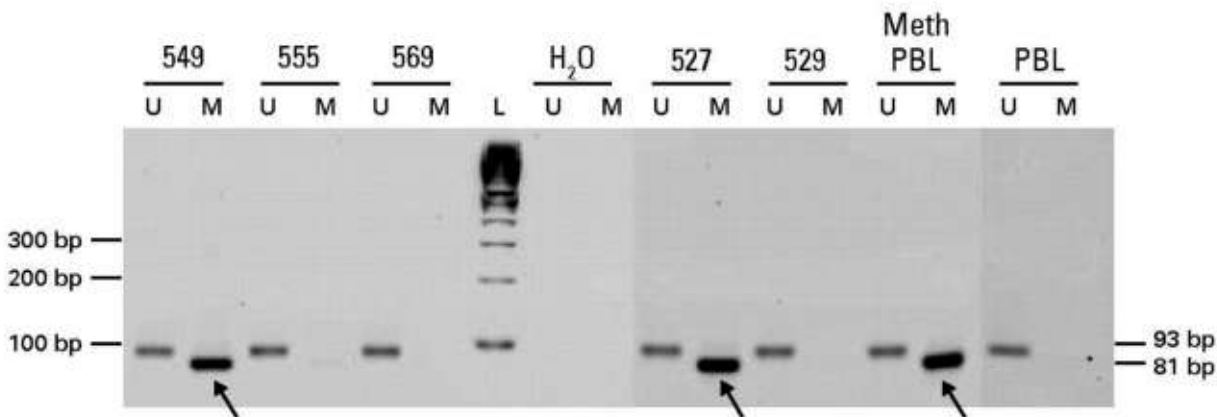
**Slika 5.** Predloženi algoritam lečenja GBM pacijenata zasnovan na statusu metilacije *MGMT* i drugih kliničkih parametara; HGG – high grade glioma, eng. – gliomi visokog gradusa (preuzeto iz rada Mansouri i sar., 2019) [18]

## METILACIONO-SPECIFIČNA POLIMERAZNA LANČANA REAKCIJA

Metilaciono-specifična polimerazna lančana reakcija ili MSP predstavlja najranije opisanu i najzastupljeniju metodu detekcije metilacije *MGMT* promotornog regiona, a njena validnost je više puta dokazana randomizovanim studijama [18,34,35,36].

Suštinu ove tehnike čini bisulfitna konverzija DNK izolata kojom se postiže konvertovanje nemetilovanog citozina u uracil. Bisulfitna konverzija je praćena amplifikacijom *MGMT* alela (ili druge sekvence DNK od interesa) metodom polimerazne lančane reakcije PCR (*polymerase chain reaction*, eng.), uz korišćenje posebno dizajniranih oligonukleotida koji prepoznaju i vezuju specifična CpG mesta unutar DMR1/2 regiona [37]. Amplifikacija se izvršava istovremeno u dve zasebne PCR reakcije - u jednoj dolazi do umnožavanja metilovanog PCR produkta, a u drugoj nemetilovanog PCR produkta. Pri tome se koriste dva seta oligonukleotida, od kojih jedan set prepoznaje metilovanu formu promotorne sekvence, a drugi njenu nemetilovanu formu. Oligonukleotidi za metilovanu formu omogućavaju amplifikaciju isključivo potpuno metilovanih regiona *MGMT* koji imaju biološku funkciju utišavanja *MGMT* transkripcije. Drugačiji šabloni metilacije (nepotpuna metilacija) ovih CpG pozicija koji bi mogli imati biološku ulogu utišavanja transkripcije se zbog toga ne mogu detektovati, što umanjuje senzitivnost metode. Najpouzdaniji i najčešće korišćeni setovi oligonukleotida za *MGMT* promotorni region definisali su Esteller i saradnici pre dve decenije [38]. PCR produkti koji se dobijaju njihovom primenom obuhvataju CpG mesta od pozicije 73 do pozicije 90 unutar DMR2 regiona [38,39].

Umnožene sekvence se vizuelizuju metodom gel-elektroforeze u cilju kvalitativne interpretacije signala (utvrđivanja prisustva PCR produkta određene dužine) (Slika 6.) [38,40].



**Slika 5.** Vizuelizacija MSP rezultata na gel-elektroforetskom snimku; strelice označavaju metilovanu M formu *MGMT* promotornog regiona; U – nemetilovana forma *MGMT* promotornog regiona; L – (*ladder, eng.*) 100 bp DNK marker; PBL – *peripheral blood lymphocytes, eng.* – uzorak DNK izolovane iz leukocita periferne krvi; Meth PBL – *methylated peripheral blood lymphocytes, eng.* – metilovani uzorak DNK izolovane iz leukocita periferne krvi (preuzeto iz rada Hegi i sar., 2008.) [40]

Uspeh bisulfitne konverzije zavisi od kvaliteta DNK izolata i tipa uzoraka tkiva. Iako su uzorci FFPE tkiva (*formalin-fixed and paraffin-embedded Tissue, eng.* - tkiva fiksirana u formalinu i ukalupljena u parafinske blokove) zbog nezahtevnih uslova skladištenja najuobičajeniji izvor DNK materijala pri MSP analizama (i molekularno-biološkim analizama uopšte), izolate DNK poreklom iz njih često odlikuje nizak kvalitet odnosno visok stepen degradacije. Zbog toga se pri izvođenju MSP metode savetuje izbegavanje ovakvih uzoraka, kada god je to moguće [23,41].

Originalna MSP metoda je pouzdana jedino u detekciji izrazito metilovanih ili nemetilovanih uzoraka zbog toga što zavisi od subjektivne interpretacije (uočavanja traka PCR produkta na elektroforetskom gelu). Međutim, evaluacija slabije metilovanih uzoraka pokazala se nepouzdanom, a takvi uzorci se označavaju kao „dvosmisleni“. Pored toga, deo uzoraka (DNK izolata) može pokazati različiti status metilacije za više replikata, što se označava kao „nekonzistentni“ status metilacije. Pokazano je da stopa nekonzistentnosti MSP metode iznosi 12%, a pronađeno je da se vreme preživljavanja pacijenata kod kojih je utvrđen „nekonzistentni“ status metilacije poklapalo sa vremenom preživljavanja pacijenata sa nemetilovanim *MGMT* promotornim regionom [42].

Ova metoda ne omogućava preciznu kvantitativnu evaluaciju metilacije promotornog regiona *MGMT* gena. Kvantitativna evaluacija sa ciljem detekcije manjih grupa ćelijskih klonova sa metilovanim promotrom *MGMT* može imati predikcioni i prognostički značaj usled visoke intratumorske heterogenosti GBM uzoraka. U prilog tome govori saznanje da čak i pacijenti sa niskim nivoom metilacije *MGMT* promotora mogu imati korist od terapije alikilirajućim agensima. To je podržano činjenicom da GBM mogu sadržati male populacije glioma-inicirajućih ćelija (GIC) koje se karakterišu visokom stopom metilacije *MGMT*. [18, 43]. Uprkos tome, rezultati većeg broja studija ukazuju na „dozno-zavisni“ trend, po kome je porast stepena metilacije asociran sa boljim vremenom preživljavanja [43].

Računarskom obradom gel-elektroforetskih snimaka uz pomoć softvera poput „ImageJ“ (ImageJ software analysis (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA), eng.) moguće je donekle unaprediti interpretaciju MSP rezultata i dobiti semi-kvantitativne vrednosti statusa metilacije, što povećava potencijal ove metode za širu kliničku primenu u dijagnostičkim procedurama. Tako su Christians i saradnici na osnovu odnosa intenziteta metilovanih (M – *methylated, eng.*) i nemetilovanih (U – *unmethylated, eng.*) PCR amplikona *MGMT* promotornog regiona na elektroforetskom gelu definisali tri nivoa metilacije: jako metilovani- ukoliko je M/U vrednost veća od 1, slabo metilovani – ukoliko je M/U vrednost između 0 i 1 i nemetilovani - M/U vrednost jednaka 0 [44].

Uprkos navedenim ograničenjima, MSP predstavlja najčešće korišćenu i visoko standardizovanu metodu koja pruža čvrste i pouzdane rezultate u roku od nekoliko sati, uz minimalne troškove analize.

## KVANTITATIVNA METILACIONO-SPECIFIČNA POLIMERAZNA LANČANA REAKCIJA (qMSP)

Kvantitativna MSP analiza deli isti princip analize sa konvencionalnom MSP, uz dodatak upotrebe „Real-time“ PCR tehnologije odnosno fluorimetrije.

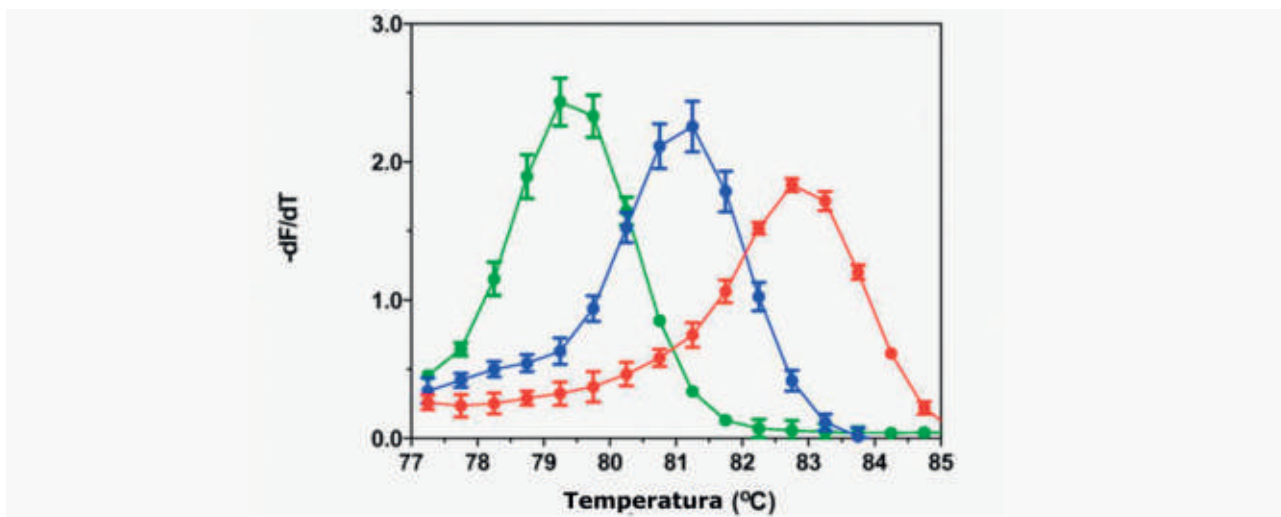
Zahvaljujući fluorimetrijskoj nadgradnji PCR sistema omogućena je kvantifikacija specifične sekvence DNK u uzorku i prevazilaženje ograničenja koja odlikuju konvencionalni kvalitativni PCR. U zavisnosti od prirode fluorimetrijskih reagenasa, postoje dva osnovna pristupa „Real-time“ PCR kvantifikaciji: direktni i indirektni pristup. Direktni pristup podrazumeva korišćenje fluorofora (poput SYBR Green boje) koje se nespecifično vezuju za dsDNA (double stranded DNA, eng. – dvolančani DNK molekul). Indirektni pristup se zasniva na korišćenju specifičnih, fluorescentnim bojama obeleženih DNK proba koje prepoznaju i isključivo se vezuju za sekvencu od interesa u uzorku (FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer, eng. - fluorescentni rezonantni transfer energije) tehnologija, *TaqMan*<sup>®</sup> probe).

Bez obzira na pristup, intenzitet emitovane fluorescencije detektuje se pomoću odgovarajućeg optičkog detekcionog sistema u cilju definisanja  $C_t$  (cycle threshold, eng.) ( $C_q$ ) vrednosti i konstruisanja krive amplifikacije.  $C_t$  vrednost se definiše kao broj PCR ciklusa u kome se registruje značajna promena intenziteta fluorescencije ( $dR_n$ ) u odnosu na „pozadinski“ signal. Niska  $C_t$  vrednost ukazuje na visoku početnu koncentraciju sekvence od interesa u uzorku, i obratno.  $C_t$  vrednost predstavlja ključni parametar qPCR analize i na osnovu nje je moguće odrediti početnu koncentraciju sekvence od interesa u uzorku (apsolutna kvantifikacija) ili uporediti njenu koncentraciju sa koncentracijom neke druge sekvence ili gena u uzorku (relativna kvantifikacija). Upotreba ove metode pri evaluaciji statusa metilacije *MGMT* promotora se najčeće oslanja na relativnu kvantifikaciju (SYBR-Green), odnosno normalizaciju broja kopija metilovanog *MGMT* PCR produkta u odnosu na broj kopija nemetilovane forme *MGMT* promotora i/ili nekog gena „normalizatora“, „housekeeping“ gena poput ACTB (Beta-Actin, eng. - beta aktin) [18,39]. Na ovaj način je omogućena pouzdanija semikvantifikacija (semi-kvantitativni MS-MSP) odnosno kvantifikacija (kvantitativni MSP) statusa metilacije *MGMT* promotora u uzorcima tumora [33,45].

Kod indirektnog pristupa PCR kvantifikaciji, registrovanje amplifikacije tokom PCR reakcije predstavlja pouzdan i dovoljan dokaz za identifikaciju PCR produkta od interesa, zahvaljujući FRET probama dizajniranim za specifično prepoznavanje sekvence od interesa.

Sa druge strane, direktni pristup Real-Time PCR tehnologije uključuje konstruisanje „krive topljenja“ (*melting curve analysis*, eng.) koja omogućava identifikaciju specifičnog PCR produkta. Njen oblik je određen dužinom DNK fragmenta koji se amplifikuje, kao i njegovim nukleotidnim sastavom [46]. Svaki PCR produkt odlikuje karakteristična temperatura topljenja, odnosno temperatura na kojoj je denaturisano 50% molekula DNK. Karakteristična temperatura topljenja nekog PCR produkta se na grafiku krive topljenja uočava kao njen „pik“ koji dokazuje prisustvo tog PCR produkta u uzorku [47].

Direktna, semi-kvantitativna qMSP metoda dovodi do uštede vremena utrošenog na dokazivanje prisustva specifičnog PCR produkta, koje se kod konvencionalne MSP metode oslanja na metodu gel-elektroforeze. Ovom metodom se postiže evaluacija statusa metilacije *MGMT* korišćenjem ranije navedenih konvencionalnih MSP oligonukleotida pri direktnom Real-Time pristupu qMSP, gde je prisustvo „pik“-a na temperaturi od 81 °C grafika krive topljenja dokaz za prisustvo metilovane forme promotornog regiona *MGMT* (Slika 7.) [46,47].



Slika 3. NOA-04 interaktivni model izbora terapijske strategije zasnovan na najvažnijim biomarkerima GBM (preuzeto iz rada Rhun i sar., 2015.) [31]

Međutim, kako bi rezultati qMSP bili klinički relevantni, neophodno je precizirati granične vrednosti za razlikovanje metilovanih od nemetilovanih uzoraka. Tehnička granična vrednost koja označava verovatnoću prisustva/odsustva metilacije od 50% se najčešće koristi za razdvajanje pozitivnih i negativnih rezultata [18]. Ukoliko je dobijeni rezultat u blizini granične vrednosti, on se smatra „dvosmislenim“ ili „unutar sive zone“ [18].

Yoshioka i saradnici su u studiji koja se odnosila na semikvantitativnu qMSP evaluaciju, pored prisustva pika pri temperaturi od 81 °C na krivi topljenja, kao dodatni kriterijum za definisanje pozitivnog statusa metilacije definisali i  $\Delta C_t$  granične vrednosti.  $\Delta C_t$  granična vrednost izražava se kao razlika između dobijenih  $C_t$  vrednosti za nemetilovani i metilovani *MGMT* produkt. U navedenoj studiji zabeležene su statistički značajne razlike u kliničkom ishodu GBM pri korišćenju  $\Delta C_t$  graničnih vrednosti koje su iznosile 0,2,4,6 [33].

### PROCENAT METILOVANE REFERENCE *MGMT* – NAJPOUZDANIJI PRISTUP qMSP

Kao potencijalno najoptimalnija metoda qMSP kvantifikacije statusa metilacije izdvaja se ona koju su predstavili Havik i saradnici [45]. Ona podrazumeva kvantitativno izražavanje stepena metilacije promotornog regiona *MGMT* kao procenta metilovane reference (PMR, *percentage of methylated reference*, eng. ), pri čemu se kao granična vrednost uzima  $PMR=0$  [45]. PMR predstavlja relativni odnos količine metilovanog *MGMT* produkta u uzorku i količine metilovanog *MGMT* produkta u komercijalno dostupnoj metilovanoj kontroli (bisulfitno konvertovana *in vitro* metilovana humana DNK, Chemicon, Millipore). Kao kalibrator nulte PMR vrednosti preporučuju su uzorci meningioma koje karakteriše odsustvo metilacije *MGMT* promotora. Količine *MGMT* promotora u uzorku i kontroli normalizuju se korišćenjem oligonukleotida za *ALU-C4* repetitivnu sekvencu po sledećoj formuli.

$$PMR = \frac{M / ALU \text{ u uzorku}}{M / ALU \text{ u metilovanoj kontroli}}$$

Takođe, za uzorke koji imaju veću vrednost od granične  $C_t$  vrednosti (35), smatra se da je količina PCR produkta jednaka 0 [45].

U brojnim istraživanjima, ali i velikim kliničkim studijama, qMSP metoda je pokazala visok potencijal za primenu u kliničkoj praksi, pre svega zbog visoke reproducibilnosti rezultata i pouzdanosti, ali i pristupačnih troškova.

## ZAKLJUČAK

Otkriće *IDH1 R132H* mutacije kao molekularnog markera glioblastoma značajno je unapredilo klasifikaciju difuznih glioma, a naročito glioma nižeg gradusa. Dokazi o direktnom uticaju ove mutacije na povećanje produkcije onkometabolita 2-HG povezanog sa ćelijskim preživljavanjem, epigenetičkim mehanizmima regulacije aktivnosti gena i metaboličkih procesa otvorili su mogućnost razvoja ciljane terapije putem inhibitora mutirane forme IDH enzima. Iako je još uvek nepoznato na koji način *IDH* mutacije promovišu procese inicijacije i progresije GBM, kao i razlog povoljnijeg kliničkog ishoda kod nosioca ove mutacije, evaluacija statusa ovog markera nezaobilazna je u kliničkoj praksi i prognostičkoj stratifikaciji GBM. Predloženi modeli kombinovane evaluacije statusa *IDH1 R132H* mutacije i statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* predstavljaju obećavajuću pomoć prilikom prilagođavanja terapijskih protokola pojedinačnim pacijentima – primene alkilirajućih agenasa odnosno radioterapijskih režima. Takođe, uzimajući u obzir dokazanu usku povezanost kliničkog ishoda kod GBM pacijenata i statusa metilacije *MGMT*, šira zastupljenost evaluacije statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* MSP metodom pri dijagnostičkim laboratorijama postavlja se kao imperativ u unapređenju molekularnog profilisanja tumora kod GBM pacijenata.

## ZAHVALNICA

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije - broj ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada NIO u 2022. godini: 451-03-68/2022-14/200124.

**LITERATURA**

1. Crespo I, Vital AL, Gonzalez-Tablas M, Patino MdC, Otero A, Lopes MC, et al. Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *The American Journal of Pathology*. 2015;185(7):1820-33.
2. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*. 2016;131(6):803-20.
3. Olar A, Aldape KD. Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *The Journal of Pathology*. 2014;232(2):165-77.
4. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *New England Journal of Medicine*. 2009;360(8):765-73.
5. Visser O, Ardanaz E, Botta L, Sant M, Tavilla A, Minicozzi P, et al. Survival of adults with primary malignant brain tumours in Europe; Results of the EUROCARE-5 study. *European Journal of Cancer*. 2015;51(15):2231-41.
6. Huang LE. Friend or foe—IDH1 mutations in glioma 10 years on. *Carcinogenesis*. 2019;40(11):1299-307.
7. Mansouri A, Karamchandani J, Das S. Molecular Genetics of Secondary Glioblastoma. In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Sep 27. Chapter 2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK469981/> doi: 10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch2
8. Huang LE, Cohen AL, Colman H, Jensen RL, Fufts DW, Couldwell WT. IGF2BP2 expression predicts IDH-mutant glioma patient survival. *Oncotarget*. 2017;8(1):191-202.
9. Chowdhury R, Yeoh KK, Tian Y-M, Hillringhaus L, Bagg EA, Rose NR, et al. The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO reports*. 2011;12(5):463-9.
10. Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N, Turcan S, Grommes C, Campos C, et al. An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science*. 2013;340(6132):626-30.
11. Struys EA. D-2-Hydroxyglutaric aciduria: Unravelling the biochemical pathway and the genetic defect. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2006;29(1):21-9.
12. Tiburcio PDB, Xiao B, Berg S, Asper S, Lyne S, Zhang Y, et al. Functional requirement of a wild-type allele for mutant IDH1 to suppress anchorage-independent growth through redox homeostasis. *Acta Neuropathologica*. 2018;135(2):285-98.
13. Bardella C, Al-Dalahmah O, Krell D, Brazauskas P, Al-Qahtani K, Tomkova M, et al. Expression of Idh1(R132H) in the Murine Subventricular Zone Stem Cell Niche Recapitulates Features of Early Gliomagenesis. *Cancer Cell*. 2016;30(4):578-94.
14. Koivunen P, Lee S, Duncan CG, Lopez G, Lu G, Ramkissoon S, et al. Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature*. 2012;483(7390):484-8.
15. Izquierdo-Garcia JL, Viswanath P, Eriksson P, Cai L, Radoul M, Chaumeil MM, et al. IDH1 Mutation Induces Reprogramming of Pyruvate Metabolism. *Cancer Res*. 2015;75(15):2999-3009.
16. Herrlinger U, Rieger J, Koch D, Loeser S, Blaschke B, Kortmann R-D, et al. Phase II Trial of Lomustine Plus Temozolomide Chemotherapy in Addition to Radiotherapy in Newly Diagnosed Glioblastoma: UKT-03. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(27):4412-7.
17. Cankovic M, Nikiforova MN, Snuderl M, Adesina AM, Lindeman N, Wen PY, et al. The Role of *MGMT* Testing in Clinical Practice: A Report of the Association for Molecular Pathology. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2013;15(5):539-55.
18. Mansouri A, Hachem LD, Mansouri S, Nassiri F, Laperriere NJ, Xia D, et al. *MGMT* promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro-Oncology*. 2019;21(2):167-78.
19. Wick W, Weller M, van den Bent M, Sanson M, Weiler M, von Deimling A, et al. *MGMT* testing—the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nature Reviews Neurology*. 2014;10(7):372-85.
20. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(10):987-96.
21. Gilbert MR, Wang M, Aldape KD, Stupp R, Hegi M, Jaeckle KA, et al. RTOG 0525: A randomized phase III trial comparing standard adjuvant temozolomide (TMZ) with a dose-dense (dd) schedule in newly diagnosed glioblastoma (GBM). *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(15\_suppl):2006-.

22. Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, Colman H, De La Cruz C, Sulman EP, et al. MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro-Oncology*. 2010;12(2):116-21.
23. Jovanović NM, Nikolov V, Vidović N, Vitorović J, Cvetković VJ, Mitrović T, et al. Optimizing conditions for MGMT promoter methylation status analysis in glioblastoma FFPE samples. *Biologica Nyssana* 2020; 11: 139–147.
24. Jovanović N, Mitrović T, Cvetković VJ, Tošić S, Vitorović J, Stamenković S, et al. The Impact of MGMT Promoter Methylation and Temozolomide Treatment in Serbian Patients with Primary Glioblastoma. *Medicina*. 2019;55(2).
25. Jovanović N, Mitrović T, Cvetković VJ, Tošić S, Vitorović J, Stamenković S, et al. Prognostic significance of MGMT promoter methylation in diffuse glioma patients. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2019;33(1):639-44.
26. Esteller M. Epigenetics in Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(11):1148-59.
27. Perry JR, Laperriere N, O'Callaghan CJ, Brandes AA, Menten J, Phillips C, et al. Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2017;376(11):1027-37.
28. Baumert BG, Hegi ME, van den Bent MJ, von Deimling A, Gorlia T, Hoang-Xuan K, et al. Temozolomide chemotherapy versus radiotherapy in high-risk low-grade glioma (EORTC 22033-26033): a randomised, open-label, phase 3 intergroup study. *Lancet Oncol*. 2016;17(11):1521-32.
29. van den Bent MJ, Dubbink HJ, Marie Y, Brandes AA, Taphoorn MJ, Wesseling P, et al. IDH1 and IDH2 mutations are prognostic but not predictive for outcome in anaplastic oligodendroglial tumors: a report of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(5):1597-604.
30. Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, et al. NOA-04 Randomized Phase III Trial of Sequential Radiochemotherapy of Anaplastic Glioma With Procarbazine, Lomustine, and Vincristine or Temozolomide. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(35):5874-80.
31. Le Rhun E, Rhun EL, Taillibert S, Chamberlain MC. The future of high-grade glioma: Where we are and where are we going. *Surgical neurology international*. 2015;6(Suppl 1):S9-s44.
32. Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(7):707-15.
33. Yoshioka M, Matsutani T, Hara A, Hirono S, Hiwasa T, Takiguchi M, et al. Real-time methylation-specific PCR for the evaluation of methylation status of MGMT gene in glioblastoma. *Oncotarget*. 2018;9(45).
34. Bujko M, Kowalewska M, Danska-Bidzinska A, Bakula-Zalewska E, Siedlecki JA, Bidzinski M. The promoter methylation and expression of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in uterine sarcoma and carcinosarcoma. *Oncol Lett*. 2012;4(3):551-5.
35. Cho B, Lee H, Jeong S, Bang Y-J, Lee HJ, Hwang KS, et al. Promoter hypomethylation of a novel cancer/testis antigen gene CAGE is correlated with its aberrant expression and is seen in premalignant stage of gastric carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003;307(1):52-63.
36. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(5):1827-31.
37. Grossman R, Burger P, Soudry E, Tyler B, Chaichana KL, Weingart J, et al. MGMT inactivation and clinical response in newly diagnosed GBM patients treated with Gliadel. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2015;22(12):1938-42.
38. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res*. 1999;59(4):793-7.
39. Johannessen LE, Brandal P, Myklebust T, Heim S, Micci F, Panagopoulos I. MGMT Gene Promoter Methylation Status - Assessment of Two Pyrosequencing Kits and Three Methylation-specific PCR Methods for their Predictive Capacity in Glioblastomas. *Cancer genomics & proteomics*. 2018;15(6):437-46.
40. Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, et al. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(25):4189-99.

41. Tournier B, Chapusot C, Courcet E, Martin L, Lepage C, Faivre J, et al. Why do results conflict regarding the prognostic value of the methylation status in colon cancers? the role of the preservation method. *BMC Cancer*. 2012;12(1):12.
42. Xia D, Reardon DA, Bruce JL, Lindeman NI. The Clinical Implications of Inconsistently Methylated Results from Glioblastoma MGMT Testing by Replicate Methylation-Specific PCR. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2016;18(6):864-71.
43. Sciuscio D, Diserens AC, van Dommelen K, Martinet D, Jones G, Janzer RC, et al. Extent and patterns of MGMT promoter methylation in glioblastoma- and respective glioblastoma-derived spheres. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(2):255-66.
44. Christians A, Hartmann C, Benner A, Meyer J, von Deimling A, Weller M, et al. Prognostic value of three different methods of MGMT promoter methylation analysis in a prospective trial on newly diagnosed glioblastoma. *PLoS one*. 2012;7(3):e33449.
45. Håvik AB, Brandal P, Honne H, Dahlback H-SS, Scheie D, Hektoen M, et al. MGMT promoter methylation in gliomas-assessment by pyrosequencing and quantitative methylation-specific PCR. *Journal of Translational Medicine*. 2012;10(1):36.
46. Lorente A, Mueller W, Urdangarín E, Lázcoz P, von Deimling A, Castresana JS. Detection of methylation in promoter sequences by melting curve analysis-based semiquantitative real time PCR. *BMC Cancer*. 2008;8(1):61.
47. Smith E, Jones ME, Drew PA. Quantitation of DNA methylation by melt curve analysis. *BMC Cancer*. 2009;9(1):123.





## IMPRESUM

### Trendovi u molekularnoj biologiji, 2022.

Izdavač

**Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,  
Univerzitet u Beogradu**

Urednik

Dr **Sonja Pavlović**, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerzitet u Beogradu

Uređivački odbor

Dr **Jelena Begović**, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerzitet u Beogradu

Prof. dr **Ivana Novaković**, redovni profesor,  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr **Dužanka Savić Pavićević**, redovni profesor,  
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Ana Đorđević**, naučni savetnik,  
Univerzitet u Beogradu Institut za biološka istraživanja  
„Siniša Stanković“

Recenzenti

Dr **Svetlana Radović**, redovni profesor,  
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Vesna Škodrić Trifunović**, redovni profesor,  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Gordana Nikčević**, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerzitet u Beogradu

Dizajn i izrada korica

**Ivan Strahinić**

Štampa

**Curent Print**, Beograd

Periodičnost izlaženja publikacije

**Godišnje**

Tiraž

**100 primeraka**

**Autori**

Aleksandar Cingel.....	238
Ana Branković.....	63
Ana Djordjević.....	63
Branislava Medić Brkić.....	15
Dragana Srebro.....	15
Dunja Drakulić.....	168
Dusan Keckarević.....	51, 275
Goran Brajušković.....	63
Gordana Matić.....	8
Ilona Đorić.....	75
Ivana Guševac Stojanović.....	168
Jelena Martinović.....	186
Jelena Perić.....	143
Jovana Despotović.....	90
Katarina Savić Vujović.....	15
Katarina Zeljić.....	223
Mariana Stanišić.....	255
Marijana B. Živković.....	104
Marina Zarić Kontić.....	186
Milena Trajković.....	238
Milena Ugrin.....	32
Milica Keckarević Marković.....	51, 275
Milica Popović.....	63
Miljana Kecmanović.....	51, 275
Neda Đorđević.....	206
Nevena Banjac.....	223
Nikola Jovanović.....	125
Predrag Vujović.....	155
Sladjana Jevremović.....	238
Slavica Ninković.....	223
Sonja Šelemetjev.....	75
Sonja Vučković.....	15
Suzana Matijašević-Joković.....	63
Tamara Dakić.....	155
Tatjana Mitrović.....	125
Tijana Išić Denčić.....	75
Zorana Dobrijević.....	63

CIP - Каталогизacija u publikaciji  
Narodna biblioteka Srbije, Beograd

577.2

**TRENDOVI u molekularnoj biologiji** = Trends in  
Molecular Biology. - 2022, br. 2 (sep.)- . - Beograd :  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,  
2021- (Beograd : Curent Print). - 28 cm

Godišnje. - Tekst na srp. i engl. jeziku.  
ISSN 2787-2947 = Trendovi u molekularnoj biologiji  
COBISS.SR-ID 45105929