

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Vedrana Milinković

**DETEKCIJA I KARAKTERIZACIJA  
GENOMSKE NESTABILNOSTI TUMORA  
MOZGA GLIJALNOG POREKLA**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Vedrana Milinković

**DETECTION AND CHARACTERIZATION  
OF GENOMIC INSTABILITY IN PATIENTS  
WITH MALIGNANT GLIOMA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

# MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE

## **Mentori:**

dr Gordana Matić, redovni profesor  
Biološki fakultet  
Univerzitet u Beogradu

dr Nikola Tanić, naučni savetnik  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“  
Univerzitet u Beogradu

## **Članovi komisije:**

dr Jasna Banković, naučni saradnik  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“  
Univerzitet u Beogradu

dr Miodrag Rakić, vanredni profesor  
Medicinski fakultet  
Univerzitet u Beogradu

dr Sabera Ruždijić, naučni savetnik  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“  
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

## ZAHVALNICA

*Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu neurobiologiju, Odeljenja za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu u okviru projekata #143009 Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj i III41031 Ministarstva za prosvetu i nauku, Republike Srbije.*

*Najveću zahvalnost dugujem dr Nikoli Taniću, mom mentoru i rukovodiocu projekta III41031, koji je kvalitetno osmislio ovu disertaciju i pružao pomoć u svim fazama realizacije, naročito prilikom rešavanja problema i diskutovanja dobijenih rezultata. Veliko hvala za ukazano poverenje, podršku i znanje koje je nesebično delio sa mnom. Takođe bih se zahvalila dr Saberi Ruždijić na pruženoj prilici za rad u nauci, kao i na nesebičnoj podršci i korisnim savetima tokom izrade teze.*

*Dr Jasni Banković dugujem veliku zahvalnost za uvođenje u svet naučnih eksperimenata. Svojim dragim kolegicama iz laboratorije 25 želim da se zahvalim na pomoći, podršci, korisnim savetima i razmeni iskustava, a naročito na prijatnoj atmosferi bez koje rad ne bi predstavljao zadovoljstvo.*

*Dr Selmi Kanazir i kolegama iz laboratorija 32 i 33 se zahvaljujem na podršci i pomoći tokom izrade ovog rada.*

*Mužu, hvala na ljubavi, strpljenju i toleranciji. Hvala što se trudiš da razumeš.*

*Ovaj rad je posvećen mojoj mami i mojoj Tari, kao nastavak i da se nastavi...*

## REZIME

### Detekcija i karakterizacija genomske nestabilnosti tumora mozga glijalnog porekla

Glioblastomi (GBM) predstavljaju najčešći i najmaligniji tip tumora mozga. Iako imaju istu histopatološku sliku, primarni i sekundarni glioblastomi se razlikuju po mehanizmu nastanka i setu karakterističnih genetičkih promena. Iako je tokom poslednjih godina došlo do određenog poboljšanja u sagledavanju njihove kompleksne prirode, glioblastomi i dalje predstavljaju neizlečivu bolest. Osnovni cilj ove doktorske disertacije bio je detekcija i kvantifikacija genomske nestabilnosti, kao i identifikacija specifičnih genetičkih promena odgovornih za promociju i progresiju malignih glioma, a sa dugoročnim ciljem da se definišu potencijalni molekularni markeri za dijagnozu i prognozu bolesti. Sa tim u vezi, izvršena je i analiza najčešćih poznatih genetičkih promena u gliomima: detekcija inaktivacije ključnih tumor supresor gena (*p53*, *PTEN* i *p16*) i amplifikacije *EGFR* onkogeno. Promene dva ili više navedenih gena su prisutne u većini analiziranih uzoraka, što potvrđuje značaj višestrukih genskih alteracija u patogenezi glioma.

Upoređivanjem AP-PCR DNK profila tumorskog i zdravog tkiva pacijenata uočena su dva tipa razlika: kvalitativne razlike koje nastaju usled promena u sekvenci DNK molekula i predstavljaju manifestaciju mikrosatelitske nestabilnosti i nestabilnosti pojedinačnih nukleotida (MIN-PIN), kao i kvantitativne razlike nastale usled amplifikacija ili delecija većih hromozomskih regiona, pokazatelj hromozomske nestabilnosti (CIN). Oba tipa promena su prisutna u svim analiziranim uzorcima, doprinoseći podjednako visokom stepenu ukupne genomske nestabilnosti u oba histološka podtipa GBM. Detaljnija analiza DNK profila je omogućila identifikaciju specifičnih promena 11 novih gena, koji do sada nisu povezani sa progresijom glioma: *LHFPL3*, *SGCG*, *HTR4*, *ITGB1*, *CPS1*, *PROS1*, *GP2*, *KCNG2*, *PDE4D*, *KIR3DL3* i *INPP5A*. Većina identifikovanih gena ima značajnu ulogu u procesima signalne transdukcije i ćelijske adhezije, koji su veoma značajni za nastanak i progresiju kancera. Prisustvo promena u identifikovanim genima je, dalje, korelisano sa kliničko-patološkim parametrima, stepenom genomske nestabilnosti i preživljavanjem pacijenata, kao i sa statusom *p53*, *PTEN*, *p16* i *EGFR* gena. Pokazane su statistički značajne ko-alteracije nekih od identifikovanih gena sa *p53*, *p16* i *EGFR* genima, ali nije pokazana statistički značajna povezanost između inaktiviranog PTEN-a i bilo kojeg novog

identifikovanog gena. Svi rezultati ove studije potvrđuju da se u osnovi glioma nalaze izuzetno složeni genetički mehanizmi, pri čemu je naročito značajan visok stepen genomske nestabilnosti koji potencijalno predstavlja jednu od osnovnih karakteristika ovog tipa tumora. Osim toga, ova studija je prva koja je ukazala na potencijalni značaj identifikovanih gena u patogenezi glioma, kao i na njihovu primenu kao potencijalnih biomarkera za dijagnostiku i prognozu pacijenata sa primarnim ili sekundarnim glioblastomima.

**KLJUČNE REČI:** kancer, gliomi, anaplastični astrocitomi, glioblastomi, genomska nestabilnost, *p53*, *PTEN*, *p16*, *EGFR*, biomarkeri

**NAUČNA OBLAST:** Biologija

**UŽA NAUČNA OBLAST:** Kancer

**UDK BROJ:** [616-006.48:612.82]:[575.224.2::575.113]

## RESUME

### Detection and characterization of genomic instability in patients with malignant glioma

Glioblastoma is the most frequent and the most malignant human brain tumor. Despite a similar histological appearance, primary and secondary glioblastomas are distinct tumor entities with different genetic alterations but none being specific enough to distinguish them. Despite better insight in its complex genetic nature, glioblastoma is still incurable disease, with extremely short median survival. The purpose of this study was to detect specific genetic changes, as well as to quantify overall level of genomic instability in samples of malignant glioma patients. Besides, we analyzed genetic alterations of key tumor suppressors (*p53*, *PTEN* and *p16*) and *EGFR* oncogene, commonly aberrant in glioma samples. Alterations of two or more genes were present in majority of analyzed samples indicating importance of multiple changes for gliomagenesis.

AP-PCR DNA profiling revealed two types of genetic differences between tumor and normal tissue: qualitative changes which represent accumulation of changes in DNA sequence and are the manifestation of microsatellite and point mutation instability (MIN-PIN) and quantitative changes which represent amplifications or deletions of existing chromosomal material and are the manifestation of chromosomal instability (CIN). Both types of alterations were present in all analyzed samples contributing almost equally to the total level of genomic instability, and showing no differences between histological subtypes. Further investigation of alterations in DNA profiles revealed specific changes in the following 11 genes that were not previously associated with glioma pathogenesis: *LHFPL3*, *SGCG*, *HTR4*, *ITGB1*, *CPS1*, *PROS1*, *GP2*, *KCNG2*, *PDE4D*, *KIR3DL3*, and *INPP5A*. Most of identified genes have significant role in signal transduction or cell adhesion, which are important processes for cancer development and progression.

The frequencies of observed alterations were correlated with clinicopathologic parameters, the level of genomic instability and patient survival, as well as with presence of alterations in *p53*, *PTEN*, *p16* and *EGFR* genes. Some of the identified genes showed significant association with *p53* and *p16* tumor suppressors, as well as with *EGFR*, but there was no significant correlation between loss of *PTEN* and any of identified genes.

In conclusion, our results confirmed complexity of glioma genetic nature, emphasizing high level of genomic instability as hallmark of this tumor type. Identified novel genes could be used

as potential biomarkers for diagnosis of primary and secondary glioblastoma, as well as predictors of patients' outcome.

**KEY WORDS:** cancer, glioma, anaplastic astrocytoma, glioblastoma, genomic instability, *p53*, *PTEN*, *p16*, *EGFR*, biomarkers

**RESEARCH AREA:** Biology

**RESEARCH FIELD:** Cancer

**UDC NUMBER:** [616-006.48:612.82]:[575.224.2::575.113]



## SKRAĆENICE

5-HT	serotonin, 5-hidroksitriptamin
AA	engl. Anaplastic astrocytoma, prev. anaplastični astroцитomi
AIP1	engl. Actin-interacting protein 1
AMPK	engl. AMP-activated Protein Kinases
APAF1	engl. Apoptotic Peptidase Activating Factor 1
APRT	engl. Adenine phosphoribosyltransferase
AP-PCR	engl. Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction
AR	Amfiregulin
ATM	engl. Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	engl. Ataxia Telangiectasia and Rad3-related
Bad	engl. Bcl-2-associated death promoter
BAF	engl. Bulky-adduct forming
BAX	engl. BCL2-associated X protein
BCPC	engl. Brain cancer propagating cells
Bim	engl. Bcl-2-interacting mediator of cell death
BSA	engl. Bovine serum albumine, prev. albumin govedeg seruma
BTC	Betacelulin
CaMK	Ca <sup>2+</sup> -kalmmodulin-zavisna protein kinaza
cAMP	3'-5'-ciklični adenozinmonofosfat
CCND1	Ciklin D1
CDK	Ciklin zavisna kinaza
CDKN2A	engl. Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CENP-C	engl. Centromere-specific binding protein C
CHIP	engl. Chaperone-dependent E3 ligase
Chk1	engl. Checkpoint kinase 1
Chk2	engl. Checkpoint kinase 2
CIN	engl. Chromosomal instability, prev. hromozomska nestabilnost
CKI	Cdk inhibitor
CNS	Centralni nervni sistem
COP-1	engl. Constitutive Photomorphogenic 1
CPS1	engl. Mitochondrial carbamoyl-phosphate synthetase 1
CREB	engl. Cyclic AMP-response element-binding protein
ddATP	Didezoksiadenozin-trifosfat
ddCTP	Didezoksicitidin-trifosfat
ddGTP	Didezoksiguanozin-trifosfat
ddNTP	Didezoksiribonukleotid-trifosfat
ddTTP	Didezoksitimidin-trifosfat
hDLG	engl. Disk large gene
DNA-PK	DNK zavisna protein kinaza
DNMT	5-citozin DNK metiltransferaza
dNTP	Dezoksiribonukleotid-trifosfat
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
DSB	engl. Double-stranded break, prev. dvolančani prekid
EBV	Epstein-Barr virus
EGF	engl. Epidermal growth factor, prev. epidermalni faktor rasta

EGFR	engl. Epidermal growth factor receptor, prev. receptor EGF-a
EGR1	engl. Early growth regulated transcription factor-1
EMT	Epitelijsko-mezenhimalna tranzicija
EPR	Epiregulin
ERK	engl. Extracellular signal-regulated protein kinases
FAK	Fokalna adhezijska kinaza
FasL	Fas ligand
FOXO	engl. Forkhead box transcription factors
gadd45	engl. Growth arrest and DNA-damage inducible
GBM	Glioblastoma multiforme
GP2	glikoprotein 2
GSK3	engl. Glycogen synthase kinase 3
HB-EGF	Heparin-vezujući EGF
HMEC	engl. Human mammary epithelial cells
HRG	Heregulin
HRR	engl. Homologous recombination DNA repair
hTERT	engl. Human telomerase reverse transcriptase
HTR4	5-hidroksitriptamin (serotonin) receptor 4
ICD-O	engl. International Classification of Diseases for Oncology
IDH1	Izocitrat dehidrogenaza 1
ITGB1	Integrin beta 1
IKK	I $\kappa$ B kinaza
INPP5A	Inozitol polifosfat-5-fosfataza
IRS	engl. Insulin receptor substrate
KCNG2	engl. Potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 2
KIR3DL3	engl. Killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 3
LHFPL3	engl. Lipoma HMGIC fusion partner-like 3
LOH	engl. Loss of heterozigosity, prev. gubitak heterozigotnosti
MAGI	engl. Membrane-associated guanylate kinase
MAPK	engl. Mitogen-activated protein kinase
MAST	engl. Microtubule-associated serine-threonine kinase
MDC1	engl. Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
MDM2	engl. Murine Double Minute 2
MDR	engl. Multidrug resistance
MEK	engl. Mitogen activated kinase-kinases
MGMT	engl. O <sup>6</sup> -methylguanine-DNA methyltransferase
MIN	engl. Microsatellite instability, prev. mikrosatelitska nestabilnost
MMP	matriksna metaloproteinaza
MMR	engl. Mismatch repair
MNNG	engl. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanine
MNU	engl. N-methyl-N-nitrosourea
MSI	engl. Microsatellite instability, prev. mikrosatelitska nestabilnost
MSS	Mikrosatelitski stabilni tumori
mTOR	engl. Mammalian target of rapamycin
MTS1	engl. Multiple tumor suppressor 1
MVP	engl. Major vault protein
NER	engl. Nucleotide excision repair
NES	engl. Nuclear export signal

NF-kB	engl. Nuclear factor-kappaB
NLS	engl. Nuclear localization signal
NOXA	engl. NADH oxidase
NRG	Neuregulin
p53r2	engl. p53 Inducible Ribonucleotide Reductase Gene
PAA	Poliakrilamid
PCNA	engl. Proliferating cell nuclear antigen
PCR	engl. Polymerase chain reaction, prev. lančana reakcija polimeraze
PDE4D	engl. cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D
PDGFR	engl. Platelet-derived growth factor receptor
PDK1	engl. Phosphoinositide dependent kinase-1
PIDD	engl. p53-induced death domain protein
PI(3,4)P2	Fosfatidilinozitol 3,4-bifosfat
PI3K	Fosfatidilinozitol 3-kinaza
PIN	engl. Point mutation instability, prev. nestabilnost pojedinačnih nukleotida
PIP2	Fosfatidilinozitol 4,5 bisfosfat
PIP3	Fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat
PIRH-2	engl. p53-induced ubiquitin-protein ligase
PKC	Protein kinaza C
PLC $\gamma$	Fosfolipaza C gama
PROS1	Protein S
PTB	engl. Phosphotyrosine binding
PTEN	engl. Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
PUMA	engl. p53 upregulated modulator of apoptosis
Raf	engl. Rapidly accelerated fibrosarcoma
Rb	engl. Retinoblastoma
RNK	Ribonukleinska kiselina
RTK	Receptor tirozin kinaza
SGCG	Sarkoglikan, gama
SH2	engl. Src homology 2
SNI	engl. Single nucleotide instability, prev. nestabilnost pojedinačnih nukleotida
SSCP	engl. Single strand conformation polymorfism
STAT	engl. Signal Transducer and Activator of Transcription,
TCGA	engl. The Cancer Genome Atlas
TGF $\alpha$	Transformišući faktor rasta $\alpha$
TGF $\beta$	engl. Transforming growth factor beta
TIC	engl. Tumor-initiating cells
TKI	Tirozin kinazni inhibitor
TSC1	engl. Tuberous sclerosis complex 1
UV	Ultravioletno zračenje
VEGF	engl. Vascular endothelial growth factor
WHO	engl. World Health Organization, prevod. Svetska zdravstvena organizacija

## SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>Uvod .....</b>	<b>1</b>
1.1	Kancer – nastanak i osnovne odlike .....	1
1.2	Kancer – podela .....	6
1.3	Mehanizam kancerogeneze.....	7
1.3.1	“Mutator” fenotip .....	7
1.3.2	Genomska nestabilnost .....	8
1.3.3	“Kancer” geni .....	12
1.3.4	Onkogeni i tumor-supresor geni .....	13
1.3.4.1	p53 tumor supresor .....	15
1.3.4.2	PTEN tumor supresor .....	19
1.3.4.3	p16 tumor supresor .....	23
1.3.4.4	EGFR .....	26
1.4	Tumori centralnog nervnog sistema .....	30
1.4.1	Gliomi – karakteristike i podela .....	33
1.4.2	Gliomi – molekularni mehanizmi nastanka.....	37
1.4.2.1	EGFR/PTEN/Akt/mTOR signalni put.....	39
1.4.2.2	p53/MDM2/p14 <sup>ARF</sup> signalni put .....	40
1.4.2.3	p16 <sup>INK4a</sup> /RB1 signalni put.....	41
<b>2</b>	<b>Ciljevi .....</b>	<b>44</b>
<b>3</b>	<b>Materijal i metode.....</b>	<b>45</b>
3.1	Uzorci tkiva .....	45
3.2	Izolacija nukleinskih kiselina .....	46
3.2.1	Izolacija genomske DNK iz tumorskog tkiva.....	46
3.2.2	Izolacija genomske DNK iz krvi .....	48
3.2.3	Provera kvaliteta izolovane DNK.....	49
3.3	DNK profilisanje metodom AP-PCR-a .....	50
3.3.1	Kvantifikacija genomske nestabilnosti.....	50
3.4	Identifikacija izmenjenih traka iz AP-PCR DNK profila .....	52
3.4.1	Kloniranje .....	52
3.4.2	Transformacija bakterija.....	54
3.4.3	Izolacija plazmida.....	55
3.4.4	Sekvenciranje kloniranih inserta .....	56
3.5	Analiza mutacionog statusa p53 gena .....	57
3.5.1	PCR SSCP metoda .....	57
3.5.2	DNK sekvenciranje.....	58
3.6	Analiza gubitka heterozigotnosti (LOH) p53, PTEN i p16 gena .....	59
3.7	Detekcija homozigotnih delecija INK4a/ARF LOKUSA .....	63
3.8	Analiza amplifikacionog statusa EGFR gena diferencijalnim PCR-om .....	64
3.9	Statistička obrada rezultata.....	66

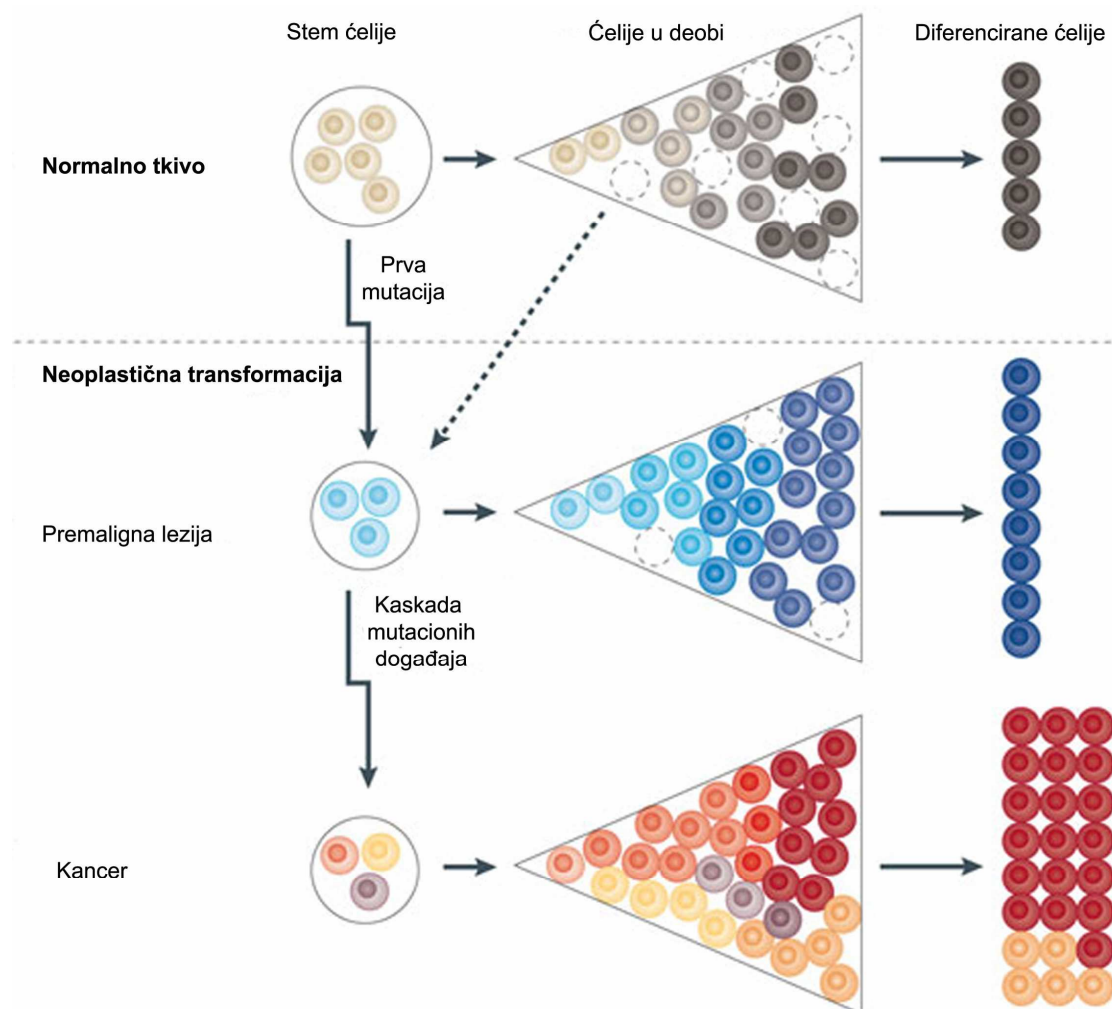
4	Rezultati .....	67
4.1	Analiza genomske nestabilnosti AP-PCR-om .....	67
4.1.1	Optimizacija AP-PCR-a .....	67
4.1.2	Podela uzoraka prema stepenu genomske nestabilnosti .....	68
4.1.3	Povezanost stepena genomske nestabilnosti sa histopatološkim i demografskim podacima.....	72
4.2	Identifikacija izmenjenih traka iz AP-PCR DNK profila .....	73
4.2.1	Povezanost identifikovanih gena sa genomskom nestabilnošću i kliničkopatološkim parametrima .....	80
4.3	Analiza promena u <i>p53</i> , <i>PTEN</i> , <i>p16</i> i <i>EGFR</i> genima.....	82
4.3.1	Mutacioni status <i>p53</i> tumor supresor gena .....	84
4.3.2	Analiza gubitka heterozigotnosti <i>p53</i> tumor supresora .....	86
4.3.3	Analiza gubitka heterozigotnosti <i>PTEN</i> tumor supresora .....	88
4.3.4	Analiza gubitka heterozigotnosti i homozigotnih delecija <i>p16</i> tumor supresora .....	89
4.3.5	Amplifikacioni status <i>EGFR</i> onkogen.....	91
4.3.6	Povezanost genskih promena sa histopatološkim i demografskim parametrima i genomskom nestabilnošću.....	92
4.4	Međuzavisnost promena u analiziranim genima .....	93
4.4.1	Međuzavisnost promena u <i>p53</i> , <i>PTEN</i> , <i>p16</i> i <i>EGFR</i> genima .....	93
4.4.2	Međuzavisnost promena u <i>p53</i> , <i>PTEN</i> i <i>p16</i> tumor supresorima .....	98
4.4.3	Veza identifikovanih gena iz AP-PCR DNK profila sa <i>p53</i> , <i>PTEN</i> , <i>p16</i> i <i>EGFR</i> genima .....	99
4.5	Uticaj analiziranih genskih promena na preživljavanje pacijenata .....	100
4.5.1	Uticaj histološkog podtipa i genomske nestabilnosti na stopu preživljavanja pacijenata .....	100
4.5.2	Promene u <i>p53</i> , <i>PTEN</i> , <i>p16</i> i <i>EGFR</i> genima i stope preživljavanja pacijenata .....	101
4.5.3	Uticaj promena u identifikovanim genima iz AP-PCR DNK profila pacijenata na preživljavanje pacijenata .....	102
5	Diskusija.....	103
6	Zaključci.....	121
7	Literatura .....	124

## 1 Uvod

### 1.1 Kancer – nastanak i osnovne odlike

Kancer predstavlja jedan od vodećih uzroka smrti, naročito u razvijenim delovima sveta. Za razliku od većine bolesti za koje je karakteristična jedinstvena klinička slika kod svih obolelih, kancer predstavlja heterogenu grupu oboljenja koja nastaju usled poremećaja u osnovnim ćelijskim procesima i dovode do promena u međućelijskim interakcijama. U normalnim okolnostima, ćelijski ciklus svih ćelija višćelijskog organizma je pod strogom kontrolom kojom se obezbeđuje pravilna organizacija i funkcionisanje celog sistema. Bilo koja promena koja dovodi do ispoljavanja sebičnog ponašanja pojedinačnih ćelija predstavlja ozbiljnu pretnju za opstanak organizma, te su razvijeni brojni mehanizmi eliminacije “problematičnih” ćelija. I pored toga, progenitorske ćelije kancera uspevaju da prevaziđu ove mehanizme zahvaljujući genetičkim promenama kojima se obezbeđuje sticanje novih svojstava: nekontrolisanog rasta i proliferacije. Na osnovu rezultata dugogodišnjih istraživanja, danas je prihvaćeno da je kancer genetičko oboljenje izazvano akumulacijom dinamičkih promena (mutacija) u genomima zdravih ćelija (Hanahan i Weinberg, 2000). Uzroci nastanka kancera su višestruki i pored genetičkih promena, uključuju i uticaj faktora životne sredine, kao i način života i kliničku istoriju. Zajedničkim dejstvom navedenih činilaca dolazi do progresije maligniteta, što predstavlja dugotrajni višefazni proces. Za razliku od cistične fibroze i mišićne distrofije, genetičkih oboljenja koja nastaju usled mutacija pojedinačnih gena, ne postoji jedinstven gen čije su promene dovoljne za nastanak i progresiju kancera. Naprotiv, mutacije nekoliko ključnih „kancer“ gena su neophodne za prevazilaženje složenih mehanizama odbrane koji štite zdrave ćelije i ceo organizam od potencijalno letalnog efekta kancera. Tri osnovne grupe gena su odgovorne za proces kancerogeneze: onkogeni, tumor supresori i geni koji održavaju stabilnost genoma. Promene onkogeni i tumor supresora na fiziološkom nivou istovremeno dovode do povećanja stope proliferacije i inhibicije ćelijske smrti. Sa druge strane, inaktivacija gena odgovornih za održavanje stabilnosti genoma utiče na povećanje stope mutacija, tj. ukupnog stepena genomske nestabilnosti (Vogelstein i Kinzler, 2004). Akumulacija mutacija u ćelijama dalje utiče na promenu u regulaciji ključnih ćelijskih procesa, dodatno favorizujući proces maligne transformacije. Postoje brojni pokazatelji da

je kancerogeneza višestepeni proces tokom kojeg dolazi do akumulacije genskih promena i progresivne transformacije normalnih ćelija u maligne (slika 1).



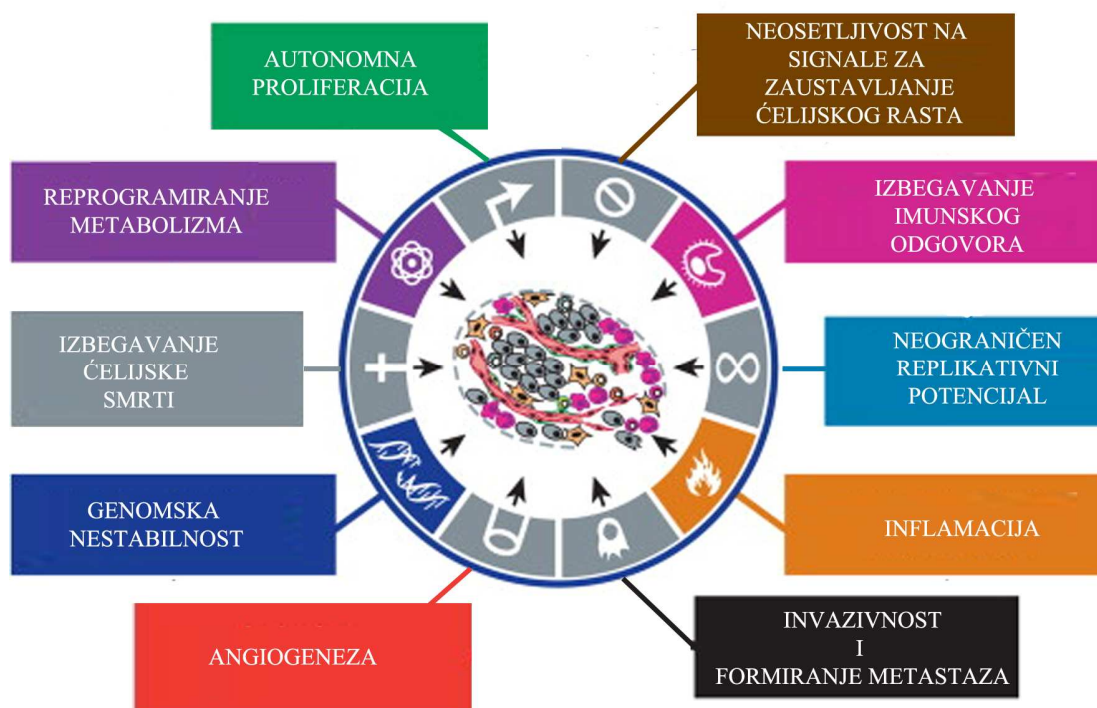
**Slika 1.** Šematski prikaz procesa tokom normalne diferencijacije ćelija i kancerogeneze. U normalnom tkivu regulisani procesi diferencijacije dovode do nastanka zrelih ćelija koje su izgubile replikativni potencijal. Akumulacija genetičkih i epigenetičkih promena u ćelijama (označene plavom i crvenom bojom) prvo dovodi do poremećaja u ćelijskim procesima, a zatim do klonalne ekspanzije. Finalno nastaje heterogena tumorska masa sastavljena od ćelija koje se drastično razlikuju od prekursorskih ćelija (poslednja slika). (Preuzeto i modifikovano od Valenta i saradnika, 2012)

Tokom maligne transformacije ćelije tumora stiču određene karakteristike koje im omogućavaju neometan rast, proliferaciju i invazivnost (Hanahan i Weinberg, 2011):

- 1) **Autonomna proliferacija nezavisna od spoljašnjih faktora rasta** – za razliku od normalnih ćelija koje zahtevaju mitogene signale za prelazak u stanje proliferacije, tumorske ćelije razvijaju sopstvene mehanizme koji omogućavaju kontinuiranu proliferaciju. To se obezbeđuje autokrinom produkcijom faktora rasta, povećavanjem broja ili strukturnim promenama njihovih membranskih receptora, kao i konstitutivnom aktivacijom nishodnih signalnih puteva povezanih sa ovim receptorima.
- 2) **Neosetljivost na signale za zaustavljanje ćelijskog rasta** – inaktivacijom negativnih povratnih sprega kojima se održava signalna homeostaza, maligne ćelije stiču sposobnost izbegavanja supresije rasta.
- 3) **Izbegavanje ćelijske smrti** – programirana ćelijska smrt, apoptoza, predstavlja prirodni mehanizam odbrane koji se aktivira kao odgovor na brojne fiziološke stresore od kojih su mnogi povezani sa malignom transformacijom. Izbegavanje apoptoze predstavlja karakteristiku skoro svih tipova kancera.
- 4) **Neograničeni replikativni potencijal** – za razliku od normalnih ćelija koje prolaze kroz ograničen broj replikativnih ciklusa nakon kojih ulaze u fazu mirovanja (engl. senescence) ili programiranu ćelijsku smrt, što je regulisano skraćivanjem telomera tokom svake deobe, tumorske ćelije stiču sposobnost neograničene replikacije.
- 5) **Angiogeneza** – neovaskularizacija, tj. proces stvaranja novih krvnih sudova omogućava dotok nutritienta i kiseonika rastućoj masi tumorskih ćelija i predstavlja rani događaj u nastanku kancera.
- 6) **Invazivnost i formiranje metastaza** – ovi procesi, kao i formiranje primarne tumorske mase, zavise od sticanja prethodno navedenih obeležja, ali i od epitelijalno-mezenhimalne tranzicije (EMT, engl. epithelial-mesenchymal transition) i interakcija sa ekstraćelijskim matriksom, tj. stromom. Dok invazivnost podrazumeva sposobnost širenja tumora u okolna tkiva, formiranje metastaza ukazuje na formiranje udaljene sekundarne tumorske mase, poreklom od pokretnih ćelija primarnog tumora.
- 7) **Reprogramiranje metabolizma** – aerobna glikoliza predstavlja alternativni put metabolizma glukoze koji je izuzetno zastupljen u ćelijama kancera i povezan sa aktiviranim onkogenima.
- 8) **Izbegavanje imunskog odgovora** – iako bi imunski sistem trebalo da predstavlja barijeru za nastanak i progresiju tumora, maligne ćelije su razvile uspešne



mehanizme kojima se izbegava detekcija i uništenje od strane komponenti ovog sistema (slika 2).

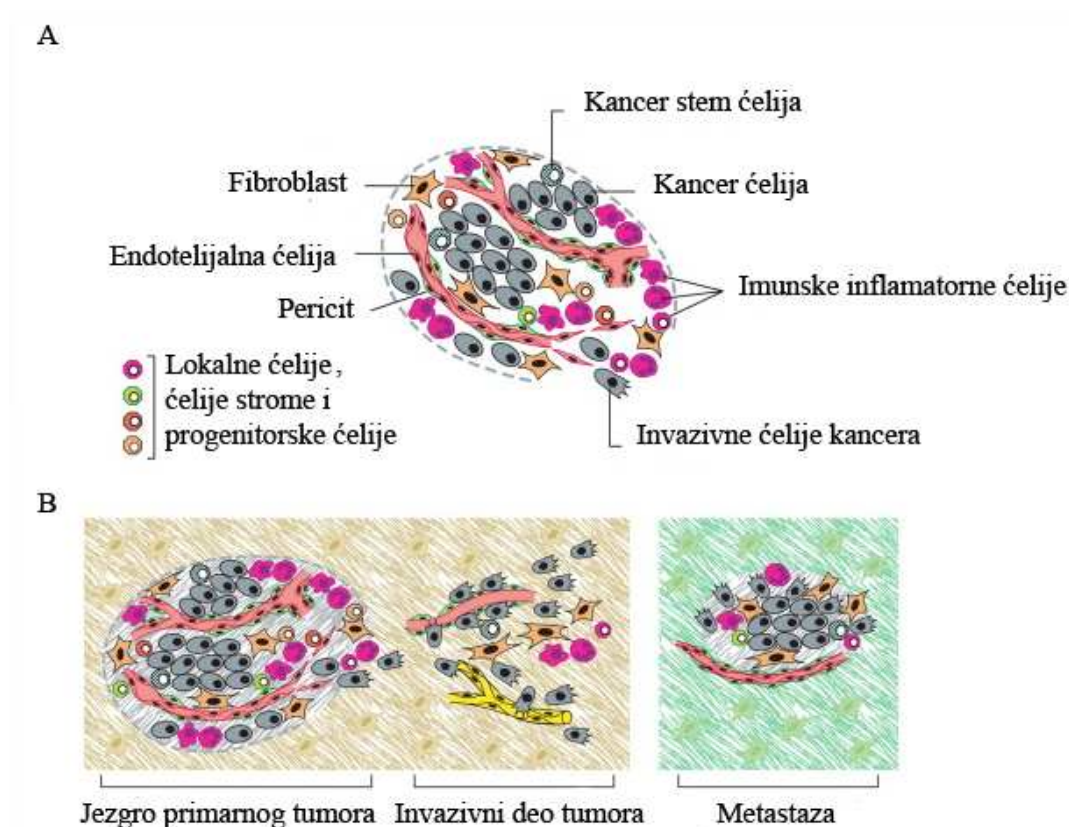


**Slika 2.** Šematski prikaz osnovnih karakteristika kancera. Pored 8 osnovnih karakteristika (1) autonomna proliferacija nezavisna od spoljašnjih faktora rasta, 2) neosetljivost na signale za zaustavljanje ćelijskog rasta, 3) izbegavanje ćelijske smrti, 4) neograničen replikativni potencijal, 5) angiogeneza, 6) invazivnost i formiranje metastaza, 7) reprogramiranje metabolizma, 8) izbegavanje imunskog odgovora) na šemi su predstavljene karakteristike koje leže u osnovi nastanka kancera: genomska nestabilnost i inflamacija (Preuzeto i modifikovano od Hanahan i Weinberg-a, 2011).

Kao što je prethodno navedeno, sticanje navedenih karakteristika zavisi prvenstveno od akumulacije mutacija u malignim ćelijama, tj. određeni mutirani genotipovi daju selektivnu prednost svojim nosiocima obezbeđujući im povećan rast i dominaciju u lokalnom okruženju. Genomska nestabilnost, stoga, leži u osnovi navedenih obeležja kancera. Osim nje, značajnu ulogu ima i proinflatorna mikrosredina koja pospešuje proces transformacije ćelija (Hanahan i Weinberg, 2011).

Iako većina tumora nastaje od jedne progenitorske ćelije koja je stekla sposobnost nekontrolisane, kontinuirane proliferacije (Gagos i Irminger-Finger, 2005, Nowell, 1976), tumorsku masu ipak ne treba posmatrati kao homogenu populaciju ćelija. Naprotiv, izražena heterogenost tumorske mase se ogleda kroz prisustvo velikog broja različitih subpopulacija ćelija, kao i regiona različitog stepena diferencijacije, proliferacije,

vaskularizacije, inflamacije i invazivnosti u okviru samog tumora (slika 3) (Hanahan i Weinberg, 2011).



**Slika 2.** Ćelije koje formiraju tumor. (A) Većina tumora se sastoji iz nekoliko različitih podtipova ćelija koje zajedno obezbeđuju progresiju i rast tumora. Prisutna su i oba tipa imunskih inflamatornih ćelija, tumor-promovišuće i ćelije ubice. (B) Tokom progresije tumora dolazi do promena tumorske mikrosredine formirane od ćelija strome, što omogućava invaziju u okolna tkiva i formiranje metastaza. (Preuzeto i modifikovano od Hanahan i Weinberg-a, 2011).

Proces geneze kancera (kancerogeneza) je složeni višestepeni proces u okviru kojeg razlikujemo tri faze - inicijaciju, promociju i progresiju (Pitot, 1993). Inicijacija je ireverzibilna faza tokom koje dolazi do akumulacije mutacija u lancima DNK. Najčešće se javljaju tranzicije, transverzije i manje delecije koje pogađaju neke od osnovnih kancer gena. U toku promocije ne dolazi do promena u strukturi DNK molekula, već se menja obrazac genske ekspresije. Tokom ove faze dolaze do izražaja procesi selektivne klonalne ekspanzije iniciranih ćelija, pri čemu nastaju preneoplastične lezije. Faza promocije traje duži vremenski period i u svojim početnim stadijumima može biti reverzibilna. Poslednja

faza kancerogeneze naziva se progresija. Osnovnu odliku ove faze predstavljaju strukturne promene u kariotipu ćelije, koje dovode do povećanog rasta i invazivnosti malignih ćelija, u isto vreme obezbeđujući neosetljivost na lekove i izbegavanje imunskog odgovora domaćina. Zbog promena u genomu malignih ćelija vrlo često dolazi do ekspresije gena koji su normalno eksprimirani samo u određenim fazama razvića, kao i do poremećaja u ekspresiji tkivno specifičnih gena. Ireverzibilne promene koje nastaju tokom progresije tumora omogućavaju invaziju u okolna tkiva i formiranje metastaza (Pitot, 1993).

## **1.2 Kancer – podela**

Postoji više od 100 različitih tipova tumora, a većina je dobila naziv prema organu ili tkivu iz kojeg se razvija. Jedna od osnovnih podela tumora je prema njihovom invazivnom potencijalu. Većina tumora ostaje lokalizovana na mestu nastanka, ne posedujući invazivna svojstva i sposobnost metastaziranja, pa se smatraju benignim tumorima. Ovi tumori se lakše odstranjuju jer formiraju kompaktnu masu, a posle otklanjanja najčešće ne recidiviraju. Ukoliko ćelije tumora imaju sposobnost invazije tj. prodiranja u okolna tkiva i sposobnost metastaziranja, onda je reč o malignom tumoru, tj. kanceru.

Tumori se mogu klasifikovati i prema tipu ćelija iz kojih se razvijaju i prema ovoj podeli razlikujemo sledeće kategorije:

- **Karcinomi** – kanceri poreklom od epitelnih ćelija. Karcinomi se pak mogu svrstati u dve glavne kategorije: karcinome skvamoznih ćelija, koji nastaju od protektivnih epitelijalnih ćelija i adenokarcinome, koji se formiraju od sekretornih ćelija epitela.
- **Sarkomi** – maligni tumori mezenhimalnih ćelija vezivnih tkiva. U zavisnosti od tipa ćelija od kojih nastaju, među sarkomima razlikujemo fibrosarkome (poreklom od fibroblasta), osteosarkome (poreklom od osteoblasta), liposarkome (poreklom od adipocita), leiomiosarkome i rabdomiosarkome (poreklom od miocita koji formiraju glatku odnosno skeletnu muskulaturu), kao i retko zastupljene sarkome: hondrosarkom (poreklom od hondrocita), angiosarkom (poreklom od endotela krvnih sudova), sinovijalni sarkom (porekom od ćelija sinovijalne opne) i maligni fibrozni histiocitom (poreklom od fibroznog tkiva) .
- **Leukemije, limfomi i mijelomi** – kanceri koji nastaju od ćelija hematopoetskih tkiva i dovode do pojave različitih abnormalnih krvnih ćelija u cirkulaciji. Brojne su vrste hematopoetskih maligniteta, među kojima su: akutne i hronične limfocitne

leukemije, akutne i hronične mijeloidne leukemije, eritroleukemija, multipni mijelomi, ne-Hodžkinov limfom i Hodžkinova bolest.

- **Tumori centralnog nervnog sistema** – nastaju u mozgu i kičmenoj moždini, a vode poreklo od ćelija embrionalnog neuroektoderma. U ovu kategoriju spadaju retinoblastomi, neuroblastomi, astrocitomi, meningiomi, glioblastomi i drugi.

Melanomi, koji nastaju od melanocita, pigmentisanih ćelija kože i retine, a vode poreklo od nervne kreste ne spadaju ni u jednu od navedenih kategorija (Weinberg, 2007). Tumori se još mogu podeliti i na solidne tumore, koji nastaju od imobilisanih ćelija, i leukemije i limfome čije su prekursorske neoplastične ćelije pokretne (Vogelstein i Kinzler, 2004). Takođe, pored daleko brojnijih sporadičnih kancera, koji nastaju transformacijom somatskih ćelija, razlikujemo i nasledne forme kancera tj. familijarne sindrome izazvane genskim promenama u germinativnim ćelijama. Kod familijarnih sindroma se javljaju brojni tumori u različitim organima i to u mnogo mlađem životnom dobu (Vogelstein i Kinzler, 2002).

### **1.3 Mehanizam kancerogeneze**

Kancerogeneza je složen višestepeni proces tokom kojeg dolazi do formiranja tumorske mase poreklom od jedne, diploidne progenitorske ćelije uzastopnim deobama i klonalnom selekcijom (Venkatesan i saradnici, 2006). Transformacija normalne ćelije u prekanceroznu može započeti spontano ili pod kancerogenim uticajem spoljašnje sredine. Od nastanka prekancerozne ćelije pa do formiranja tumora može proći i više od 20 godina, tokom kojih se odvijaju procesi klonalne evolucije, tj. ciklusi klonalne ekspanzije i selekcije ćelija odgovarajućeg fenotipa.

#### **1.3.1 “Mutator” fenotip**

Rezultati proučavanja pojave kancera kod ljudi u zavisnosti od starosti i različiti laboratorijski modeli su pokazali da je za nastanak kancera, u proseku, potrebno četiri do sedam mutacija u ključnim genima (Armitage i Doll, 1954, Peto i saradnici, 1975). Međutim, genomi ćelija kancera sadrže više od hiljadu promena, od kojih samo pojedine pogađaju specifične gene. Loeb i saradnici (2001) su pretpostavili da prekancerozne ćelije ispoljavaju tzv. “mutator fenotip”, kojim se obezbeđuje selekcija najprilagođenijih klonova i evolucija tumora (Loeb, 2001). Prema hipotezi “mutator fenotipa” nasumične mutacije u genima koji održavaju stabilnost genoma dovode do stanja povećane mutageneze, tj.

povećavaju frekvenciju nastanka novih mutacija koje obezbeđuju pozitivnu selekciju svojim nosiocima (Loeb i saradnici, 2003). Iako je moguće da oštećenja usled nagomilanih mutacija budu tolika da dovedu do apoptoze i samim tim negativne klonalne selekcije, održavanje “mutator fenotipa” tokom kancerogeneze predstavlja verovatniji događaj. Postoji nekoliko argumenata protiv ove hipoteze u kojima se navodi da stanje tzv. hipermutabilnosti nije neophodno za nastanak kancera (Tomlinson i saradnici, 2002), kao i da se promene u genima odgovornim za održavanje integriteta sekvenci DNK javljaju sa izuzetno niskom frekvencijom (Futreal i saradnici, 2004). Kao što je već rečeno, tumori predstavljaju heterogenu populaciju ćelija, koje se, iako vode poreklo od jedne prekursorske ćelije, međusobno razlikuju po stepenu i vrsti promena u genomu što predstavlja otežavajuću okolnost prilikom njihovog proučavanja. Značajnu ulogu u klonalnoj ekspanziji tumora imaju i mutacije u nekodirajućim sekvencama genoma. Ove promene mogu pogadati regulatorne elemente gena utičući direktno na njihovu ekspresiju, menjati mesta iskranja egzona te dovesti do nastanka aberantnih proteina ili uticati na stabilnost RNK molekula (Venkatesan i saradnici, 2006). Pretpostavlja se da do uspostavljanja “mutator fenotipa” dolazi tokom početnih faza nastanka kancera, kao i da ne postoji tačan redosled mutacija odgovornih za njegovu pojavu, već on predstavlja posledicu nasumičnih promena u genomu (Loeb, 2001). Prisustvo “mutator fenotip”-a dovodi do povećanja stope tačkastih mutacija, promena u kratkim ponavljajućim sekvencama DNK (mikrosatelitske sekvence), kao i do kariotipskih promena, velikih hromozomskih rearanžmana i gubitka heterozigotnosti brojnih gena (LOH) (Loeb i Loeb, 2003). Sve navedene promene predstavljaju manifestaciju genomske nestabilnosti, jedne od osnovnih karakteristika tumorskih ćelija i glavnog mehanizma povećanja heterogenosti unutar tumorske mase, čime se stvaraju uslovi za selektivnu klonalnu ekspanziju u zavisnosti od uticaja spoljašnje sredine (Cahill i saradnici, 1999).

### **1.3.2 Genomska nestabilnost**

Tokom kancerogeneze dolazi do akumulacije različitih genetičkih promena u genomima malignih ćelija (Brenner i Duggan, 2004):

- Homozigotne delecije – delecije u rasponu od 1bp do nekoliko megabaza
- Tačkaste mutacije – nukleodidne zamene i pojedinačne delecije i insercije
- Hromozomske aberacije (delecije, translokacije, inverzije) – promene većih segmenata DNK koje se uočavaju na hromozomima

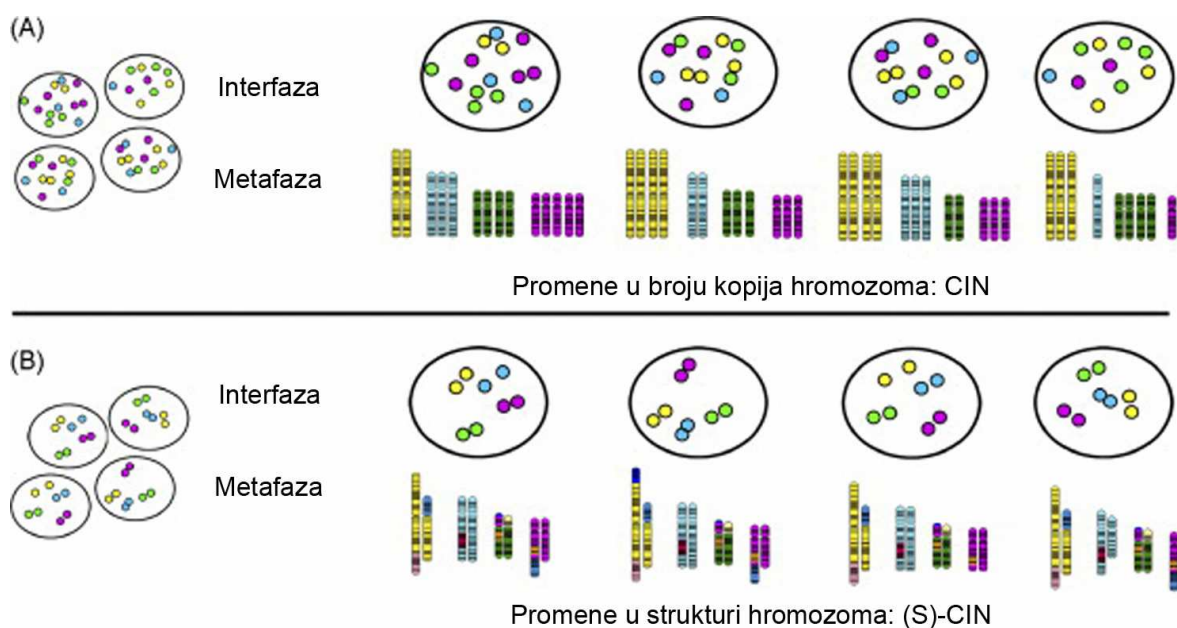
- Amplifikacije – povećanje broja kopija DNK
- Smanjenje broja kopija gena – gubitak heterozigotnosti
- Promene metilacionog statusa – hipometilacija i hipermetilacija CpG dinukleotida.

U eukariotskim ćelijama postoje brojni biološki i biohemijski mehanizmi koji održavaju strukturni integritet i nisku frekvenciju spontanijh mutacija, ispravljajući navedena oštećenja. Iako su ćelije stalno izložene štetnim uticajima egzogenih i endogenih činilaca, enzimi uključeni u popravku DNK oštećenja (engl. DNA repair) kao i sposobnost DNK polimeraze da ispravlja greške nastale tokom replikacije sprečavaju akumulaciju oštećenja DNK molekula. Apoptoza, programirana ćelijska smrt, predstavlja dodatni mehanizam zaštite, jer se aktivira u sličaju kada stepen oštećenja DNK prevazilazi mogućnost popravke. Povećana ukupna frekvencija mutacija, kao i mutaciona inaktivacija "repair" gena zaduženih za ispravljanje oštećenja DNK molekula, uzrokuju genomsku nestabilnost u ćelijama kancera. Genomska nestabilnost dovodi do destabilizacije genoma i povećanja stope mutacija (Bayani i saradnici, 2007). Iako je, prema Loeb-ovom modelu (Loeb, 2001), pojava mutator fenotipa i genomske nestabilnosti uzrok nastanka kancera, postoje mišljenja da je genomska nestabilnost posledica kancerogeneze (Hernando i saradnici, 2004). Pretpostavlja se da oprečna tumačenja nastaju zbog različitih mehanizama inicijacije kancera, heterogenosti analiziranih uzoraka, kao i vremena koje je proteklo od začetka tumora (Bayani i Selvarajah, 2007). Razlikuju se tri tipa genomske nestabilnosti. Hromozomska nestabilnost (CIN) se karakteriše promenama u broju i strukturi hromozoma, i definiše kao povećana stopa hromozomskih promena koja dovodi do kontinuiranog rasta ćelija (Rajagopalan i saradnici, 2004). Još krajem 19. veka uočeno je da je kariotip nekih ćelija kancera promenjen usled hromozomskih rearanžmana ili aneuploidije (Gagos i Irminger-Finger, 2005). Promene u broju hromozoma predstavljaju najčešće genetičke promene u ćelijama kancera koje dovode do formiranja subpopulacija ćelija i direktno utiču na klonalnu ekspanziju (Nowell, 1976). Izražena hromozomska nestabilnost, prisutna u brojnim ćelijskim linijama kancera (Lengauer i saradnici, 1997), predstavlja adaptivni odgovor na pritiske sredine (Jallepalli i Lengauer, 2001). Različiti mehanizmi dovode do poremećaja u kariotipu ćelija kancera:

- Multipolarna mitoza usled aberantnog broja centriola
- Gubitak hromozoma u anafazi zbog defekta u organizaciji kinetohora
- Nepravilno razdvajanje hromatida u anafazi deobe

- Inhibicija mitoze ili citokineze pri čemu nastaju tetraploidne ćelije (Fenech, 2002).

S obzirom na značaj pravilnog odvijanja mitoze i organizacije deobnog vretena, smatra se da je za indukciju hromozomske nestabilnosti, najčešće, dovoljna samo jedna dominantna mutacija u genima koji kontrolišu ove procese (Cahill i saradnici, 1998). U skladu sa tim, identifikovane su brojne mutacije u genima koji kontrolišu razdvajanje hromozoma tokom mitoze i indukuju različite tipove kancera (Draviam i saradnici, 2004).



**Slika 4.** Numerička i strukturna hromozomska nestabilnost. (A) Promene u broju hromozoma se uočavaju i u interfazi, kao i u metafazi i predstavljaju odliku numeričkog CIN-a. (B) Citogenetičkom analizom interfaznih nukleusa se ne uočavaju strukturne hromozomske aberacije. Analiza kariotipa ukazuje na prisustvo velikih hromozomskih rearanžmana – (S)-CIN. (Preuzeto i modifikovano od Bayani i saradnika, 2007)

Na osnovu vrste hromozomskih promena moguće je razlikovati strukturnu ((S)-CIN) i numeričku hromozomsku nestabilnost (slika 4), koje nastaju kao posledica različitih genetičkih mehanizama (Bayani i Selvarajah, 2007).

Osim hromozomske nestabilnosti, koja se najčešće sreće, razlikujemo još dva tipa genomske nestabilnosti: mikrosatelitsku nestabilnost (MIN, MSI) i nestabilnost pojedinačnih nukleotida (SNI, PIN).

Mikrosatelitska nestabilnost se karakteriše promenom broja oligonukleotidnih ponovaka u mikrosatelitima (Fishel i saradnici, 1993, Leach i saradnici, 1993). Nastanak MIN-a se, uglavnom, povezuje sa gubitkom funkcije sistema za popravku pogrešno sparenih baza (engl. mismatch repair, MMR), usled mutacija u genima ovog sistema, gubitka

heterozigotnosti ili hipermetilacije njihovih promotora (Diaz, 2005). MMR je odgovoran za prepoznavanje i hidrolizu pogrešno sparenih baza, kao i insercija/delecija koje nastaju tokom replikacije monotonih repetitivnih sekvenci. Prema međunarodnim standardima (Bethesda Guidelines) za testiranje mikrosatelitske nestabilnosti koristi se najmanje 5 mikrosatelitskih lokusa. Na osnovu stepena detektovanih promena u tumorskom tkivu u odnosu na normalno, može se izvršiti klasifikacija na mikrosatelitski stabilne tumore (MSS), tumore sa niskim stepenom mikrosatelitske nestabilnosti (MSI-L) kod kojih je promenjeno <30% analiziranih lokusa, i tumore sa visokim stepenom mikrosatelitske nestabilnosti (MSI-H), gde je promenjeno dva ili više mikrosatelitskih lokusa ( $\geq 30\%$ ) (Umar i saradnici, 2004). Iako se smatra da se CIN i MIN međusobno isključuju, postoje dokazi da je moguće detektovati oba tipa genomske nestabilnosti u istom tumorskom uzorku (Milinkovic i saradnici, 2012).

Dugo se smatralo da je mikrosatelitska nestabilost jedini tip genomske nestabilnosti koji nastaje usled akumulacije tačkastih mutacija. Međutim, pokazano je da je stopa nasumičnih tačkastih mutacija u genomu malignih ćelija povećana 200 puta u odnosu na normalne ćelije, što ukazuje na postojanje još jednog tipa genomske nestabilnosti – nestabilnosti pojedinačnih nukleotida (Bielas i Loeb, 2005, Watanabe i saradnici, 2001). Ovaj tip genomske nestabilnosti se javlja uporedo sa ostala dva tipa genomske nestabilnosti (CIN i MIN), utičući na njihovo povećanje (Bielas i saradnici, 2006).

Breivik i Gaudernack (1999) su prvi ukazali na povezanost epigenetičkih i genetičkih promena u ćelijama kancera, predstavljajući model genomske nestabilnosti koji uključuje oba navedena tipa promena (Breivik i Gaudernack, 1999). Epigenetičke promene predstavljaju različite obrasce DNK metilacije usled akumulacija metil grupa na CpG ostrvcima u genomu. S-adenozilmetionin, supstrat 5-citozin DNK metiltransferaze (DNMT), je osnovni donor metil grupe u organizmu. Iako je teško odrediti referentnu „normalnu” ćeliju za poređenje stepena metilacije, za većinu tumora je karakteristična globalna hipometilacija, koja najčešće dovodi do povećane ekspresije poznatih onkogeno (Counts i Goodman, 1995). Sa druge strane, kod istih tumora je detektovana i regionalna hipermetilacija, koja se javlja u delovima promotora tumor supresor gena gde izaziva njihovu inaktivaciju (Zingg i Jones, 1997). Kao što se iz navedenog zaključuje, i hiper- i hipometilacija dovode do ekspresije malignog fenotipa, a razvnoteža između ova dva stanja predstavlja značajan mehanizam održanja homeostaze.



Zbog svog uticaja na povećanje genetičke varijabilnosti, genomska nestabilnost ubrzava procese somatske evolucije. Osim toga, pod uticajem različitih selekcionih pritisaka dolazi do favorizovanja MIN ili CIN fenotipa (Breivik i Gaudernack, 1999). Naime, pojedini metilirajući agensi (MNU, MNNG), kao i hipermetilacija DNK dovode do oštećenja DNK usled nekomplementarnog sparivanja baza, što predstavlja signal za aktivaciju MMR i zaustavljanje ćelijskog ciklusa do popravke oštećenja. Ovo predstavlja svojevrsni selekциони pritisak kojim se favorizuju ćelije sa defektnim MMR, što direktno utiče na povećanje stepena MIN-a u tumoru.

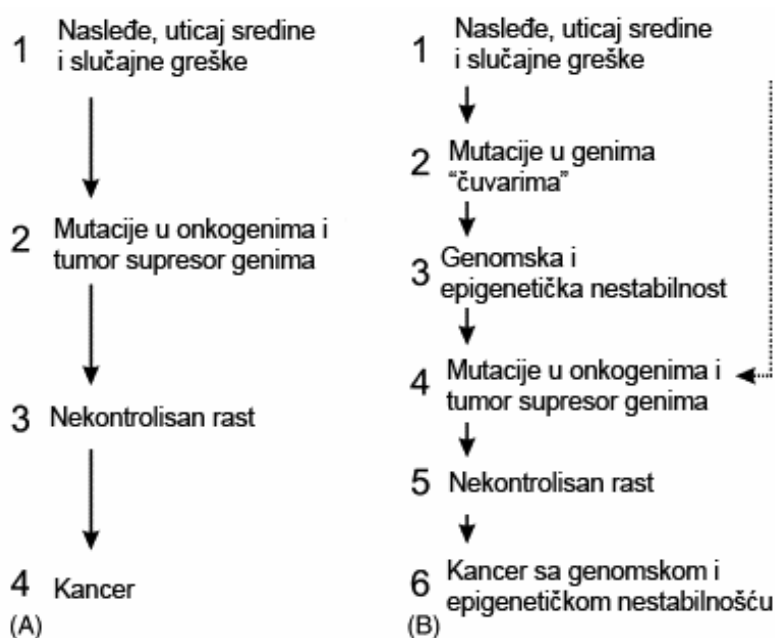
Sa druge strane, BAF (engl. bulky-adduct forming) kancerogeni, uključujući UV zračenje, slobodne radikale i različita hemijska jedinjenja, izazivaju velike trodimenzionalne promene u strukturi DNK, što predstavlja signal za aktivaciju NER-a (engl. nucleotide excision repair), alternativnog mehanizma za popravku DNK oštećenja zasnovanog na rekombinaciji hromozoma. Formiranje hromozomskih rearanžmana predstavlja signal za aktivaciju MCP (engl. mitotic checkpoint), što dalje vodi zaustavljanju ćelijskog ciklusa. Ovako se favorizuju ćelije sa inaktiviranim MCP-om i promoviše CIN fenotip. U oba slučaja, uspostavljanje MIN ili CIN fenotipa dovodi do daljeg povećanja genetičke varijabilnosti i progresije tumora.

### 1.3.3 “Kancer” geni

Analizirajući promene u genomima ćelija kancera, Loeb i saradnici (2001) su zaključili da njihova frekvencija prevazilazi uobičajenu stopu mutacija, te da postoje alternativni mehanizmi koji dovode do akumulacije ovih promena. Prema Vogelsteinovom modelu, povećana stopa mutacija u genomima kancer ćelija nastaje usled promena u genima “čuvarima” koji su odgovorni za održavanje stabilnosti genoma (engl. caretaker genes) ili mutacija u genima čiji proteinski produkti regulišu ćelijski ciklus i apoptozu (engl. gatekeeper genes) (Kinzler i Vogelstein, 1997). Proteinski produkti gena “čuvara” održavaju stabilnost genoma na nukleotidnom i hromozomskom nivou, vrše popravke oštećenja DNK molekula (“repair” geni) i regulišu stabilnost telomera. Druga kategorija gena (engl. gatekeeper genes) kodira proteine regulatore ćelijskog ciklusa, deobe i ćelijske smrti. U ovu grupu gena se ubrajaju onkogeni i tumor supresor geni (Kinzler i Vogelstein, 1997). Nasledne ili spontane promene gena iz obe navedene kategorije dovode do višestrukog povećanja stope mutacija, izazivajući kaskadu mutacionih događaja u celom genomu, tj. “mutator fenotip”.

### 1.3.4 Onkogeni i tumor-supresor geni

Prema linearnom modelu klonalne selekcije (Fearon i Vogelstein, 1990), nasumične mutacije u genomu pojedinih ćelija pod odgovarajućim uslovima sredine daju selektivnu prednost svojim nosiocima, što dovodi do bržeg rasta i širenja pojedinih klonova u odnosu na ostale. Osnovna hipoteza ovog modela je da kancer predstavlja posledicu nekontrolisanog rasta ćelija zbog akumuliranih mutacija koje aktiviraju onkogene i inaktiviraju tumor-supresor gene. Identifikacija mutacija u genima koji popravljaju oštećenja DNK, kao i značaj genomske nestabilnosti u nastanku tumora, doveli su do revizije linearnog modela kancerogeneze (Breivik, 2005).



**Slika 5.** Model kancerogeneze. (A) Prema staroj verziji modela kancerogeneze u ćelijama dolazi do akumulacije mutacija (1), koje izazivaju aktivaciju onkogeni i inaktivaciju tumor supresora (2) što dovodi do nekontrolisane proliferacije (3) i nastanka kancera (4). (B) Nova verzija: Akumulacija mutacija u genomima ćelija (1), naročito u genima "čuvarima" (geni koji popravljaju oštećenja DNK i regulišu DNK replikaciju) (2) dovodi do povećanja genomske nestabilnosti (3). Povećana stopa mutacija uzrokuje promene u "gatekeeper" genima (onkogeni i tumor supresori) (4), što kao i u prethodnom modelu, dovodi do nekontrolisane proliferacije (5) i progresije kancera (6). (Preuzeto i modifikovano od Breivika, 2005)

Prema novom modelu, promene koje se akumuliraju u genomu mogu biti nasledne, posledica uticaja faktora spoljašnje sredine ili spontanah grešaka replikativih ili repativnih mehanizama. Mutacije u genima "čuvarima" dovode do pojave genomske nestabilnosti i

povećavaju ukupnu frekvencu mutacija u ćeliji, što dalje izaziva promene u onkogenima i tumor supresor genima (engl. gatekeepers) koji regulišu rast i deobe ćelija. Ova kaskada događaja vodi, kao i u Vogelstein-ovom modelu ka nekontrolisanoj proliferaciji i formiranju tumorske mase sa izraženom genetičkom i epigenetičkom nestabilnošću (slika 5). Osim navedenih promena, na razvoj tumorske mase utiču i interakcije sa ćelijama u okruženju, kao i proces vaskularizacije kojim se obezbeđuje neophodan dotok nutrienata. Promene u onkogenima i tumor supresor genima predstavljaju ključne događaje u oba navedena modela. Onkogeni su aktivirane forme protoonkogeni, čiji su proteinski produkti pozitivni regulatori ćelijskog rasta i proliferacije i negativni regulatori procesa apoptoze. Protoonkogeni su visoko konzervirani geni, prisutni u svim višećelijskim organizmima. Njihovi proteinski produkti su citokini, faktori rasta, transmembranski receptori faktora rasta, brojni signalni proteini, transkripcioni faktori i proteini uključeni u kontrolu DNK replikacije. Prvi onkogeni, otkriveni u genomima RNK virusa, tokom ranih faza litičkog ciklusa, imaju sposobnost transformacije inficiranih ćelija. Do sada je otkriveno više od 30 retrovirusa koji nose različite onkogene, među kojima su i polioma, papiloma i adeno virusi, kao i virus Epstein-Barr. Jedan od prvih identifikovanih onkogeni pripada familiji *ras* gena Harvey i Kirsten sarcoma virusa, koji indukuje različite tipove kancera (kancer mokraćne bešike, pluća,...) (Vogelstein, 2002).

Mehanizmi koji dovode do povećanja ekspresije i aktivnosti protoonkogeni su (Croce, 2008):

- Tačkaste mutacije, delecije ili insercije u okviru kodirajućih sekvenci ili promotorskih regiona protoonkogeni koje povećavaju stopu transkripcije i menjaju aktivnost proteina
- Amplifikacija protoonkogeni, pri čemu se povećava ukupan broj kopija u genomu
- Hromozomske translokacije koje dovode do povećane ekspresije protoonkogeni ili do formiranja fuzionih proizvoda sa onkogenom aktivnošću.

Translokacije i mutacije protoonkogeni se najčešće javljaju tokom inicijacije kancerogeneze, dok se njihove amplifikacije pre svega vezuju za fazu progresije kancera (Croce, 2008). Za razliku od onkogeni, koji nastaju kao posledica funkcionalne aktivacije protoonkogeni, tokom kancerogeneze dolazi do inaktivacije tumor supresor gena i do potpunog gubitka njihove funkcije u malignim ćelijama. Ovo je u potpunosti u skladu sa funkcijom tumor supresora, koji učestvuju u glavnim ćelijskim procesima, kao što su regulacija ćelijskog ciklusa i apoptoze, regulacija diferencijacije, očuvanje stabilnosti

genoma, popravka oštećenja DNK, signalna transdukcija i ćelijska adhezija (Oliveira i saradnici, 2005). Tumor supresori, za razliku od protoonkogeni inhibiraju ćelijski rast i deobu i promoviraju ćelijsku smrt. I dok aktivacija onkogeni najčešće predstavlja posledicu samo jednog mutacionog događaja, za inaktivaciju tumor supresor gena su potrebna bar dva mutaciona događaja. Prema Knudsonovoj "two-hit" hipotezi (Knudson, 1971) koja je postavljena na modelu retinoblastoma, pored nasledne mutacije u jednom alelu *Rb* gena, za inaktivaciju ovog tumor supresora neophodna je i delecija preostalog alela. Kod naslednih formi kancera prva mutacija je nasledena i prisutna još u oplodenoj jajnoj ćeliji, dok se drugi mutacioni događaj javlja nasumično u somatskim ćelijama tokom života. Sa druge strane kod sporadičnih kancera oba mutaciona događaja se dešavaju u genomima somatskih ćelija (Yu i Shen, 2002). Molekularni mehanizmi inaktivacije tumor supresora se razlikuju među tumorima, i zavise od gena koji se inaktivira. Najčešće su to mutacije u samom genu koje dovode do sinteze aberantnog proteina, hromozomske delecije (gubitak heterozigotnosti, LOH) ili epigenetičko utišavanje. Inaktivaciju tumor supresora mogu da izazovu i postranslacione modifikacije (ubikvitinacija, fosforilacija) i različite proteinske interakcije. Brojni kompleksni mehanizmi inaktivacije tumor supresora ukazuju da se klasičan Knudsonov model ne odnosi na sve tumor supresor gene.

#### **1.3.4.1 p53 tumor supresor**

*p53* tumor supresor gen, lokalizovan na hromozomu 17 (17p13), kodira multifunkcionalni transkripcioni faktor veličine 53-kDa, koji reguliše ekspresiju gena uključenih u kontrolu ćelijskog ciklusa, apoptoze, popravke oštećenja DNK (engl. DNA repair) i angiogeneze (Vogelstein i saradnici, 2000). Iako se *p53* intenzivno proučava još od otkrića 1979. godine, njegova uloga u procesu kancerogeneze i dalje nije potpuno razjašnjena, a brojni rezultati su često kontroverzni i zbunjujući. *p53* protein se sastoji iz pet glavnih domena: N-terminalni transaktivirajući domen na kome se dešavaju postranslacione modifikacije i odgovoran je za interakciju sa drugim regulatornim proteinima, prolinom bogat region koji sadrži pet kopija „PXXP“ motiva i takođe ima regulatornu ulogu, centralni DNK-vezujući domen sa evolutivno visoko konzerviranim sekvencama, oligomerizacioni domen neophodan za stvaranje funkcionalnih tetramera i C-terminalni domen koji ima regulatornu funkciju i takođe trpi brojne postranslacione modifikacije (Morris, 2002). *p53* se često označava kao čuvar genoma (Lane, 1992) jer putem transkripcione regulacije preko 150

gena kontroliše osnovne ćelijske procese, pre svega popravku DNK oštećenja, ćelijski ciklus, apoptozu i ćelijsko mirovanje (Levine i saradnici, 2006).

Prilikom proučavanja uloge p53 proteina moraju se uzeti u obzir interakcije brojnih komponenti signalnih puteva u koje je on uključen, tj. posmatrati takozvana “p53 mreža”. Aktivacija p53 mreže predstavlja fiziološki odgovor na ćelijski stres, tj. mehanizam uklanjanja oštećenih ćelija sprečavanjem njihove proliferacije i uvođenjem u apoptozu (Vogelstein i Lane, 2000). Postoje tri načina aktivacije p53 mreže:

- Oštećenja DNK dovode do aktiviranja protein kinaza ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) i Chk2 koje pokreću dalju kaskadu događaja (Carr, 2000)
- Povećana ekspresija faktora rasta, usled aktivacije onkogena Ras i Myc dovodi do aktivacije p53 mreže posredstvom p14<sup>ARF</sup> (Lowe i Lin, 2000)
- Hemioterapeutici, UV zračenje i kinazni inhibitori aktiviraju p53 mrežu putem ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3-related) i kazein kinaze II (Meek, 1999).

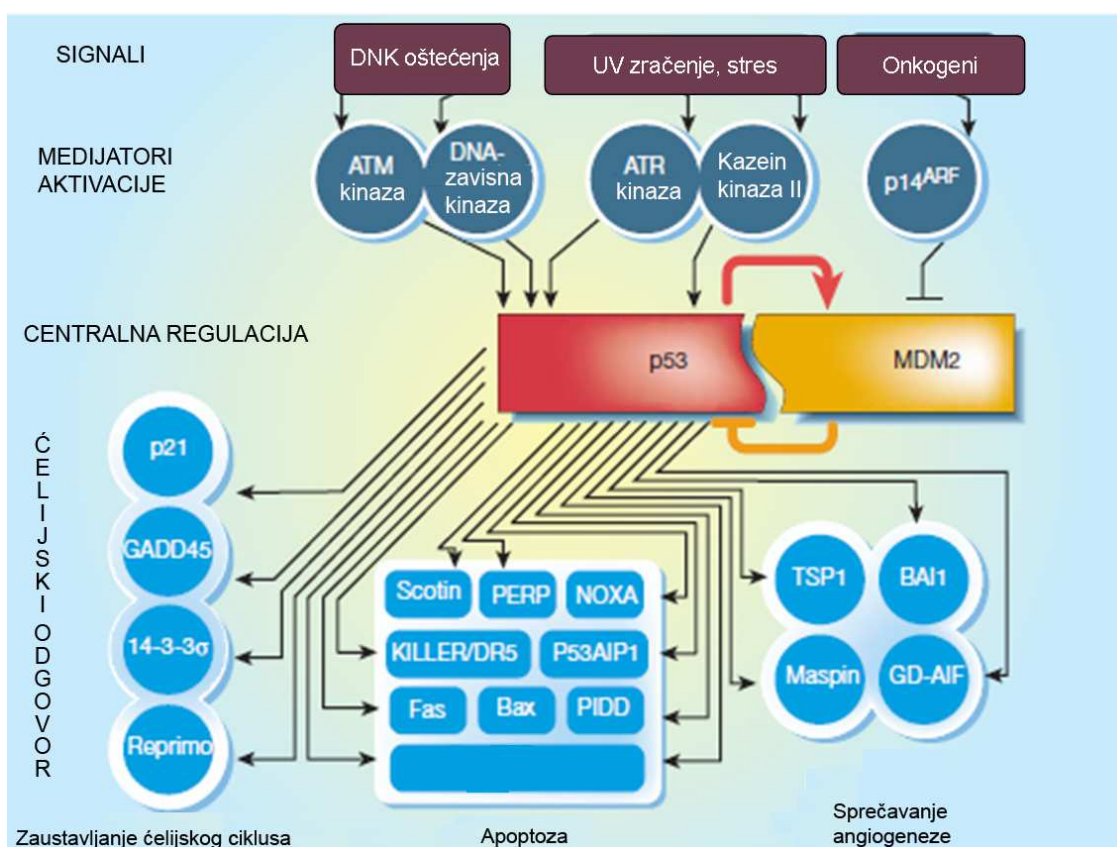
Navedeni mehanizmi sprečavaju degradaciju p53 proteina, što dovodi do povećanja njegove koncentracije u ćeliji. U normalnim fiziološkim uslovima, ovaj protein je slabo zastupljen usled kratkog poluživota (20-30 minuta). Degradacija p53 proteina je ubikvitin zavisna i regulisana povratnom spregom preko MDM2 (Murine Double Minute 2) proteina. Vezivanje MDM2 proteina za p53 predstavlja signal za njegovu ubikvitinaciju i dalju proteolizu, ali i blokira njegovu transkripcionu aktivnost (Fuster i saradnici, 2007). Osim MDM2, identifikovane su još 3 ubikvitin ligaze COP-1, PIRH-2 i CHIP koje su takođe uključene u degradaciju p53 proteina. Ekspresiju svih ovih enzima reguliše sam p53 tumor supresor, mehanizmom negativne povratne sprege (Millau i saradnici, 2009). Pored ubikvitinacije, na stabilnost p53 proteina i njegovu aktivaciju utiču različite kovalentne modifikacije (acetilacija, metilacija, sumoilacija i nedilacija lizinskih rezidua, pre svega u okviru C-terminalnog domena), brojne protein-protein interakcije i unutarćelijska lokalizacija (Carter i Vousden, 2009, Prives i Hall, 1999). Svi mehanizmi kojima se reguliše aktivnost p53 su kompromitovani prilikom kancerogeneze, a identifikovane mutacije u samom genu utiču na smanjenje njegove uloge u transkripcionoj aktivaciji brojnih gena. p53 kontroliše četiri kategorije ćelijskih procesa, transkripcionom regulacijom brojnih gena:

- Zaustavljanje ćelijskog ciklusa – p53 stimuliše ekspresiju p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, inhibitora ciklin zavisnih kinaza (CDK) što dovodi do inhibicije G1/S i G2/M tranzicije (Rozan i El-Deiry, 2007).

- Apoptoza – p53 aktivira sintezu pro-apoptotskih proteina BAX, APAF1, PUMA, p53AIP1, NOXA i PIDD (Gasco i saradnici, 2002).
- Održavanje stabilnosti genoma – p53 reguliše DNK repair gene *gadd45* i *p53r2*, kao i brojne gene uključene u procese popravke oštećenja DNK (NER, HRR,...) (Wahl i saradnici, 1997)
- Inhibicija angiogeneze – maspin, serin proteazni inhibitor, je jedan od antiangiogenih i antimetastatskih gena regulisan p53 proteinom (Maass i saradnici, 2000).

Zahvaljući navedenim funkcijama (slika 6) p53 predstavlja glavnu kočnicu u razvoju tumora, što objašnjava visok stepen njegove inaktivacije u skoro svim tipovima tumora. U najčešće mehanizme inaktivacije p53 tumor supresora spadaju tačkaste mutacije u samom genu, gubitak kratkog kraka hromozoma 17 i amplifikacija MDM2 (Baker i saradnici, 1989), što dovodi do redukcije njegove unutarćelijske koncentracije, ali i do akumulacije aberantnog p53 proteina (Marin i saradnici, 2000).

Zahvaljujući brojnim rezultatima više od 2000 studija, do sada je identifikovano oko 22.000 mutacija u ovom genu, objedinjenih u baze podataka sa mogućnošću proširivanja novim podacima (Hamroun i saradnici, 2006).



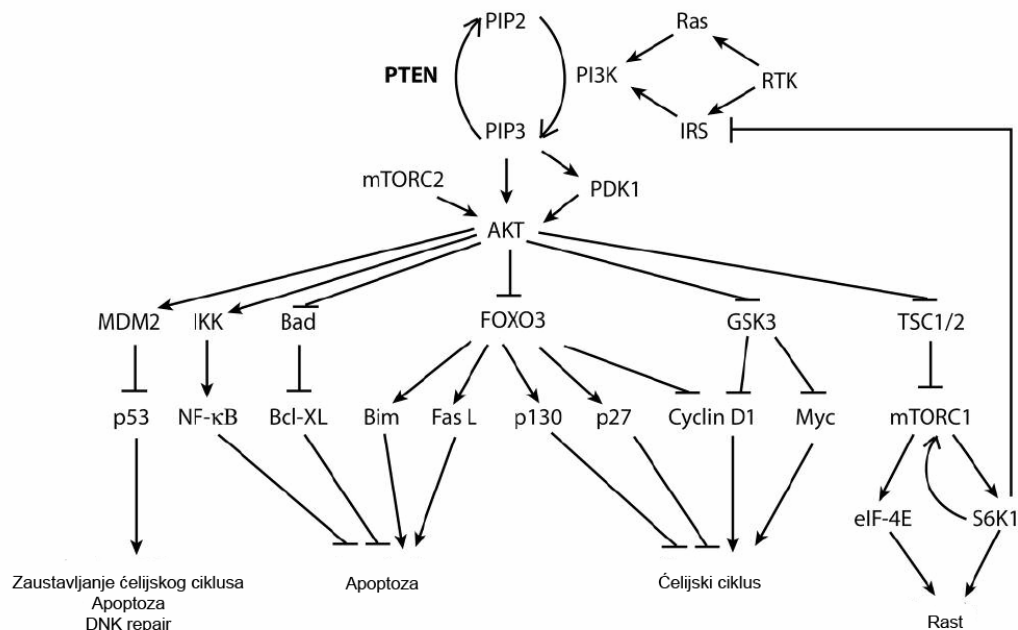
**Slika 6.** p53 signalna mreža. DNK oštećenja, UV zračenje ili onkogeni aktiviraju p53 mrežu preko enzima koji modifikuju p53 protein i njegov negativni regulator, MDM2. Povećanje koncentracije aktiviranog p53 proteina dovodi do translacije brojnih gena koji sprečavaju progresiju tumora zaustavljanjem ćelijskog ciklusa, sprečavanjem angiogeneze ili uvođenjem ćelije u apoptozu. Pored ovoga, aktivacija p53 signalne mreže utiče na povećanje stabilnosti genoma, reguliše diferencijaciju, kao i obnavljanje ekstraćelijskog matriksa, citoskeleta i sinteze sekretornih proteina. Gubitak funkcije p53 tumor supresora je detektovan u skoro svim humanim kancerima. (Preuzeto i modifikovano od Vogelstein i saradnika, 2000)

Za razliku od ostalih tumor supresora, koji se mutacionom inaktivacijom eliminišu iz ćelija kancera, mutacije koje pogađaju *p53* gen ne sprečavaju njegovu sintezu (Soussi i Beroud, 2001), već obezbeđuju dominantno negativnu inhibiciju “wild-type” p53 proteina koji se sintetiše sa preostalog alela, kao i tzv. “gain-of-function” osobine, pri čemu mutirani p53 protein dobija onkogeno svojstvo (Soussi, 2003). Iako mutacije pogađaju ceo p53 gen, najfrekventnije je promenjena sekvenca koja kodira DNK vezujući region p53 proteina, i to egzoni 5-9, pri čemu su na poziciji svakog baznog para u ovom regionu identifikovane bar tri alteracije (Soussi i Beroud, 2001).

### 1.3.4.2 PTEN tumor supresor

*PTEN* (*MMAC1*, *TEP1*) je identifikovan 1997. godine, kao tumor supresor gen lociran na hromozomu 10 (10q23), inaktiviran u brojnim sporadičnim tumorima, uključujući i maligne gliome. Nasledne mutacije u ovom genu uzrokuju pojavu različitih oboljenja (Cowdenov sindrom, Lhermitte-Duclos-ova bolest, Bannayan-Riley-Ruvalcaba sindrom, retki juvenilni polipozni sindromi) koja, između ostalog, imaju i izraženu predispoziciju za pojavu višestrukih tumora (Knobbe i saradnici, 2002). Aktivnost PTEN-a je određena njegovim tirozin fosfataznim domenom koji pokazuje dvostruki afinitet, te funkcioniše kao lipidna i proteinska fosfataza. Promotorski region *PTEN* gena sadrži regulatorne elemente i CpG ostrvca, a na njegovu transkripciju utiču brojni transkripcioni faktori, uključujući i p53, TGF $\beta$  (tumor growth factor  $\beta$ ) i Egr1 (early growth response 1 transcription factor). Osim toga, hipermetilacija promotora ovog gena predstavlja učestali mehanizam njegove inaktivacije. Deo N terminalnog domena ovog proteina je homolog tenzinu i auksilinu, a na ovom kraju proteina se nalazi i fosfatazni domen, sličan kao kod ostalih protein fosfataza ali sa uvećanim aktivnim centrom, zbog supstratne specifičnosti za fosfoinozitle (Lee i saradnici, 1999). C terminalni region nema katalitičku aktivnost, ali ima značajnu ulogu u regulaciji stabilnosti, poluživota i lokalizacije ovog proteina. U ovom regionu se nalaze: C2 domen odgovoran za interakciju sa ćelijskom membranom i pozicioniranje katalitičkog domena, PDZ-vezujući domen odgovoran za interakciju sa brojnim membranskim guanilat kinazama (MAGI2, MAGI3, hDLG) i serin/treonin kinazama (MAST205), kao i brojna mesta fosforilacije, koja utiče na povećanje stabilnosti PTEN-a i regulaciju aktivnosti usled konformacionih promena (Knobbe i Merlo, 2002). Osnovne ćelijske funkcije PTEN-a zavise od njegove fosfatazne aktivnosti, tj. defosforilacije fosfoinozitol substrata. Naime, PTEN ima veliki afinitet za fosfatidilinozitol fosfate, naročito fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat (PIP3), zbog čega je ovaj tumor supresor ključni negativni regulator PI3K/Akt signalnog puta.

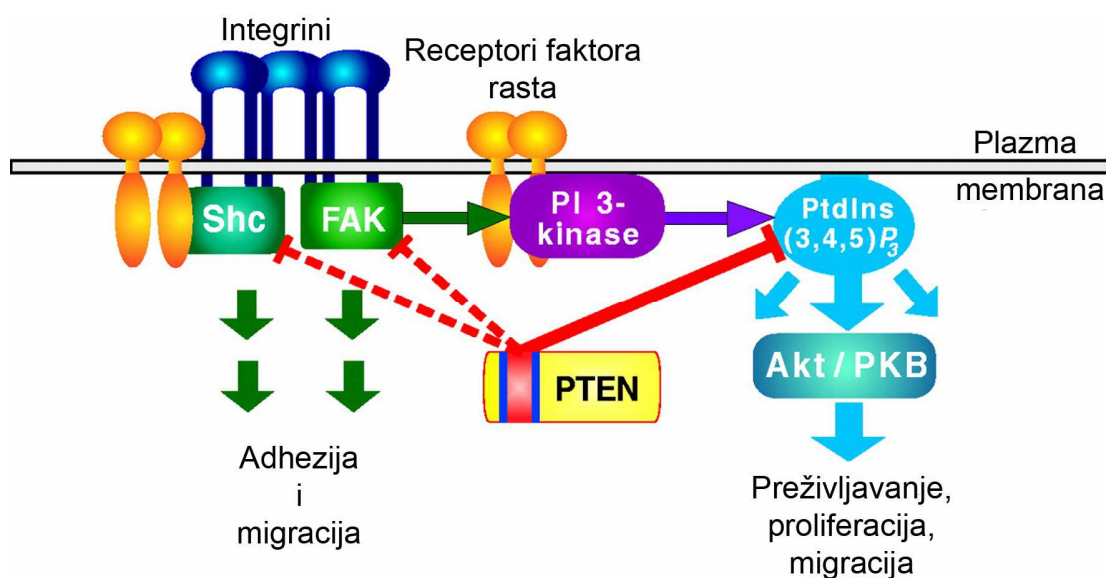




**Slika 7.** PTEN kao negativni regulator PI3K/Akt signalnog puta. Vezivanje faktora rasta dovodi do aktivacije receptor tirozin kinaze (RTK) koja fosforiliše brojne supstrate i preko signalnih molekula Ras i IRS (engl. insulin receptor substrate) aktivira PI3K, koja prevodi fosfatidilinozitol 4,5 bisfosfat (PIP2) u fosfatidilinozitol 3,4,5 trisfosfat (PIP3). PIP3 izaziva translokacionu aktivaciju PDK1 i Akt kinaze, što dovodi do ćelijskog rasta, proliferacije i preživljavanja, zbog smanjenja koncentracije proapoptotskih proteina Bad, Fas L, Bim i p53, i aktivacije NF-κB signalnog puta. Osim toga, Akt promoviše ćelijski rast aktiviranjem mTORC1 signalnog puta. PTEN vrši defosforilaciju PIP3 u PIP2, te ima ulogu u negativnoj regulaciji PI3K/Akt signalnog puta. (Preuzeto i modifikovano od Liu i saradnika, 2008)

PIP3 je značajan sekundarni glasnik koji, između ostalog, aktivira Akt kinazu (protein kinazu B), dovodeći do njene translokacije i vezivanja za ćelijsku membranu, kao i do aktivacije PDK1, koji fosforiliše Akt na poziciji treonin 308 (Vanhaesebroeck i Alessi, 2000). Akt je jedna od ključnih serin-treonin kinaza koja reguliše brojne ćelijske procese: ćelijski ciklus, preživljavanje, pokretljivost i adhezivnost, proteinsku sintezu i rast, metabolizam glukoze, kao i angiogenezu (slika 7). Aktivirana Akt kinaza podstiče proliferaciju jer inhibira tumor supresorne signalne molekule kao što su Bad (engl. Bcl-XL/Bcl-2-associated death promoter), FOXO3 (engl. forkhead box O3), GSK3 (engl. glycogen synthase kinase 3) i TSC2 (engl. tuberous sclerosis complex2); aktivira brojne onkogene: MDM2, PDK1 i IKK (IκB kinaza), i inhibira apoptozu 1) snižavajući koncentraciju proapoptotskih proteina Bad, Fas L (Fas ligand), Bim (engl. Bcl-2-interacting

mediator of cell death) i p53 i 2) pojačavajući antiapoptotski signalni put preko NF- $\kappa$ B (engl. nuclear factor- $\kappa$ B) (Manning i Cantley, 2007). U fiziološkim uslovima PTEN dovodi do snižavanja nivoa PIP3, njegovom defosforilacijom, čime se inhibira kompletan Akt signalni put. Gubitak funkcije PTEN-a predstavlja jedan od ključnih događaja tokom kancerogeneze jer, dovodeći do povećanja unutarćelijske koncentracije PIP3 i hiperaktivacije Akt-a, direktno utiče na preživljavanje i izbegavanje apoptoze (Stambolic i saradnici, 1998). Fosforilacijom Chk1 (engl. checkpoint kinase 1), ključnog regulatora DNK replikacije i kontrolnih tačaka G1, S i G2 faza ćelijskog ciklusa, Akt kinaza dovodi do indukcije genomske nestabilnosti (Puc i saradnici, 2005). Osim ovoga Akt kinaza inaktivira FOXO3 i GSK3 kinazu, što dovodi do smanjenja ekspresije ciklina D1, i inhibicije Myc-a (Manning i Cantley, 2007). Na osnovu navedenog može se zaključiti da je PTEN, negativni regulator Akt signalnog puta, uključen u regulaciju ćelijskog ciklusa i apoptoze (Di Cristofano i saradnici, 1999). Posebno je značajna uloga protein fosfatazne aktivnosti PTEN-a u regulaciji procesa ćelijske adhezije i migracije preko defosforilacije fokalne adhezione kinaze (FAK) i adapternog proteina Shc (slika 8) (Tamura i saradnici, 1998).



**Slika 8.** Uloga PTEN-a u defosforilaciji membranskih supstrata. Fosfatazni domen PTEN-a (crveno) defosforiliše i inaktivira lipidne i proteinske supstrate (crvene linije). Pored afiniteta ka PIP3, PTEN pokazuje slabu protein tirozin fosfataznu aktivnost ka FAK i Shc proteinima, regulišući tako i druge signalne puteve. (Preuzeto i modifikovano od Yamade i Araki, 2001).

Pored svega navedenog, PTEN inhibira intergin zavisnu aktivaciju MAPK (engl. mitogen-activated protein kinase) i reguliše aktivnost Wnt signalnog puta i p53 mreže (Weng i saradnici, 2001). Do inaktivacije PTEN-a u ćelijama kancera najčešće dolazi zbog pojedinačnih mutacionih događaja u okviru gena, delecije jednog alela - gubitak heterozigotnosti (LOH) ili epigenetičkog utišavanja, hipermetilacijom promotora (Dahia, 2000). Više od pola detektovanih tačkastih mutacija dovodi do preranog zaustavljanja translacije i sinteze aberantnih proteina. „Missense” mutacije uglavnom pogađaju konzervirane regione i dovode do promene u strukturi sintetisanih proteina, kao i do gubitka funkcije. Pored navedenih mehanizama, na inaktivaciju PTEN-a i promociju kancerogeneze utiču i poremećaji u regulaciji transkripcije ovog gena, povećana degradacija, različite posttranslacione modifikacije i interakcije sa drugim proteinima (Salmena i saradnici, 2008).

#### **Uticao lokalizacije *PTEN*-a na funkciju**

Unutarćelijska lokalizacija predstavlja još jedan mehanizam regulacije aktivnosti PTEN-a koji utiče na modulaciju neoplastične transformacije (Planchon i saradnici, 2008). Pokazano je da lokalizacija zavisi od faze ćelijskog ciklusa, pri čemu su veće nukleusne koncentracije PTEN-a karakteristične za G0/G1 fazu, a niže za S fazu ćelijskog ciklusa (Ginn-Pease i Eng, 2003). Iako PTEN ne sadrži NLS (od eng. nuclear localization signal) i NES (nuclear export signal) motive, pretpostavlja se da se nukleo-citoplazmatični transport ovog proteina obavlja 1) difuzijom, 2) zahvaljujući prisustvu citoplazmatičnog lokalizujućeg signala, 3) aktivnim transportom RAN GTP-azom ili MVP (engl. major vault protein), 4) zavisno od fosforilacije i 5) zavisno od monoubikvitinacije na poziciji 289 (Planchon i Waite, 2008). PTEN lokalizovan u nukleusu ima ulogu u zaustavljanju ćelijskog ciklusa na prelasku iz G0 u G1 fazu (Chung i saradnici, 2006), održavanju hromozomske stabilnosti (Shen i saradnici, 2007) i regulaciji apoptoze (Gil i saradnici, 2006). Uloga PTEN-a u održavanju hromozomske stabilnosti je izuzetno značajna za proces kancerogeneze. Naime, u normalnim ćelijama je neophodna asocijacija PTEN-a i CENP-C proteina za održanje stabilnosti centromera. Pored toga, PTEN interaguje i sa promotorom *Rad51* gena, reguliše njegovu ekspresiju i time učestvuje u reparaciji dvolančanih prekida DNK.

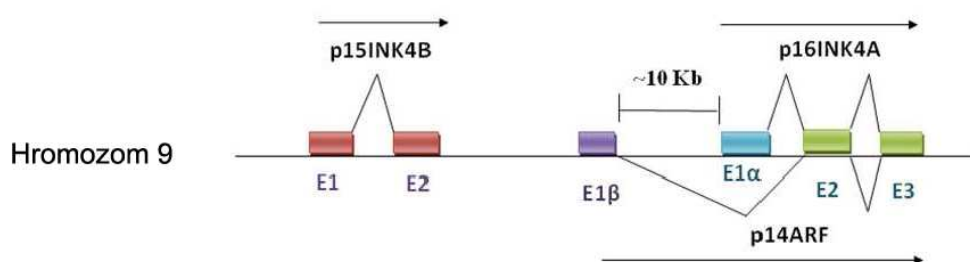
Gubitak funkcije PTEN-a u nukleusu dovodi do izražene hromozomske nestabilnosti i poremećaja u regulaciji ćelijskog ciklusa. Održavanje odnosa nukleusne i citoplazmatične koncentracije PTEN-a je izuzetno značajno za pravilno funkcionisanje ćelija. Poremećaj

ove ravnoteže značajno utiče na tumor supresorska svojstva ovog proteina, što finalno može dovesti do neoplastične transformacije (Planchon i Waite, 2008).

Iako je pokazano da je inaktivacija PTEN-a kasni događaj u nastanku pojedinih tipova tumora, na primer glioblastoma, postoje indicije da se ovo ne odnosi na sve tumore, jer su ove promene prisutne već u prekanceroznim lezijama endometrijalnih tumora (Maxwell i saradnici, 1998).

### 1.3.4.3 p16 tumor supresor

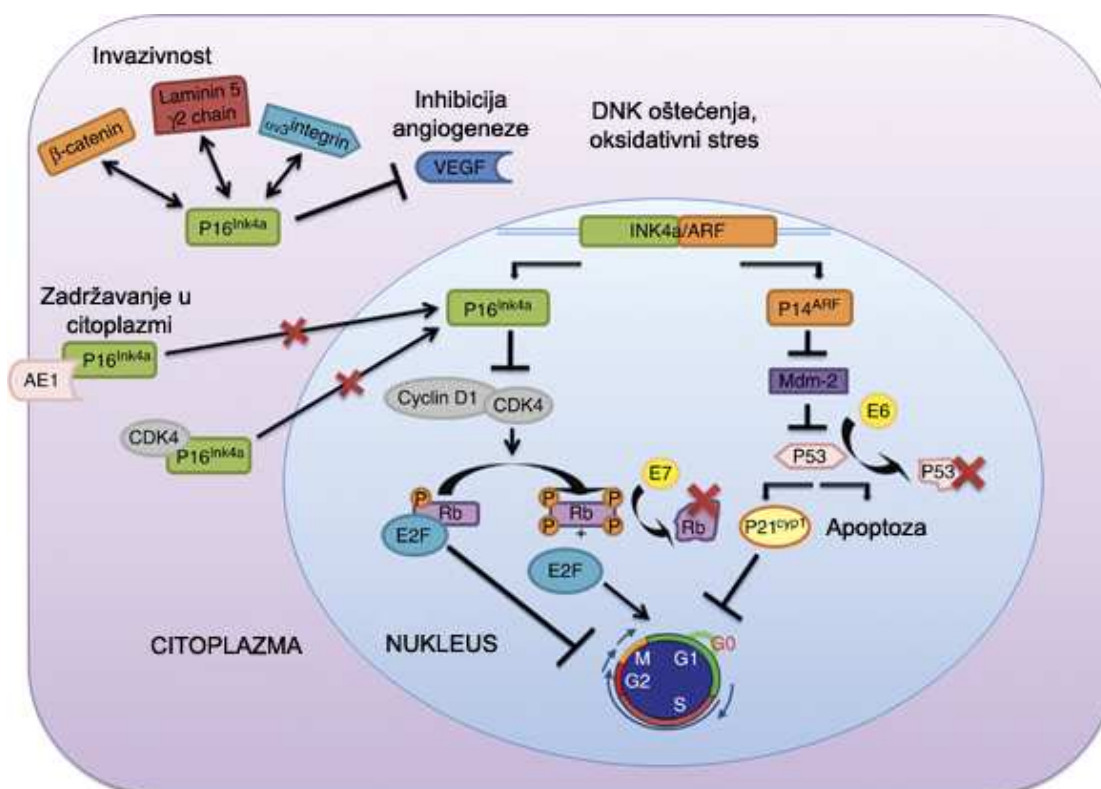
p16 (INK4A, CDKN2A, MTS-1) tumor supresor je ciklin-zavisni kinazni inhibitor (CKI), kodiran genom lociranim u okviru INK4A/ARF/INK4B lokusa na poziciji 9p21 u humanom genomu (Serrano i saradnici, 1993). Osim p16, ovaj 35kb veliki genski lokus kodira još dva tumor supresora: p15 i p14<sup>ARF</sup>. Za razliku od p15, koji je odvojen i ima zaseban okvir čitanja (ORF), p16 i p14<sup>ARF</sup> nastaju alternativnim iskrajanjem egzona (slika 9), pri čemu imaju zajednički drugi i treći egzon (Kim i Sharpless, 2006).



**Slika 9.** Alternativna obrada transkripta p16<sup>INK4A</sup> i p14<sup>ARF</sup>. Egzon E1α, zajedno sa E2 i E3 formira p16 transkript, dok se egzon E1β alternativno kombinuje sa egzonima E2 i E3 formirajući p14 transkript. Ova dva transkripta imaju različite okvire čitanja prilikom translacije, pa p14 i p16 nemaju homologiju na proteinskom nivou. (Preuzeto i modifikovano od Agarwal i saradnika, 2012).

Pretpostavlja se da su svi članovi INK4 familije ciklin zavisnih kinaza (p16/INK4A, p15/INK4B, p18/INK4C i p19/INK4D) nastali duplikacijom jednog predačkog gena. Procesi translokacije i hromozomskih rearanžmana su doveli do razdvajanja dupliranih gena, pa se *INK4C* i *INK4D* nalaze na različitim hromozomima, dok su *INK4A* i *INK4B* locirani na istom hromozomu (Agarwal i saradnici, 2012). Svi članovi INK4 familije CKI vrše inhibiciju međusobnih interakcija ciklin-zavisnih kinaza (CDK), tako što vezuju CDK4 ili CDK6 (Sherr and Roberts, 1995), dok se tumor supresorska svojstva p14<sup>ARF</sup>

zasnivaju na inhibiciji MDM2, što dovodi do stabilizacije p53. Humani p16 je 156 aminokiselina dug protein, molekulske mase oko 16-kDa (Serrano i saradnici, 1993). On poseduje 4 ankirinska ponovka odgovorna za protein-protein interakcije, koji su inače zajednička karakteristika svih CDK inhibitora INK familije. Funkcionalni domen p16 proteina, odgovoran za interakcije sa CDK4 i CDK6 (engl. cyclin dependent kinase) se nalazi na njegovom C terminalnom kraju. Osnovna uloga p16 je regulacija ćelijskog ciklusa i G1/S tranzicije (slika 10). U zdravim ćelijama INK4A genski lokus je uobičajeno reprimiran, a do njegove aktivacije dolazi tokom starenja, kao i pod uticajem onkogenih stimulusa i stresa (Matheu i saradnici, 2009). Tokom G1 faze ćelijskog ciklusa, CDK4 i CDK6 formiraju kompleks sa ciklinom D1 što dovodi do fosforilacione inaktivacije RB proteina i oslobađanja E2F transkripcionog faktora iz RB/E2F kompleksa (Weinberg, 1995). Slobodni E2F transkripcioni factor aktivira transkripciju gena koji su neophodni za S fazu ćelijskog ciklusa (DNK polimeraze, timidin kinaze, dihidrofolat reduktaze). p16 inhibira interakciju CDK4/6 sa ciklinom D1, čime se sprečava fosforilacija RB proteina i oslobađanje E2F, što finalno dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa (Haddad i saradnici, 1999, Serrano i Hannon, 1993). Pored ovoga, p16 inhibira i onkogenu aktivnost c-myc blokirajući formiranje ciklin D1/CDK4 kompleksa (Haas i saradnici, 1997). p16 ima ulogu i u ćelijskoj diferencijaciji, naročito tokom razvića mozga (Lois i saradnici, 1995). Ova funkcija je u skladu sa prethodnom, imajući u vidu da se procesi proliferacije i diferencijacije međusobno isključuju. Do trajnog zaustavljanja ćelijskog ciklusa (engl. senescence) dolazi tokom starenja pod uticajem DNK replikativnog stresa ili aktivacije onkogeno. Akumulacija p16 je povezana sa stanjem mirovanja izazvanim replikativnim stresom, povećana ekspresija p16 izaziva prevremen ulazak u ovu fazu (Chebel i saradnici, 2007). p16 smanjuje transkripciju hTERT telomeraze što dovodi do skraćivanja telomera i inhibicije ćelijskog rasta (Bazarov i saradnici, 2010). Osim ovoga, p16 smanjuje invazivni potencijal tumora, negativnom regulacijom transkripcije matriksne metaloproteinaze MMP-2, cink-zavisne endopeptidaze koja razgrađuje komponente ekstraćelijskog matriksa (Chintala i saradnici, 1997).



**Slika 10.** Funkcije i interakcije proteina kodiranih INK4A/ARF lokusom. p16 interaguje sa CDK4/6, što dovodi do inaktivacije RB proteina i zaustavljanja ćelijskog ciklusa. p14 povećava stabilnost p53 tumor supresora, inhibicijom MDM2. (Preuzeto i modifikovano od Romagosa i saradnika, 2011).

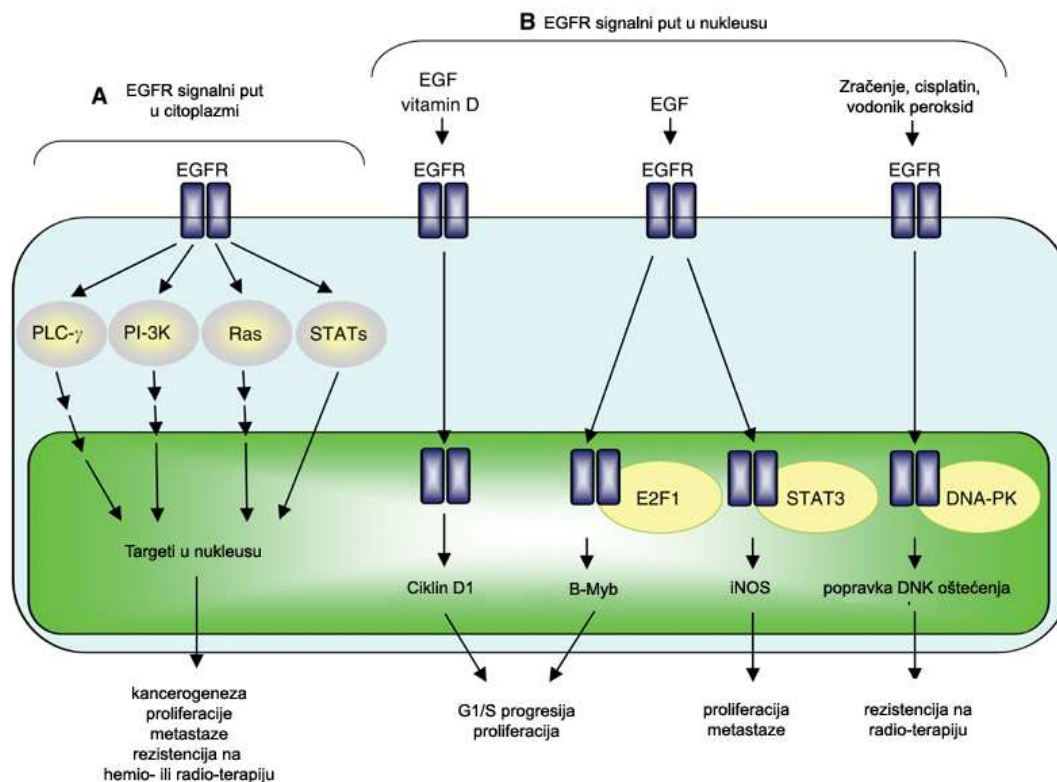
p16 je značajan tumor supresor, čiji gubitak funkcije dovodi do nastanka brojnih tipova kancera (Koh i saradnici, 1995). Promene u strukturi i funkciji p16 tumor supresora predstavljaju drugu najčešću promenu u tumorskim ćelijama, zaostajući samo za frekvencom promena koje pogađaju p53 tumor supresor (Baylin i saradnici, 1998). Delecije jednog (LOH) i oba alela (homozigotne delecije) p16 gena, kao i hipermetilacija promotora predstavljaju najčešći način inaktivacije ovog tumor supresora u genomima kancera (Agarwal i saradnici, 2012). Pored navednih mehanizama, u određenim tipovima kancera (glioblastomi, adenokarcinomi pankreasa, melanomi) detektovane su i mutacije u kodirajućem regionu ovog gena koje dovode do sinteze nefunkcionalnih proteina ili onemogućavaju interakcije sa CDK4 i CDK6. Unutarćelijska lokalizacija p16 proteina, takođe, određuje njegovu funkciju i značajno utiče na proces maligne transformacije. Naime, u normalnim ćelijama, p16 se transportuje u nukleus, gde obavlja funkciju CKI regulišući ćelijski ciklus. Do povećane koncentracije p16 u citoplazmi dolazi tokom

progresije tumora, pa se smatra da citoplazmatska lokalizacija predstavlja mehanizam njegove inaktivacije (Evangelou i saradnici, 2004)

#### 1.3.4.4 EGFR

EGFR (ErbB1, HER1) je transmembranski protein veličine 180-kDa, koji zajedno sa ErbB2 (HER2, Neu), ErbB3 (HER3) i ErbB4 (HER4) pripada familji EGFR (ErbB) receptorskih tirozin kinaza. Sva četiri člana ove familije imaju sličnu strukturu: ligand-vezujući ekstraćelijski N-terminalni domen, jedan hidrofobni transmembranski region, citoplazmatski tirozin kinazni domen koji izostaje kod ErbB3 i C-terminalni region (Wells, 1999). Iako je za sve članove ErbB familije zajednički mehanizam aktivacije i prenošenja signala, svaki od njih pokazuje karakterističnu ligand-specifičnost, tkivnu ekspresiju i trajanje signalne transdukcije (Hynes i MacDonald, 2009). Aktivaciju ErbB receptora izaziva vezivanje brojnih liganda, članova EGF familije peptidnih faktora rasta (engl. epidermal growth factor) (Yarden, 2001), koji su prema afinitetu za receptore podeljeni u tri grupe. Prva grupa uključuje ligande EGFR-a: EGF (epidermalni faktor rasta), TGF- $\alpha$  (transformišući faktor rasta  $\alpha$ ) i AR (amfiregulin). U drugu grupu spadaju BTC (betacelulin), HB-EGF (heparin-vezujući EGF) i epiregulin (EPR), koji pokazuju specifičnost za EGFR i ErbB4, a treću grupu formiraju ligandi ErbB3 i ErbB4: NRG (nuregulini) i HRG (heregulini). Vezivanje liganda dovodi do homo- ili hetero-dimerizacije receptora i aktivacije citoplazmatskog tirozin kinaznog domena, što finalno dovodi do auto- ili trans-fosforilacije tirozina na C-terminalnom kraju receptora (Yarden, 2001). Fosforilisani tirozini postaju mesta vezivanja brojnih proteina, tzv. efektora koji sadrže SH2 (engl. Src homology 2) ili PTB (engl. phosphotyrosine binding) domene i nastavljaju signalnu transdukciju. Nishodna signalna mreža uključuje preko 100 različitih proteina i brojne signalne puteve kojima se regulišu procesi proliferacije, diferencijacije, adhezije, migracije, angiogeneze i sprečava apoptoza (slika 11) (Baselga i Hammond, 2002). Vezivanje EGF za EGFR dovodi do aktivacije Ras/Raf/MAPK i PI3K/Akt signalnih puteva, kao i aktivacije protein kinaze C (PKC), STAT signalnog puta, c-Jun kinaze, p38 MAP kinaze i Ca<sup>2+</sup>-kalmomodulin-zavisne protein kinaze (CaMK) (Huang i Chang, 2011). EGFR ima značajnu fiziološku ulogu u procesu razvića i održavanju homeostaze (Jorissen i saradnici, 2003) Osim što dovodi do aktivacije, vezivanje EGF-a predstavlja signal za internalizaciju, ubikvitinaciju i endocitozu EGFR-a, što u zdravim ćelijama predstavlja mehanizam zaustavljanja nekontrolisane signalne transdukcije (Citri i Yarden, 2006). Pored

uloge u aktivaciji signalnih kaskada u citoplazmi, EGFR učestvuje i u regulaciji procesa u nukleusu, gde dospeva direktnom translokacijom. U zdravim ćelijama dolazi do povećanja nuklearne ekspresije EGFR-a tokom proliferacije.



**Slika 11.** Signalni put EGFR-a u citoplazmi i nukleusu. (A) Citoplazmatični prenos signala se ostvaruje preko četiri modula: PLC $\gamma$ -PKC, Ras-Raf-MAPK, PI3K-Akt-GSK i STAT. Aktivacija ovih puteva dovodi do proliferacije tumora, formiranja metastaza i sticanja rezistencije na radio- i hemioterapiju. (B) Do aktivacije signalne kaskade u nukleusu može dovesti vezivanja liganda, vitamin D, zračenje, cisplatin i vodonik-peroksid. EGFR u nukleusu interaguje sa transkripcionim faktorima E2F1 i STAT3, regulišući transkripciju brojnih gena što dovodi do ubrzanja ćelijskog ciklusa, proliferacije i rezistencije na terapiju zračenjem. (Preuzeto i modifikovano od Lo i Hunga, 2006)

Osnovne funkcije EGFR-a u nukleusu su: regulacija genske ekspresije fosforilacija tirozinskih rezidua ciljanih proteina i protein-protein interakcije koje aktiviraju mehanizme popravke DNK oštećenja (Gururaj i saradnici, 2011). Lin i saradnici su pokazali da prolinom bogat C-terminalni region EGFR-a ima transaktivacionu funkciju i dovodi do povećanja transkripcije ciklina D1, vezujući se za ATRS region promotora ovog gena. Pošto EGFR ne poseduje DNK vezujući domen, pretpostavlja se da aktivaciji promotora prethodi asocijacija sa transkripcionim faktorima, mucinom 1 ili RNA helikazom A (Huo i saradnici, 2010). Pored uloge transkripcionog koregulatora u modulaciji genske ekspresije, EGFR ima i kinaznu aktivnost, kojom se reguliše aktivacija različitih faktora u nukleusu i

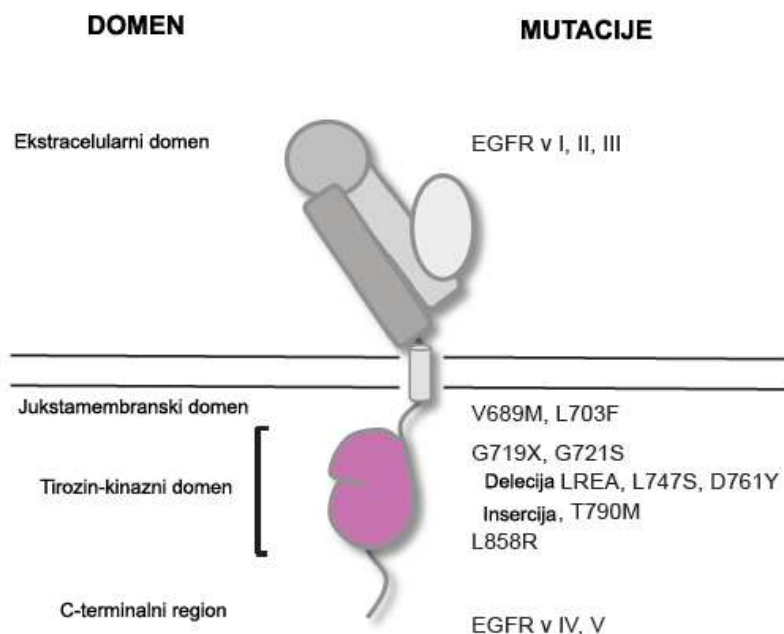


nivo ekspresije određenih gena. Jedini, do sada, identifikovani supstrat EGFR-a je PCNA (engl. proliferating cell nuclear antigen), čija fosforilacija na poziciji Tyr211 dovodi do povećanja stabilnosti i afiniteta prema hromatinu (Wang i saradnici, 2006). Translokacija aktiviranog EGFR-a u nukleus predstavlja mehanizam kojim se izbegava degradacija receptora u uslovima stresa izazvanog jonizujućim zračenjem, temperaturom, vodonik peroksidom ili cisplatinom (Rodemann i saradnici, 2007). Pri navedenim uslovima, EGFR u nukleusu aktivira DNK-zavisnu kinazu (DNA-PK) fosforilacijom na poziciji Thr2609, što dovodi do popravke DNK oštećenja (Bandyopadhyay i saradnici, 1998). Osim ovoga, EGFR stupa u interakcije sa p53 i MDC1 proteinima, odovornim za popravku DNK oštećenja uzrokovana zračenjem.

Jedan od osnovnih mehanizama regulacije EGFR signalne transdukcije je endocitoza, koja može biti nezavisna ili zavisna od klatrina, što je češći slučaj. Vezivanje liganda za EGFR receptor dovodi do translokacije ligand-receptor kompleksa duž plazma membrane, do regiona gde postoje akumulacije klatrina. Invaginacijom plazma membrane nastaju unutarćelijske vezikule obložene klatrinom koje sadrže ligand-EGFR komplekse. Potom dolazi do odvajanja klatrina u citoplazmi i formiranja prelaznih vezikula, koje se fuzionišu sa ranim endozomima. Dalji put razgradnje vodi preko kasnih endozoma do lizozoma u kojima se vrši proteazna degradacija liganda i receptora (Ceresa, 2011). Svaka od navedenih endocitotskih organela se karakteriše svojstvenom pH vrednošću, što dovodi do formiranja opadajućeg gradijenta pH pogodnog za razgradnju ligand-receptor kompleksa.

TGF $\alpha$ , se razlikuje od ostalih liganda, jer obezbeđuje recikliranje receptora, tj. njegovo vraćanje u plazma membranu gde ponovo učestvuje u signalnoj transdukciji (McClintock i Ceresa, 2010). Pretpostavlja se da je ovo uzrokovano pH vrednostima vezivanja i disocijacije koje su specifične za svaki ligand. Iz svega navedenog može se zaključiti da endocitoza predstavlja mehanizam negativne regulacije signalne transdukcije preko EGFR-a.

Poremećaji EGFR signalne transdukcije mogu imati ozbiljne posledice po ćeliju, i najčešće se javljaju tokom kancerogeneze. Povećana ekspresija receptora, aktivirajuće mutacije tirozin-kinaznog domena i smanjena endocitoza predstavljaju osnovne mehanizme aktivacije EGFR-a u ćelijama kancera (Hynes i MacDonald, 2009). Povećana ekspresija može biti posledica epigenetičke regulacije, amplifikacije gena ili onkogenih virusa (Hirsch i saradnici, 2009). Mutacije pogađaju specifične regione *EGFR* gena, odgovorne za funkciju i regulaciju receptora, što dovodi do konstitutivne aktivacije receptora (slika 12).



**Slika 12.** Onkogene varijante EGFR-a. Šematski prikaz najčešćih mutacija/varijanti EGFR-a koje imaju onkogeno svojstvo. (Preuzeto i modifikovano od Zhang i saradnika, 2010).

Delecije u delu gena koji kodira ekstracelularni domen EGFR-a dovode do gubitka ligand-vezujućeg regiona i u zavisnosti od veličine zahvaćenog regiona i pozicije delecije razlikujemo EGFRvI, EGFRvII i EGFRvIII (Nicholas i saradnici, 2006). Mutacije u citoplazmatskom jukstamembranskom regionu promovišu dimerizaciju ili dovode do konstitutivne aktivacije kinaznog domena. U ovom regionu su detektovane “missense” mutacije V689M i L703F. Delecija u egzonu 19 (LREA motiv), i tačkasta mutacija (L858R) u egzonu 21 predstavljaju najčešće onkogene promene tirozin-kinaznog domena. Pored navedenih, detektovane su i brojne tačkaste mutacije i insercije u okviru egzona 19 i 20 koje dovode do rezistencije na EGFR inhibitore i smanjuju efikasnost terapije (Zhang i Stiegler, 2010). U gliomima su detektovane i delecije C-terminalnog domena (EGFRvIV i EGFRvV) koje dovode do gubitka inhibitorynog efekta na kinaznu aktivnost (Nicholas i Lukas, 2006). Pojačana aktivnost EGFR-a i aktivacija nishodnih signalnih puteva utiču na procese transkripcije i translacije, stimulišući proliferaciju, kancerogenezu, migraciju, adheziju i angiogenezu, i inhibirajući apoptozu (Huang i saradnici, 2009).

## **1.4 Tumori centralnog nervnog sistema**

Postoji preko 100 različitih tipova tumora koji nastaju u mozgu i ostalim delovima centralnog nervnog sistema (CNS). Tumori centralnog nervnog sistema obuhvataju tumore mozga, moždanih ovojnica, kičmene moždine, kranijalnih nerava i ostalih delova CNS-a, i predstavljaju najčešći uzrok smrti od kancera kod dece. Ovi tumori mogu biti invazivni (maligni) i neinvazivni (benigni), primarni i sekundarni, tj. metastaze primarnih tumora iz drugih tkiva, ali se podela najčešće zasniva na histopatološkim i morfološkim karakteristikama tumora.

Prema aktuelnoj klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (WHO) (Louis i saradnici, 2007) postoji sedam grupa tumora CNS-a sa brojnim podkategorijama:

- 1) Tumori neuroepitelnog tkiva**
  - a. Astrocitni tumori
  - b. Oligodendroglijalni tumori
  - c. Oligoastrocitni tumori
  - d. Ependimalni tumori
  - e. Tumori horioidnog pleksusa
  - f. Ostali neuroepitelijalni tumori
  - g. Neuronalni i mešani neuronalno-glijalni tumori
  - h. Tumori pinealnog regiona
  - i. Embrionalni tumori
  
- 2) Tumori karnijalnih i perifernih nerava**
  - a. Švanomi
  - b. Neurofibromi
  - c. Perineuriomi
  - d. Maligni tumori perifernih nerava (MPNST)
  
- 3) Tumori moždanih ovojnica (meningealni tumori)**
  - a. Meningiomi
  - b. Mezenhimalni tumori
  - c. Primarne melanocitne lezije
  - d. Ostale meningealne neoplazme
  
- 4) Limfomi i ostali tumori hematopoetskog tkiva**
  - a. Maligni limfomi
  - b. Plazmacitomi
  - c. Granulocitni sarkomi

**5) Tumori embrionalnih ćelija**

- a. Germinomi
- b. Embrionalni karcinomi
- c. Tumori žumancetne kese
- d. Horiokarcinomi
- e. Teratomi
- f. Mešoviti tumori germinativnih ćelija

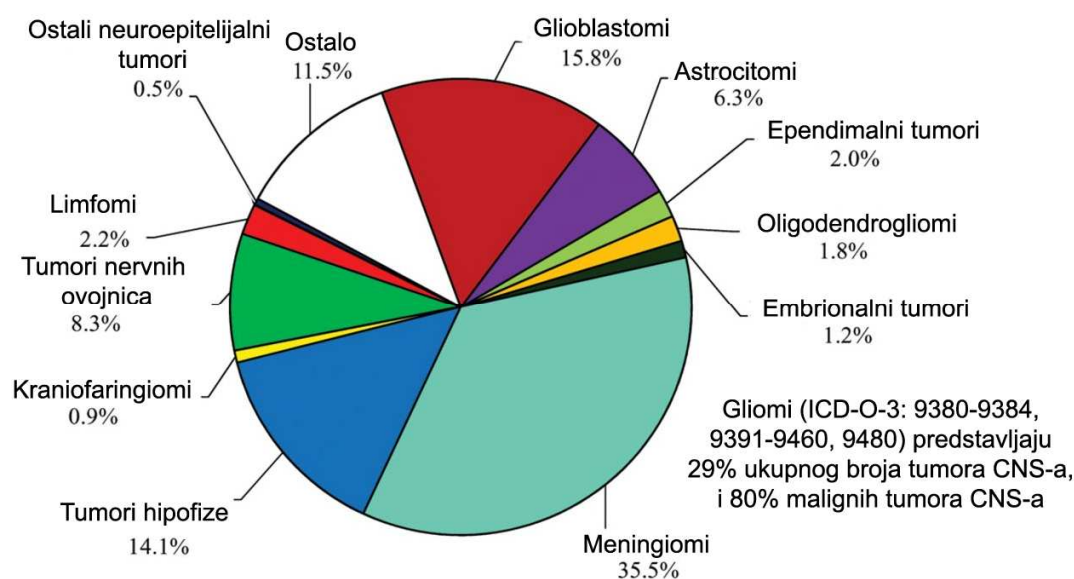
**6) Tumori područja turskog sedla**

- a. Kraniofaringiomi
- b. Tumori granularnih ćelija
- c. Pituicitomi
- d. Onkocitomi adenohipofize

**7) Metastatski tumori**

Iako tumori CNS-a ne spadaju među najfrekventnije tipove tumora (oko 2% ukupnog broja tumora), zbog visoke stope smrtnosti obolelih spadaju među najagresivnije jer učestvuju sa 7% u ukupnoj smrtnosti od kancera. Prema statističkim podacima, godišnje se registruje 20 novih slučajeva obolelih na svakih 100.000 ljudi, od čega 7,3 malignih (Dolecek i saradnici, 2012). U svetu je, tokom 2008. godine zabeleženo oko 445.000 obolelih i 175.000 umrlih od posledica tumora CNS-a. U okviru ove heterogene grupe tumora, benigni meningiomi predstavljaju najzastupljeniju kategoriju, sa više od 35% zabeleženih slučajeva. Na drugom mestu po učestalosti su maligni gliomi, koji čine oko 30% svih tumora CNS-a, a 80% malignih tumora CNS-a (slika 13).

Tumori CNS-a se mogu klasifikovati i prema međunarodnoj klasifikaciji onkoloških bolesti (engl. The International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O-3)), pri čemu kodovi 0,1 i 3 označavaju benigne, prelazne i maligne tumore. Prema ovoj klasifikaciji tumori CNS-a formiraju kategorije 9380 – 9589.



**Slika 13.** Zastupljenost različitih tipova tumora centralnog nervnog sistema. Distribucija je određena na osnovu uzorka veličine  $n=311.302$ . Meningiomi su najzastupljeniji (35%), dok su gliomi na drugom mestu čineći 29% ukupnog broja tumora CNS-a. (Preuzeto i modifikovano od Dolecek i saradnika, 2012).

Histopatološka klasifikacija tumora se zasniva na promenama u morfoloiji ćelija tumora u odnosu na normalno tkivo, uključujući razlike u veličini i obliku nukleusa, kao i zastupljenost ćelija u deobi. Na osnovu mikroskopskog pregleda patolozi klasifikuju tumore u pet grupa:

- Gx - nije moguće odrediti gradus tumora
- G1 - dobro diferencirane ćelije
- G2 - umereno diferencirane ćelije
- G3 - slabo diferencirane ćelije
- G4 - nediferencirane ćelije

Tumori koji su svrstani u grupu G3 i G4 imaju tendenciju bržeg rasta i širenja u odnosu na tumore iz grupe G1 ili G2. Klasifikacija prema gradusima je tumor-specifična i veoma značajna za pravilnu terapiju i prognozu. Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO) tumori mozga se klasifikuju u graduse sledećih karakteristika:

**WHO gradus I** – lezije niskog proliferativnog potencijala, ćelije skoro normalnog izgleda, hrurško odstanjivanje dovodi do potpunog izlječenja – benigni tumor

**WHO gradus II** – lezije slabe mitotske aktivnosti, ali imaju sposobnost infiltracije okolnog tkiva i progresije u tumore viših gradusa.

**WHO gradus III** – maligne lezije povećane mitotičke aktivnosti, ćelije su promjenjene, anaplastične i imaju sposobnost invazije okolnih tkiva

**WHO grade IV** – lezije sa izraženom mitotičkom aktivnošću, tumor raste brzo, šireći se u okolne regione, izražena je angiogeneza, u centru tumora su prisutni nekrotični regioni.

Prosečna petogodišnja stopa preživljavanja pacijenata iznosi 33,8%, međutim postoje izražene varijacije usled histoloških razlika, od 94% u slučaju pilocitičnih astrocitoma, do manje od 5% u slučaju glioblastoma (Dolecek i Propp, 2012). Na stopu preživljavanja negativno utiče viši gradus tumora, kao i veća starost pacijenata prilikom prve dijagnoze.

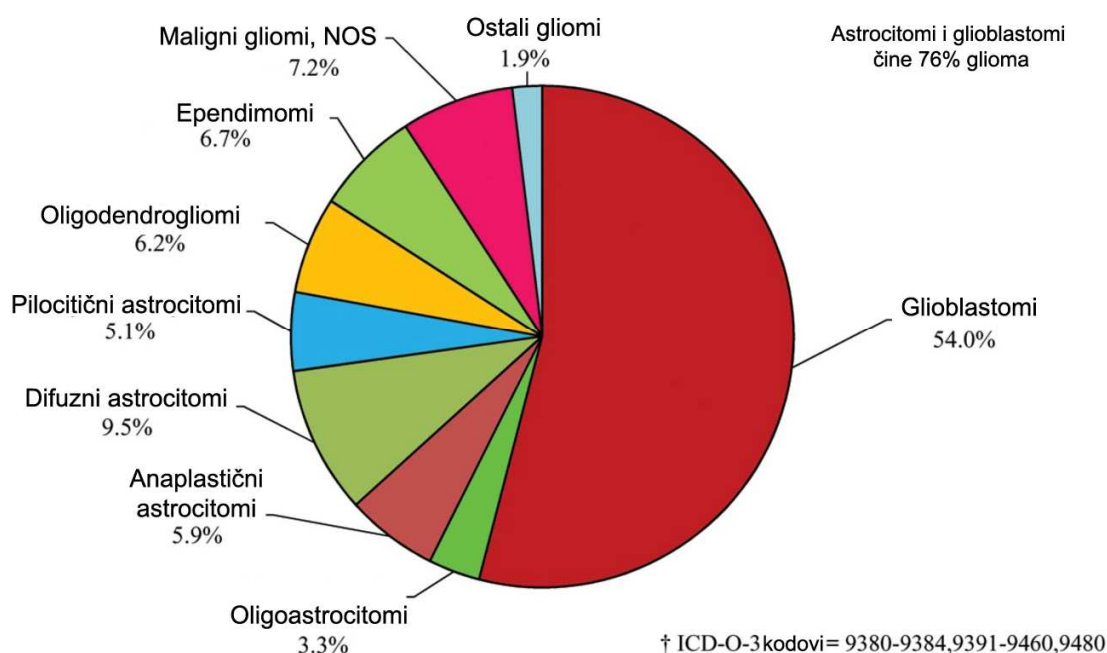
#### 1.4.1 Gliomi – karakteristike i podela

Gliomi predstavljaju brojnu grupu neuroektodermalnih tumora, vode poreklo od glijalnih ćelija i čine preko 80% svih tumora mozga (Kleihues i Sobin, 2000). Detaljnija histopatološka klasifikacija glioma se zasniva na morfološkim kriterijumima i stepenu diferencijacije ćelija, kao i izgledu nukleusa, mitotičkoj aktivnosti, proliferaciji ćelija endotela i stepenu nekroze (Furnari i saradnici, 2007). Na osnovu tipa ćelija iz kojih se razvijaju, u okviru glioma razlikujemo astrocitome, oligodendrogliome, oligoastrocitome i ependimome, koji se prema WHO kriterijumima, dalje klasifikuju prema stupenu malignosti u graduse I-IV (slika 14).

WHO II	Astroцитomi (3-10 godina; ? %)	Oligoastroцитomi (5-12 godina; ? %)	Oligodendrogliomi (8-20 godina; ? %)
WHO III	Anaplastični astroцитomi (2-5 godina; 10-30%)	Anaplastični oligoastroцитomi (2-8 godina, 20-60%)	Anaplastični oligodendrogliomi (2-10 godina; 40-80 %)
WHO IV	Glioblastomi (1-2 godine; 10%)		

**Slika 14.** WHO klasifikacija glioma. Na levoj strani su označeni WHO gradusi. Ispod svako tipa tumora je navedeno prosečno preživljavanje i frekvencija odgovora na terapiju. (Preuzeto i modifikovano od Louis i saradnika, 2001).

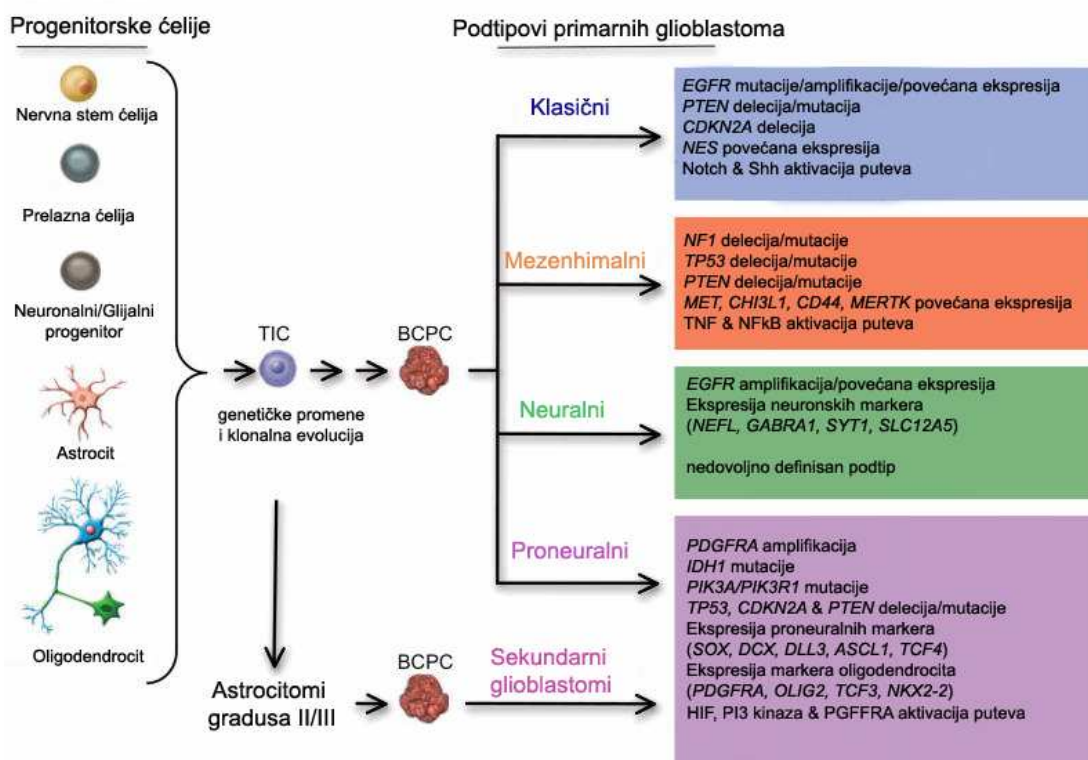
Niskogradusni gliomi obuhvataju tumore gradusa I i II (difuzni), uključujući astrocitome, oligoastrocitome i oligodendrogliome. U grupu visokogradusnih glioma spadaju tumori gradusa III i IV, tj. anaplastični astrocitomi, anaplastični oligoastrocitomi, anaplastični oligodendrogliomi i glioblastomi (Louis i saradnici, 2001). Preko 76% glioma čine astrocitomi, od kojih su najbrojniji astrocitomi gradusa IV – glioblastomi (GBM) (slika 15). Iako imaju identičnu histološku sliku, glioblastomi se razlikuju po mehanizmu formiranja i genetičkim promenama, i mogu biti primarni, koji nastaju *de novo*, i sekundarni koji su manje zastupljeni u populaciji (10% GBM), nastaju progresijom iz astrocitoma nižih gradusa i javljaju se kod pacijenata mlađih od 45 godina. Primarni glioblastomi se javljaju kod starijih pacijenata. Ovo su izuzetno agresivni i veoma invazivni tumori, što potvrđuje podatak da dve trećine pacijenata ima kliničku istoriju kraću od 3 meseca (Ohgaki i saradnici, 2004).



**Slika 15.** Zastupljenost podtipova glioma. Distribucija je određena na osnovu uzorka veličine  $n=90.828$ . Najbrojniju kategoriju čine glioblastomi (astrocitomi gradusa IV), koji zajedno sa astrocitomima gradusa II i III čine 76% glioma. (Preuzeto i modifikovano od Dolecek i saradnika, 2012).

Iako se histopatološka klasifikacija tumora i dalje primenjuje za postavljanje dijagnoze i određivanje terapije, ovaj subjektivni metod ne omogućava preciznu predikciju ponašanja tumora, odgovora na terapiju i preživljavanja pacijenata (Louis i Holland, 2001). Takođe, na osnovu histopatoloških kriterijuma nije moguće razdvojiti primarne i sekundarne glioblastome. Proučavanjem genetičke osnove nastanka i progresije glioma dobijeni su brojni podaci o specifičnim genetičkim promenama karakterističnim za ove malignitete. Pored toga, poznavanje osnovnih genetičkih promena je omogućilo primenu adekvatnih metoda za dijagnostiku ovih oboljenja, kao i ciljanih terapeutika za njihovo lečenje. Do sada su utvrđene promene u broju kopija gena i hromozoma (delecije i amplifikacije), kao i određene tačkaste mutacije, na osnovu kojih su identifikovani brojni onkogeni i tumor supresor geni karakteristični za inicijaciju i progresiju različitih podtipova glioma (Dahlback i saradnici, 2009). Metodološki razvoj i primena mikroereja (engl. microarray) su omogućili proučavanje ekspresije velikog broja gena, i primenu dobijenih transkripcionih profila za integrisanu molekularnu klasifikaciju tumora i predikciju odgovora na terapiju. Ovakav pristup je pokazao da svaki analizirani tumor ima jedinstven ekspresioni profil, te da se mora težiti personalizovanom pristupu u lečenju pacijenata. Na osnovu rezultata projekta Atlas genoma kancera - TCGA (engl. The Cancer Genome Atlas), zasnovanog na ideji molekularnog pristupa u terapiji kancera, izvršena je dalja podela primarnih glioblastoma na klasični, mezenhimalni, neuralni i proneuralni podtip (slika 16) (Van Meir i saradnici, 2010). Svaki od navedenih podtipova se karakteriše odgovarajućim setom genetičkih promena, što dovodi do različitih odgovora na terapiju, koja se prema tome mora prilagoditi.





**Slika 16.** Podela glioblastoma prema genetičkim mehanizmima patogeneze. Ćelije iz kojih nastaje tumor, TIC (engl. tumor-initiating cells), nastaju od normalnih moždanih ćelija pod uticajem genetičkih promena. Dalja akumulacija genetičkih i epigenetičkih alteracija dovodi do transformacije TIC u propagirajuće ćelije, BCPC (engl. brain cancer propagating cells) prekursore glioblastoma. Na osnovu genetičkih promena razlikujemo četiri podtipa primarnih glioblastoma. (Preuzeto i modifikovano od Van Meir i saradnika, 2010)

Stope preživljavanja pacijenata obolelih od malignih glioma su veoma niske, bez obzira na značajan napredak u dijagnostici i terapiji tokom prethodnih decenija, koji je doveo do povećanja preživljavanja pacijenata sa skoro svim ostalim tipovima tumora. Prognoza je lošija za visokogradusne tumore i starije pacijente. Najveću stopu preživljavanja imaju pacijenti sa tumorima gradusa II koji žive, u proseku, 5-8 godina, zatim pacijenti sa anaplastičnim astrocitomima (prosečno 3 godine), dok je u slučaju glioblastoma prosečno preživljavanje 12-18 meseci (Gladson i saradnici, 2010). Standardno lečenje glioblastoma podrazumeva hirurško uklanjanje tumora, praćeno radioterapijom i hemioterapijom DNK alkilujućim agensima (temozolomidom) (Stupp i saradnici, 2005). Na osnovu rezultata brojnih epidemioloških studija utvrđeno je da povećan rizik za razvoj ove bolesti imaju starije osobe muškog pola kavkaske rase (Bondy i Wrensch, 1996). Pretpostavlja se da pojedini spoljašnji činioci dovode do povećanja rizika za nastanak glioma, ali još uvek nisu identifikovani pouzdani markeri. U faktore rizika spadaju nikotin, konzumiranje alkohola i

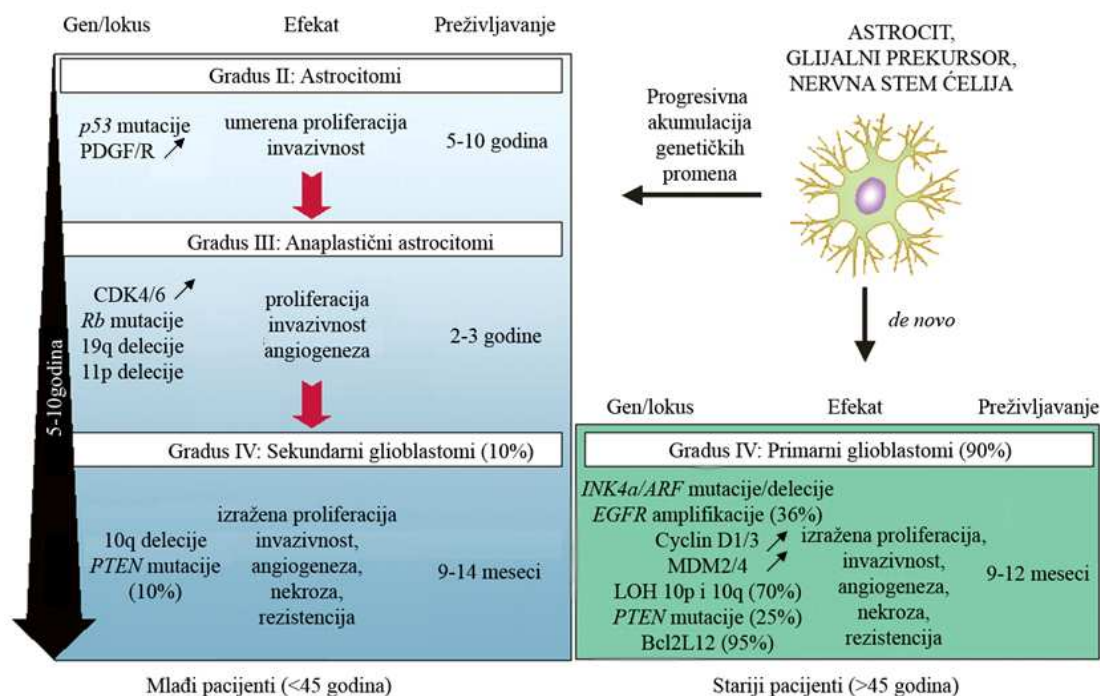
kafe, izloženost infekcijama (polioma i citomegalo virusi, influenza, Varicella Zoster, *Toxoplasma gondii*), pojedini vitamini (vitamin C, vitamin D<sub>3</sub>), kozmetički proizvodi (proizvodi za bojenje i ispravljanje kose), industrijski agensi (proivodnja gume, benzina,...), mobilni telefoni, elektromagnetno zračenje, kao i različiti genski polimorfizmi (Efird, 2011).

#### 1.4.2 Gliomi – molekularni mehanizmi nastanka

Gliomi, kao i ostali tumori, nastaju usled akumulacije genetičkih promena (tačkaste mutacije, translokacije, amplifikacije i delecije) i epigenetičkih modifikacija, koje menjaju fenotip ćelija i utiču na regulaciju brojnih signalnih puteva. Iako nije moguće definisati tačan broj i redosled promena tokom kancerogeneze, zahvaljujući projektu TCGA, identifikovani su ključni geni odgovorni za nastanak i progresiju glioma (slika 17). Brojne razlike u genetičkim promenama, čak i u okviru istog gradusa glioma, uklazuju na izraženu heterogenost tumora, koja je prisutna i u okviru različitih regiona pojedinačnih tumora, što je posebno izraženo u hipoksičnim regionima i regionima prekida krvno-moždane barijere (Gladson i Prayson, 2010). Za oligodendrogliome gradusa II i anaplastične oligodendrogliome gradusa III je karakterističan gubitak heterozigonosti (LOH) hromozoma 1p i 19q, koji se javlja u 40% do 90% slučajeva i predstavlja pozitivan prognostički faktor, kao i inaktivacija *PTEN* gena, metilacijom promotora (Louis, 2006).

Amplifikacija *PDGFRα* se javlja u oko 7% ovih tumora (Smith i saradnici, 2000). Najčešća promena u genomima astrocitoma gradusa II je amplifikacija *PDGFRα* i *PDGFRβ* gena (3-33% slučajeva), kao i gubitak *p53* gena (Louis, 2006). Anaplastične astrocitome (gradus III) karakteriše gubitak *Rb* gena koji se javlja u oko 30% ovih tumora usled delecije hromozoma 13q13, i inaktivacija tumor supresora *p16<sup>INK4A</sup>/CDKN2A*, detektovana u oko 50% uzoraka. Mutacije *p53* gena su zastupljene sa istom frekvencijom, dok je amplifikacija *MDM2* gena detektovana u 13% do 43%. (Reifenberger i saradnici, 1993).

Gubitak hromozoma 22q i amplifikacija 7q regiona su prisutni kod 20% anaplastičnih astrocitoma, ali još uvek nisu poznati geni koji se nalaze u ovim regionima, kao ni uloga ovih hromozomskih aberacija (Ino i saradnici, 1999, Schrock i saradnici, 1996).



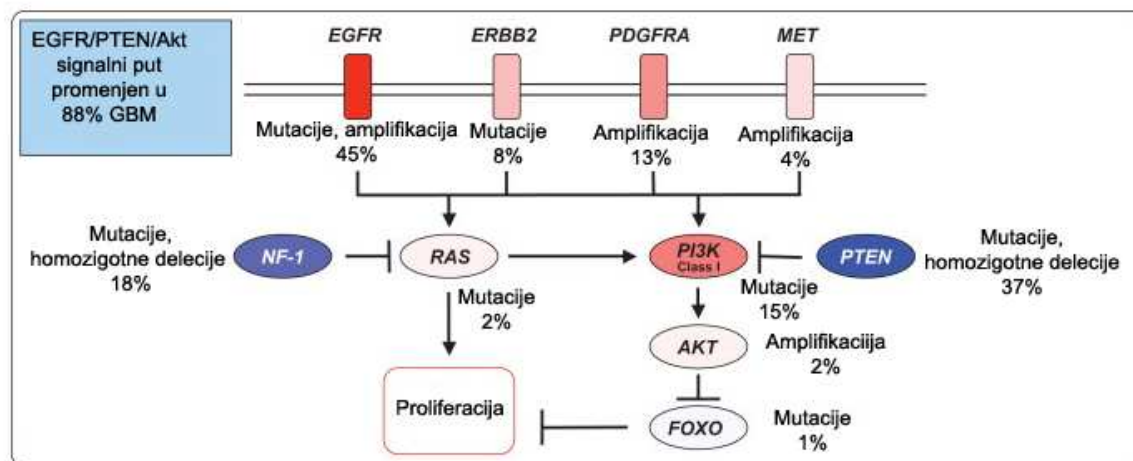
**Slika 17.** Genetičke promene koje dovode do nastanka glioblastoma. Šematski prikaz preživljavanja pacijenata, fenotipa tumora i genetičkih alteracija tokom nastanka primarnih (*de novo*) i sekundarnih glioblastoma. Iako su histološki identični, ova dva podtipa GBM pogađaju različite starosne kategorije i imaju različite mehanizme nastanka. (Preuzeto i modifikovano od Furnari i saradnika, 2007).

Najčešće promenjeni geni u genomima glioblastoma su *p53* (40%), *EGFR* (37%) i *PTEN* (30%). Genetičke promene karakteristične za primarne i sekundarne glioblastome se međusobno razlikuju, jer ova dva tipa GBM imaju različite mehanizme nastanka (Ohgaki i Kleihues, 2007). Amplifikacija *EGFR*-a i LOH 10q regiona na kome se nalazi *PTEN* tumor supresor, predstavljaju ključne promene u genomima primarnih glioblastoma, dok su mutacije *p53* gena osnovna karakteristika sekundarnih glioblastoma (Gladson i Prayson, 2010). Pored navedenih promena, prema rezultatima studije iz 2008. godine identifikovana je specifična mutacija u aktivnom centru izocitrat dehidrogenaze 1 (*IDH1*) karakteristična za sekundarne glioblastome (Parsons i saradnici, 2008) Hipermetilacija promotora *MGMT* gena se javlja i u primarnim (36%) i u sekundarnim (75%) GBM i predstavlja pozitivan prognostički faktor u terapiji temozolomidom (Hegi i saradnici, 2005). Pored promena u pojedinačnim genima, izražena genomska nestabilnost, a naročito CIN, predstavlja jednu od glavnih karakteristika GBM. Delecije zahvataju skoro sve hromosome, a najčešće 1p, 6q, 9p, 10p, 10q, 13q, 14q, 15q, 17p, 18q, 19q, 22q i Y hromozom (Kanu i saradnici, 2009).

Gubitak heterozigotnosti (LOH) hromozoma 10 predstavlja najfrekventniju genetičku promenu koja se javlja sa podjednakom učestalošću (60-80%) u oba tipa GBM, što ukazuje na prisustvo brojnih tumor supresora u ovom regionu (Karlsson i saradnici, 1993). Neke od navedenih genetičkih promena direktno dovode do progresije glioma, dok druge povećavaju genomsku nestabilnost utičući na procese popravke DNK oštećenja, DNK replikaciju i razdvajanje hromozoma tokom ćelijske deobe.

### 1.4.2.1 EGFR/PTEN/Akt/mTOR signalni put

EGFR/PTEN/Akt/mTOR signalni put ima ključnu ulogu u razvoju primarnih glioblastoma. (Kita i saradnici, 2007). Konstitutivnom aktivacijom PI3K i MAPK mitogenih signalnih puteva obezbeđuje se autonomna proliferacija nezavisna od spoljašnjih faktora rasta, što predstavlja jednu od osnovnih karakteristika maligne ćelije (slika 18) (Hanahan i Weinberg, 2011). Povećana ekspresija *EGFR*-a je detektovana kod više od 60% primarnih, i manje od 10% sekundarnih GBM (Biernat i saradnici, 2004). Pored amplifikacija, određene mutacije, od kojih su najfrekventnije zastupljene delecije egzona 2-7 (*EGFRvIII*), dovode do konstitutivne aktivacije *EGFR*-a i aktivacije PI3K/Akt signalnog puta (Mellinghoff i saradnici, 2005).

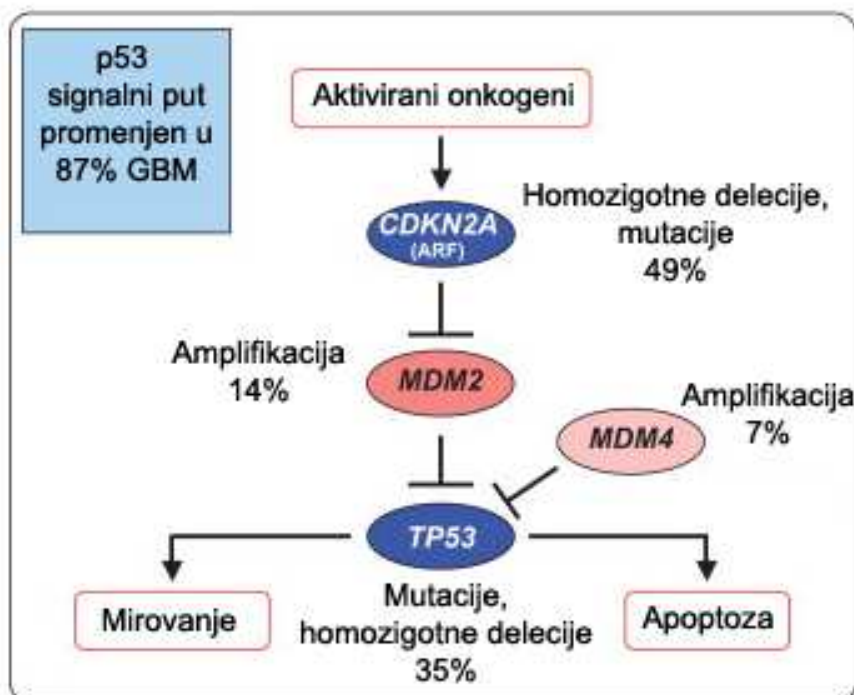


**Slika 18.** Najčešće promene EGFR/PTEN/Akt signalnog puta u gliomima. Crvenom bojom su označene aktivirajuće, a plavom inaktivirajuće promene koje dovode do gubitka funkcije. Pored svakog učesnika signalne kaskade su navedeni mehanizmi i frekvencije promena karakterističnih za gliome. U 88% glioblastoma su detektovane promene bar jednog gena iz ovog signalnog puta. (Preuzeto i modifikovano od Van Meir i saradnika, 2010).

Zbog svoje uloge u promovisanju ćelijske proliferacije, EGFR ima značajan doprinos u patogenezi glioma, i predstavlja primarni cilj molekul za terapiju različitim inhibitorima. Odgovor na terapiju EGFR kinaznim inhibitorima zavisi od statusa *PTEN*-a. Inaktivacija ovog tumor supresora je karakteristična za primarne glioblastome, kod kojih dovodi do rezistencije na EGFR kinazne inhibitore (Mellinghoff i Wang, 2005). Homozigotne delecije *PTEN* gena se retko javljaju, za razliku od metilacije promotora, LOH-ova i tačkastih mutacija, malih insercija i delecija, koji predstavljaju osnovne mehanizme njegove inaktivacije (Ohgaki i Dessen, 2004). PI3K aktivira oba kompleksa serin/treonin kinaze mTOR (mTORC1 i mTORC2), što pozitivno reguliše ćelijski rast, proliferaciju i preživljavanje i podstiče razvoj glioma (Akhavan i saradnici, 2010). Iako su rezultati prekliničkih ispitivanja pojedinih inhibitora mTOR-a, naročito rapamicina, pokazali njihov efekat u indukciji apoptoze, zaustavljanju ćelijskog ciklusa i smanjenju angiogeneze, njihova primena je izostala usled plastičnosti tumorskih ćelija i alternativnih mehanizama aktivacije preostalih signalnih puteva, kao što je MAPK (Carracedo i saradnici, 2008).

#### 1.4.2.2 p53/MDM2/p14<sup>ARF</sup> signalni put

Inaktivacija p53 tumor supresora predstavlja rani događaj u nastanku sekundarnih glioblastoma (Louis, 1994). Značaj p53 u nastanku glioma potvrđen je povećanom frekvencijom pojave ovih tumora kod pacijenata sa Li-Fraumeni sindromom, uzrokovanim naslednim mutacijama u *p53* genu (Malkin i saradnici, 1990). Do inaktivacije *p53* gena u gliomima dolazi usled tačkastih mutacija koje pogađaju DNK vezujući domen ili zbog gubitka heterozigotnosti hromozoma 17p. Ovaj tumor supresor je inaktiviran kod više od dve trećine sekundarnih GBM, kod kojih se 57% mutacija nalazi u kodonima 248 i 273, u poređenju sa primarnim GBM kod kojih se mutacije javljaju sa manjom učestalošću (<30%) i uniformnijom distribucijom u svim egzonima (Ohgaki i Dessen, 2004). Povećana ekspresija negativnih regulatora p53, MDM2 i MDM4, predstavlja alternativni mehanizam inaktivacije ovog tumor supresora u primarnim GBM sa intaktnim *p53* (slika 19).



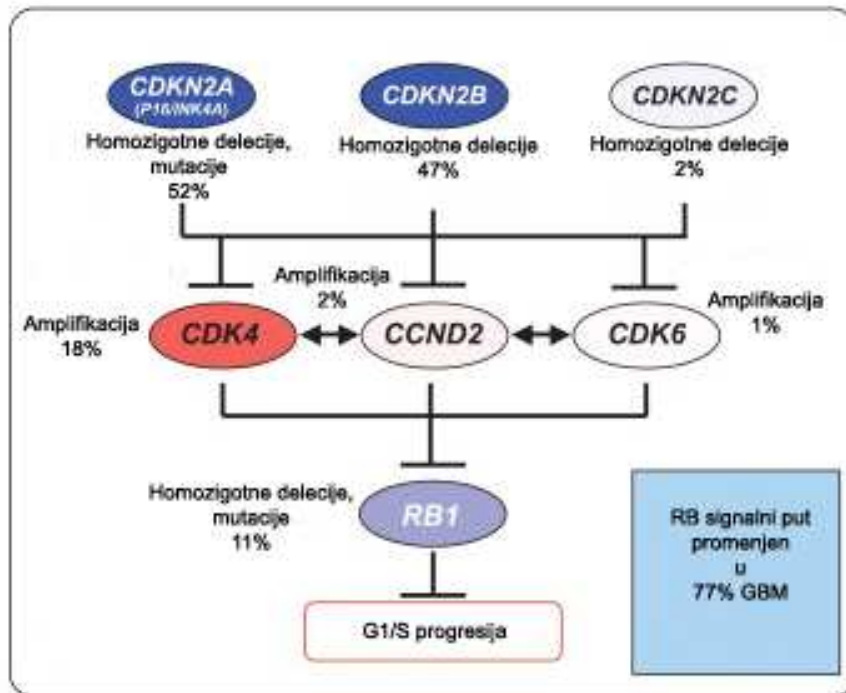
**Slika 19.** Najčešće promene p53 signalnog puta u gliomima. Crvenom bojom su označene aktivirajuće, a plavom inaktivirajuće promene koje dovode do gubitka funkcije. Pored svakog učesnika signalne kaskade su navedeni mehanizami i frekvencije promena karakterističnih za gliome. U 87% glioblastoma su detektovane promene bar jednog gena iz ovog signalnog puta. (Preuzeto i modifikovano od Van Meir i saradnika, 2010).

Smanjena ekspresija  $p14^{ARF}$  gena izazvana homozigotnim delecijama ili metilacijom promotora, se javlja u 76% uzoraka glioblastoma, sa podjednakom zastupljenošću u oba tipa (Nakamura i saradnici, 2001). Aberantna regulacija p53 signalnog puta dovodi do poremećaja u regulaciji ćelijskog ciklusa, odgovora ćelija na oštećenja DNK, apoptoze, diferencijacije i neovaskularizacije (Bogler i saradnici, 1995).

#### 1.4.2.3 $p16^{INK4a}$ /RB1 signalni put

Pored p53 mreže, i RB signalni put ima veoma važnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa, kontrolišući prelazak iz G1 u S fazu, a njegova inaktivacija dovodi do progresije i primarnih i sekundarnih glioblastoma. Ovaj put formiraju CDKN (ciklin zavisni kinazni inhibitori), ciklin-zavisne protein kinaze CDK4 i CDK6, E2F familija transkripcionih faktora i članovi RB-familije: RB, p107, p130 (Knudsen i Wang, 2010).





**Slika 20.** Najčešće promene RB signalnog puta u gliomima. Crvenom bojom su označene aktivirajuće, a plavom inaktivirajuće promene koje dovode do gubitka funkcije. Pored svakog učesnika signalne kaskade su navedeni mehanizami i frekvencije promena karakterističnih za gliome. U 77% glioblastoma su detektovane promene bar jednog gena iz ovog signalnog puta. (Preuzeto i modifikovano od Van Meir i saradnika, 2010).

Iako promene u ekspresiji svakog od navedenih proteina imaju značajan uticaj na proces kancerogeneze jer dovode do poremećaja u signalnoj kaskadi, najčešće su pogođeni *Rb1*, *p16<sup>INK4a</sup>* i *CDK4* geni (slika 20). Smanjena ekspresija *Rb1* gena, karakteristična za astroцитome viših gradusa, predstavlja kasni događaj tokom progresije ovih tumora (Biernat i saradnici, 1997). Pored mutacija *Rb1* gena koje su prisutne u oko 25% uzoraka astroцитoma viših gradusa, gubitak 13q hromozoma i metilacija promotora dovode do inaktivacije ovog gena (Ohgaki i Kleihues, 2007). Do gubitka aktivnosti RB proteina dovodi i inaktivacija *p16<sup>INK4a</sup>*, usled homozigotnih delecija i metilacije promotora. Delecije INK4a/ARF lokusa, na kome se nalazi ovaj tumor supresor, zajedno sa *p14<sup>ARF</sup>* genom, su prisutne kod preko 50% malignih glioma gde dovode do poremećaja u regulaciji kako RB, tako i p53 signalnog puta. Značaj inaktivacije RB signalnog puta za nastanak glioma je evidentan, iako samo ovaj događaj nije dovoljan za transformaciju ćelija, što ukazuje na prisustvo kompleksne mreže signalnih puteva koji učestvuju u regulaciji ćelijskog ciklusa (Xiao i saradnici, 2002).

Naznačene kompleksne interakcije koje se uspostavljaju tokom kancerogeneze, kao i izražena intra- i inter-tumorska heterogenost, predstavljaju nepremostivu barijeru za uspešnu prevenciju, dijagnostiku i terapiju glioma. Razjašnjenje složenih molekularnih mehanizama koji dovode do nastanka i progresije tumora mozga glijalnog porekla predstavlja preduslov za uspešniji terapijski pristup. Genetičkom analizom tumora mozga različitih gradusa mogu se detektovati promene karakteristične za odgovarajuće faze tumorigeneze, kao i njihov uticaj na preživljavanje pacijenata. Takođe, na ovaj način se mogu identifikovati potencijalni molekularni biomarkeri za dijagnostiku, terapiju i prognozu ovog oboljenja. Bolje poznavanje promena u genomima ćelija kancera različitih gradusa bi omogućilo precizniju identifikaciju razlika u mehanizmima nastanka primarnih i sekundarnih glioblastoma, kao i njihovu lakšu dijagnostiku. Pored ovoga, identifikacija novih gena uključenih u specifične faze procesa evolucije glioma, može imati veliki značaj za preciznije objašnjenje redosleda događaja tokom inicijacije, promocije i progresije glioma.



## 2 Ciljevi

Osnovni cilj ove doktorske disertacije je molekularna karakterizacija glioma i identifikacija potencijalnih markera promocije, progresije i prognoze bolesti. Da bi se to realizovalo postavljeni su sledeći zadaci:

1. Odrediti stepen ukupne, hromozomske i mikrosatelitske genomske nestabilnosti u uzorcima 30 pacijenata obolelih od tumora mozga glijalnog porekla.
2. Identifikovati nove gene odgovorne za nastanak i progresiju glioma analizom razlika između AP-PCR DNK profila tumorskog i zdravog tkiva.
3. Analizirati promene u *p53*, *PTEN*, *p16* i *EGFR* genima i to:
  - a. mutacioni status i gubitak heterozigotnosti *p53* tumor supresor gena
  - b. gubitak heterozigotnosti *PTEN* tumor supresor gena
  - c. gubitak heterozigotnosti i prisustvo homozigotnih delecija *p16* tumor supresor gena
  - d. amplifikacioni status *EGFR* onkogen.
4. Utvrditi doprinos alteracija identifikovanih i analiziranih gena u inicijaciji, promociji i progresiji primarnih i sekundarnih glioblastoma, korelacijom učestalosti detektovanih promena sa histopatološkim parametrima i stepenom genomske nestabilnosti.
5. Ispitati međusobnu povezanost promena u identifikovanim i analiziranim genima.
6. Odrediti uticaj analiziranih genetičkih promena na preživljavanje pacijenata i utvrditi da li neki od analiziranih gena može da predstavlja potencijalni molekularni marker za dijagnostiku i prognozu ovog oboljenja.

### 3 MATERIJAL I METODE

#### 3.1 *Uzorci tkiva*

Uzorci tumorskog tkiva i krvi za potrebe izrade ove disertacije su prikupljeni od 30 pacijenata kojima je prvi put dijagnostikovano i hirurškim putem odstranjen primarni tumor mozga glijalnog porekla. Svi pacijenti su operisani na Klinici za neurohirurgiju Kliničkog centra Srbije. Uzorci su zamrzavani u tečnom azotu neposredno po hirurškoj intervenciji, gde su i čuvani do izolacije DNK. Uzorci su sakupljeni i analizirani nakon dobijanja dozvole Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije i pisane saglasnosti pacijenata, a u skladu sa etičkim standardima Helsinške deklaracije donete 1964. godine. Histopatološka klasifikacija svih 30 uzoraka tumora je izvršena po kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije (engl. World Health Organization, WHO) iz 2007. godine (Louis i Ohgaki, 2007).

Na osnovu dobijenih nalaza kod 8 pacijenta je postavljena dijagnoza „anaplastični astrocitom gradusa III“, dok je kod preostalih 22 pacijenta dijagnostikovano „glioblastom multiforme gradusa IV“. Od 30 pacijenata uključenih u studiju, 19 su bili muškog, a 11 ženskog pola. Prosečna starost pacijenata u trenutku operacije je bila 56,9 godina, pri čemu je najmlađi pacijent imao 20, a najstariji 84 godine. Pregledi kliničkopatoloških parametara svakog pacijenta kao i njihova sveukupna distribucija dati su u tabeli 1. Prosečno preživljavanje pacijenata je 11 meseci po operaciji. Ni jedan pacijent nije primio ni radioterapiju ni hemioterapiju pre operacije.

**Tabela 1.** Pregled kliničkopatoloških parametara 30 pacijenata obolelih od glioma

Redni broj	Oznaka pacijenta	Godine	Pol	Histopatološki podtip	Gradus	Pušački status
1	1	62	M	GBM	IV	Ne
2	2	66	M	GBM	IV	Da
3	6	59	M	GBM	IV	
4	8	30	Ž	AA	III	
5	11	60	M	GBM	IV	Da
6	22	20	Ž	AA	III	Ne
7	25	51	Ž	GBM	IV	Ne
8	27	47	Ž	AA	III	Da
9	30	63	M	GBM	IV	Da
10	32	71	Ž	GBM	IV	Ne
11	34	60	M	GBM	IV	
12	35	75	Ž	GBM	IV	Ne
13	38	63	M	GBM	IV	
14	40	55	M	AA	III	Da
15	41	56	M	GBM	IV	
16	42	50	M	AA	III	Ne
17	45	60	Ž	GBM	IV	Ne
18	46	64	M	AA	III	Da
19	52	54	M	GBM	IV	Ne
20	53	51	M	GBM	IV	Ne
21	54	38	Ž	AA	III	
22	55	84	M	GBM	IV	Ne
23	59	58	M	GBM	IV	Da
24	82	57	M	GBM	IV	Da
25	83	71	M	GBM	IV	Ne
26	84	59	Ž	GBM	IV	
27	85	71	M	AA	III	
28	86	48	Ž	GBM	IV	
29	87	41	M	GBM	IV	
30	89	64	Ž	GBM	IV	Ne

M-muški pol, Ž-ženski pol, GBM-glioblastoma multiforme, AA-anaplastični astrocitom

## **3.2 Izolacija nukleinskih kiselina**

### **3.2.1 Izolacija genomske DNK iz tumorskog tkiva**

Genomska DNK je izolovana iz tumorskog tkiva, kao i iz kontrolnih uzoraka krvi svih 30 pacijenta po proceduri koju su opisali Sambrook i saradnici (1989). Postupak izolacije se sastoji iz sledećih koraka:

#### **DANI**

- Iseći do 100mg tkiva, pri čemu se ceo postupak obavlja što brže i na ledu.
- 100 mg tkiva lizirati u 1,2 ml digestionog pufera (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA pH=8) . Smešu homogenizovati staklenim štapićem.

- U resuspendovano tkivo dodati finalno 0,5% SDS-a i 0,15 mg/ml proteinaze K i inkubirati preko noći na temperaturi od 50°C.

## DAN II

- Dodati istu količinu proteinaze K, kao i prethodnog dana i inkubirati 1h na temperaturi od 50°C uz mešanje
- Ekstrakcija DNK započinje dodavanjem smeše fenol/hloroform/izoamil-alkohol u odnosu 25:24:1 u zapremini u kojoj je dodat digestioni pufer prethodnog dana.
- Celokupnu smešu inkubirati 20 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirati na 10000rpm 10 minuta. Pažljivo odvojiti gornju (vodenu) fazu u nove tube i postupak ekstrakcije ponoviti još 2 puta.
- Ceo postupak ponoviti sa smešom hloroform/izoamilalkohol (24:1). Smeša se dodaje u zapremini izvađene vodene faze.
- Centrifugirati na 10000 rpm 10 minuta, potom odvojiti gornju fazu u novu tubu i izmeriti njenu zapreminu.
- Dodati RNA-zu A u finalnoj koncentraciji 100 µg/ml finalno i inkubirati 1h na 37 °C.
- Dodati proteinazu K u finalnoj koncentraciji 0,1 mg/ml i inkubirati još 1h na 37 °C.
- Ponoviti organsku ekstrakciju prvo sa smešom fenol/hloroform/izoamilalkohol (25:24:1), a potom i sa smešom hloroform/izoamilalkohol (24:1). Obe smeše se dodaju u zapremini izdvojene vodene faze.
- Odvojiti vodenu fazu u novu tubu.
- Precipitacija DNK se vrši istovremenim dodavanjem 30% zapremine 3M natrijum acetata i 2 zapremine 100% etanola, uz lagano mešanje dok se ne pojave končići DNK. Ovako ekstrahovana DNK može se neograničeno dugo čuvati na -20 °C. Umesto 30% zapremine 3M natrijum acetata može se koristiti i ½ zapremine 7,5 M amonijum-acetata.
- Staklenim stapićem izvaditi DNK, isprati je u 70% etanolu i rastvoriti u autoklaviranoj dejonizovanoj vodi ili TE puferu.
- Koncentracija potpuno rastvorene DNK se određuje spektrofotometrijski (Biophotometer, Eppendorf, Nemačka).

### 3.2.2 Izolacija genomske DNK iz krvi

Izolacija DNK iz krvi pacijenata vrši se po proceduri koju su opisali Sambrook i saradnici (1989) i sastoji se iz sledećih koraka:

#### DAN I

1. Epruvete u kojima je smeša krvi i antikoagulansa ( $K_3EDTA$ ) energično promešati okretanjem nekoliko puta.
2. U 3ml smeše krvi i antikoagulansa dodati 3 ml autoklaviranog TE pufera (10mM Tris HCl i 1mM EDTA pH=8).
3. Centrifugirati na 10000 rpm 2 minuta.
4. Pažljivo odlići supernatant, a talog resuspendovati u 3 ml TE pufera.
5. Ponoviti ispiranje ( koraci 3 i 4) sve dok talog ne postane beo (4-6 puta).
6. Talog resuspendovati u 1350  $\mu$ l TE pufera i izmešati na vorteks aparatu.
7. Dodati SDS u finalnoj koncentraciji 2% i snažno promešati.
8. Dodati 0,15 mg/ml proteinaze K i promućkati.
9. Inkubirati 2h na temperaturi od 56°C, pa preko noći na 37°C.

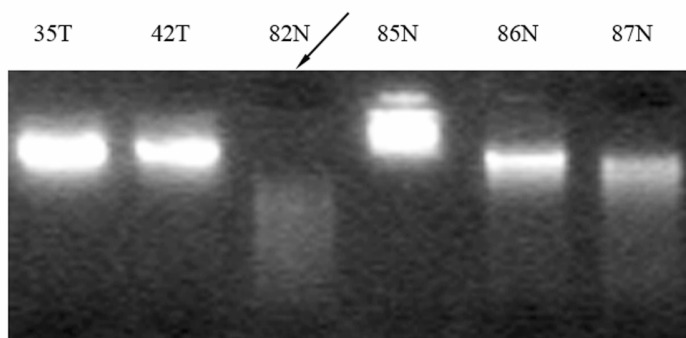
#### DAN II

1. Ekstrakcija DNK započinje dodavanjem 1500  $\mu$ l smeše fenol/hloroform/izoamil-alkohol u odnosu 25:24:1.
2. Centrifugirati na 7000 rpm 7 minuta.
3. Pažljivo odvojiti gornju (vodenu) fazu i prebaciti u novu tubu. Ponoviti postupak (koraci 10-12) dva puta.
4. Dodati 2000  $\mu$ l smeše hloroform/izoamil-alkohol (24:1).
5. Centrifugirati na 8000 rpm 7 min.
6. Pažljivo odvojiti gornju (vodenu) fazu i prebaciti u novu tubu.
7. Precipitacija DNK se vrši istovremenim dodavanjem 30% zapremine 3M natrijum acetata i 2,2 zapremine rashlađenog 100% etanola, uz lagano mešanje dok se ne pojave končići DNK. Ovako ekstrahovana DNK može se neograničeno dugo čuvati na -20 °C. Umesto 30% zapremine 3M natrijum acetata može se koristiti i 10% zapremine 0,1 M natrijum hlorida
8. Staklenim stapićem izvaditi DNK, isprati je u 70% etanolu i rastvoriti u autoklaviranoj dejonizovanoj vodi ili TE puferu.

9. Koncentracija potpuno rastvorene DNK se određuje spektrofotometrijski (Biophotometer, Eppendorf, Nemačka). Određuje se koncentracija iz bar dva različita razblaženja da bi se sa sigurnošću potvrdilo da je DNK rastvorena.

### 3.2.3 Provera kvaliteta izolovane DNK

Provera kvaliteta izolovane i potpuno rastvorene DNK vrši se vizuelizacijom na agaroznom gelu. Za potrebe provere kvaliteta DNK potrebno je pripremiti 0,8% agarozni gel rastvaranjem 0,8 g agaroze (AppliChem GmbH, Nemačka) u 100 ml 1X TBE pufera, pH=8.2 (0.09 M Tris-borat, 0.02 M EDTA) uz zagrevanje. Rastvor rashladiti do 50°C pa dodati finalno 0,4 µg/ml etidijum bromida, a zatim izliti u kadicu za elektroforezu i ostaviti da polimeriše. Uzorak DNK se priprema tako što se 5 µl rastvora DNK pomeša sa 1 µl boje (0,4% bromfenol plavo u 50% glicerolu) i zatim se nanosi na polimerizovan agarozni gel. Elektroforeza se vrši u 1X TBE puferu na 80-100 V u trajanju od 35 do 45 minuta. Nakon elektroforeze DNK se vizuelizuje na Gel Doc sistemu (Gel Doc 1000, Bio Rad, SAD). Intaktna DNK je vidljiva kao oštra traka, dok degradirani molekuli formiraju razmaz duž gela.



**Slika 21.** Provera kvaliteta izolovane genomske DNK na 0,8% agaroznom gelu. Strelica pokazuje uzorak u kojem je došlo do degradacije DNK.

Pored izgleda na agaroznom gelu, značajan podatak o kvalitetu DNK se dobija prilikom spektrofotometrijskog određivanja koncentracije DNK, gde se na osnovu odnosa absorbancija na talasnim dužinama 260/280nm i 260/230nm određuje relativna koncentracija proteina i soli u analiziranom uzorku. Proteini i soli predstavljaju inhibitore većine reakcija u kojima se analizira DNK, stoga je njihovo prisustvo u većim koncentracijama nepoželjno.

### 3.3 DNK profilisanje metodom AP-PCR-a

#### 3.3.1 Kvantifikacija genomske nestabilnosti

DNK profilisanje tumorskog tkiva i krvi svih 30 pacijenata je izvršeno metodom lančane reakcije polimeraze sa nasumično izabranim prajmerima (engl. Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction, AP-PCR). AP-PCR je DNK profilisanje bazirano na lančanoj reakciji polimeraze (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) u kome se koriste proizvoljno odabrani prajmeri za amplifikaciju mnogobrojnih i nezavisnih sekvenci pod uslovima koji omogućavaju manju specifičnost vezivanja prajmera tokom prvih ciklusa. Ovu tehniku prvi put su opisali Welsh i McClelland (1990) koji su je dizajnirali da bi umnožili mnogobrojne DNK fragmente iz nasumičnih regiona genoma bez prethodnog poznavanja DNK sekvenci. Genomska nestabilnost se određuje upoređivanjem DNK profila tumorskog i kontrolnog tkiva (krvi) istog pacijenta i kvantifikacijom uočenih razlika. Prvo se pristupi određivanju ukupnog broja traka u DNK profilima kontrolnog tkiva (krvi), a zatim brojanju ukupnih i specifičnih razlika između tumorskog i kontrolnog DNK profila istog pacijenta. Step genomske nestabilnosti predstavlja odnos broja promenjenih traka u tumorskom DNK profilu i ukupnog broja traka u kontrolnom uzorku. Optimizacija uslova AP-PCR reakcije urađena je prema Cobb-u (1997) za ukupno 9 testiranih prajmera, od kojih su 4 dali informativne AP-PCR profile kojima se razlikuje tumorsko od normalnog tkiva i uočavaju individualne razlike među pacijentima. Optimizacija se izvodi kroz 9 AP-PCR reakcija (Taguchi i Wu, 1980) u kojima se variraju koncentracije  $MgCl_2$ , dezoksiribonukleotid trifosfata (dNTP), prajmera i DNK (Tabela 2).

**Tabela 2.** Optimizacija uslova AP-PCR reakcije

Reakcija	$MgCl_2$	dNTPs	Prajmer	DNK
1	1,5 mM	0,2 mM	1 $\mu M$	25 ng
2	1,5 mM	0,4 mM	3 $\mu M$	50 ng
3	1,5 mM	0,6 mM	5 $\mu M$	100 ng
4	2,5 mM	0,2 mM	3 $\mu M$	100 ng
5	2,5 mM	0,4 mM	5 $\mu M$	25 ng
6	2,5 mM	0,6 mM	1 $\mu M$	50 ng
7	3,5 mM	0,2 mM	5 $\mu M$	50 ng
8	3,5 mM	0,4 mM	1 $\mu M$	100 ng
9	3,5 mM	0,6 mM	3 $\mu M$	25 ng

Na osnovu izgleda DNK profila svih reakcija optimizacije izabrani su uslovi AP-PCR reakcije u kojoj nastaju umereno složeni DNK profili, koji sadrže od 30 do 50 jasno uočljivih traka, pogodnih za dalju analizu. Sekvence prajmera, uslovi AP-PCR reakcija i sastav reakcionih smeša su predstavljeni u tabeli 3.

**Tabela 3.** Sekvence prajmera i uslovi AP-PCR reakcija

Prajmer	Sekvenca	Uslovi za prva 4 ciklusa	Uslovi za preostalih 35 ciklusa	AP-PCR reakciona smeša
<i>CCNA1</i>	5'-AAG AGG ACC AGG AGA ATA TCA-3'	95°C 30" 45°C 2' 72°C 1'	95°C 30" 60°C 1' 72°C 1'	0,2mM svakog dNTP-a; 3,5mM MgCl <sub>2</sub> ; 5µM prajmera; 1U Taq DNK polimeraze
<i>LRP a</i>	5'-GCT TCC GAG GTC TCA AAG C-3'	95°C 30" 40°C 2' 72°C 1'	95°C 30" 58°C 1' 72°C 1'	0,2mM svakog dNTP-a; 3,5mM MgCl <sub>2</sub> ; 5µM prajmera; 1U Taq DNK polimeraze
<i>MDR a</i>	5'-GTT CAA ACT TCT GCT CCT GA-3'	95°C 30" 40°C 2' 72°C 1'	95°C 30" 58°C 1' 72°C 1'	0,4mM svakog dNTP-a; 2,5mM MgCl <sub>2</sub> ; 5µM prajmera; 1U Taq DNK polimeraze
<i>P53 E8s</i>	5'-TAA ATG GGA CAG GTA GGA CC-3'	95°C 30" 40°C 2' 72°C 1'	95°C 30" 58°C 1' 72°C 1'	0,4mM svakog dNTP-a; 2,5mM MgCl <sub>2</sub> ; 5µM prajmera; 1U Taq DNK polimeraze

U svakom eksperimentu su analizirani DNK uzorci u dve koncentracije (25 ng i 50 ng u finalnom volumenu od 25 µl) za svakog pacijenta da bi se isključili artefakti koji se pojavljuju zbog nečistoća prilikom pripremanja DNK. Reakcije su se sastojale iz početnog koraka denaturacije (5 min na 95 °C), 4 ciklusa pod uslovima koji omogućavaju nisku specifičnost vezivanja prajmera za što veći broj mesta u genomu, 35 ciklusa pod visoko specifičnim uslovima i finalne elongacije (7 min na 72 °C). Svaki eksperiment je bio praćen izvođenjem kontrolne reakcije u kojoj se umesto uzorka DNK upotrebljava dvostruko dejonizovana (engl. MQ) voda (engl. no-template reaction). Reproducibilnost rezultata proveravana je izvođenjem barem tri nezavisne reakcije u aparatu GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA). Kompleti reagenasa za PCR reakciju nabavljeni su od firme Fermentas Life Sciences, Litvanija.

Vizuelizacija AP-PCR DNK profila izvršena je na 6 i 8% nedenaturišućim poliakrilamidnim gelovima (PAA), čiji je sastav naveden u tabeli 4.



Elektroforeza nanetih uzoraka vršena je na 150 V u trajanju od 5 sati (SE 600 Vertical Slab Gel Unit, Hoefer Scientific Instruments, SAD). Nakon toga uzorci su vizualizovani bojenjem srebro-nitratom. U proceduri bojenja uzorci na gelu su najpre fiksirani u etanolu (EtOH, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) u trajanju 5–10 minuta uz mešanje, a potom u 10% azotnoj kiselini (HNO<sub>3</sub>) u trajanju od 3 minuta. Nakon dvostrukog ispiranja u dejonizovanoj vodi uzorci su bojani 20–30 minuta srebro nitratom (AgNO<sub>3</sub>) i ponovo ispirani dejonizovanom vodom. Na kraju je boja razvijana rastvorom natrijum karbonata (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) i formaldehida. Reakcija je prekinuta 10 % sirćetnom kiselinom (CH<sub>3</sub>COOH).

**Tabela 4.** Sastav PAA gelova

Supstanca	6% PAA gel	8% PAA gel
40% <i>Akrilamid-bisakrilamid</i> (19:1)	3,75 ml	5 ml
10 X TBE	2,5 ml	2,5 ml
MQ H <sub>2</sub> O	18,75 ml	17,5 ml
APS	230 µl	230 µl
TEMED	20 µl	20 µl

Slike gelova dobijene su na Multi-Analyst/PC Software Image Analysis System (Bio Rad Gel Doc 1000) (TIFF format). Digitalne slike su analizirane pomoću specijalizovanog kompjuterskog programa „Image J“ (National Institute of Health, USA, [www.rsb.info.nih.gov/ij](http://www.rsb.info.nih.gov/ij)) upotrebom funkcije „adapthisteq“. Na ovaj način se dobija grafički prikaz intenziteta traka analiziranih AP-PCR DNK profila pacijenata. Dobijeni grafici tumorskog tkiva i krvi se mogu preklapati da bi se lakše uočile i kvantifikovale razlike između njih koje predstavljaju stepen genomske nestabilnosti tumorskih uzoraka.

### 3.4 Identifikacija izmenjenih traka iz AP-PCR DNK profila

#### 3.4.1 Kloniranje

Uparednom analizom AP-PCR profila tumorskog tkiva i krvi svakog pacijenta odabrane su elektroforetske trake koje se razlikuju po pokretljivosti ili intenzitetu, a karakteristične su za veći broj pacijenata. Ove trake su zatim pažljivo izvučene sa PAA gelova iglom (engl. hypodermic 22-gauge needle) prethodno pokvašenoj u PCR reakcionoj smeši. Igla je, zatim uronjena u reakcionu smešu i ostavljena u njoj 5 min. PCR proizvodi su reamplifikovani sa

istim prajmerom korišćenim za AP-PCR prema delu AP-PCR programa koji se odvija pod visoko specifičnim uslovima za određene prajmere.. Ponovno amplifikovan materijal je prečišćen iz gela upotrebom kompleta za ekstrakciju DNK iz gela (DNA Extraction Kit, Fermentas Life Sciences, Litvanija) po proceduri proizvođača:

1. Uzorke razdvojiti elektroforezom na 1,5 % agaroznom gelu u 1X TBE puferu na 100V u trajanju od 75 minuta
2. Po završenoj elektroforezi pažljivo skalpelom iseći komadić agaroznog gela u kome se nalazi odgovarajuća traka, prebaciti u novu tubu i izmeriti masu
3. U tubu dodati 4,5 zapremine rastvora za vezivanje (engl. binding solution) i  $\frac{1}{2}$  zapremine pufera za koverziju (engl. TBE conversion buffer) i inkubirati na 55°C u trajanju od najmanje 5 minuta, dok se agarozna ne istopi
4. Dodati 5  $\mu$ l silikatnog praha koji ima visok afinitet za vezivanje DNK pri visokim koncentracijama soli
5. Inkubirati na temperaturi od 55 °C u trajanju od 8 minuta uz povremeno mešanje
6. Centrifugirati na 13000 rpm u trajanju od 15 sekundi. Supernatant odbaciti a talog isprati sa 500 $\mu$ l pufera za ispiranje (engl. wash buffer).
7. Centrifugirati na 13000 rpm u trajanju od 15 sekundi. Odbaciti supernatant, pa ceo postupak ponoviti još dva puta.
8. Ostaviti talog da se osuši na vazduhu 20 minuta.
9. Resuspendovati talog u 10  $\mu$ l MQ vode, inkubirati na 55 °C 5 minuta, a zatim centrifugirati na 13000 rpm u trajanju od 30 sekundi.
10. Pažljivo odvojiti supernatant u kome se nalazi prečišćena DNK u novu tubu, a korak 9 ponoviti sa još 10  $\mu$ l i 5  $\mu$ l MQ vode.

Prečišćeni ampliconi su zatim klonirani upotrebom kompleta za kloniranje CloneJet™ PCR Cloning Kit (Fermentas Life Sciences, Litvanija). Proces kloniranja se sastojao iz pripreme reakcione smeše za dobijanje inserta sa tupim krajevima (engl. bluntending) i reakcione smeše ligacije. Sastav reakcione smeše za dobijanje inserta sa tupim krajevima je dat u tabeli 5. Cela procedura se izvodi na ledu.

**Tabela 5.** Reakciona smeša za dobijanje inserta sa tupim krajevima

Komponenta	Volumen
2X pufer za kloniranje	10 $\mu$ l
prečišćen proizvod PCR-a	2 $\mu$ l
MQ voda, bez nukleaze	5 $\mu$ l
DNK „blunting” enzim	1 $\mu$ l
<b>Ukupna zapremina</b>	<b>18 <math>\mu</math>l</b>

Kratko vorteksovati i centrifugirati 3-5 s. Inkubirati smešu na 70 °C 5 min. Kratko ohladiti na ledu i dodati komponente navedene u tabeli 6.

**Tabela 6.** Reakciona smeša ligacije (dodati u reakcionu smešu iz Tabele 5)

Komponenta	Volumen
pJET1.2/blunt cloning vector (50ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
T4 DNK ligaza (5u/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
<b>Ukupna zapremina</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

Kratko vorteksovati i centrifugirati 3-5 s. Inkubirati reakcionu smešu ligacije na sobnoj temperaturi (22°C) u trajanju od 5 minuta. Inkubacija se može produžiti do 30 min ako je potreban maksimalan broj transformisanih bakterija. Ligaciona smeša se može koristiti za transformaciju bakterija odmah ili čuvati na temperaturi -20°C do upotrebe.

### 3.4.2 Transformacija bakterija

Pre transformacije bakterija potrebno je pripremiti kompetentne bakterije soja *Escherichia coli* GM2163 upotrebom kompleta TransformAid<sup>TM</sup> Bacterial Transformation Kit (Fermentas Life Sciences, Litvanija). Procedura transformacije se sastojala u sledećem:

1. Inokulisati 2 ml TransformAid<sup>TM</sup> C-Medium bakterijama iz smrznutog štoka ili kolonije. Inkubirati kulturu na 37 °C preko noći.
2. U prethodno zagrejanih 1,5 ml TransformAid<sup>TM</sup> C-Medium-a (na 37 °C) dodati 150  $\mu$ l zapremine kulture koja je stajala preko noći. Inkubirati tubice na mešalici na 37 °C u trajanju od 20 minuta.

3. Pripremiti TransformAid™ T-Solution mešanjem istih zapremina T-Solution (A) i T-Solution (B) prema uputstvu proizvođača. Držati na ledu.
4. Centrifugirati ćelije na 11000rpm u trajanju od 1 minut na sobnoj temperaturi.
5. Odliti supernatant i resuspendovati ćelije u 300 µl TransformAid™ T-Solution. Inkubirati tube na ledu 5 min. Postupak centrifugiranja ćelija i ponovno resuspendovanje ponoviti sa 120 µl istog rastvora. Ostaviti na ledu 5 minuta.
6. U novu tubu sipati 5 µl plazmida sa insertom (ligation mixture) i inkubirati na ledu 2 min. Dodati 50 µl resuspendovanih ćelija svakoj tubi sa DNK, promešati i inkubirati ih na ledu 5 minuta. Zasejati ćelije u prethodno zagrejane Petri šolje sa LB-Ampicilin agarom (Fermentas Life Sciences, Litvanija). Inkubirati plejtove preko noći na 37 °C.

Ukoliko su bakterije uspešno transformisane onda su stekle rezistenciju na antibiotik prisutan u podlozi (selektivna pologa) i neometano će rasti na podlozi.

### 3.4.3 Izolacija plazmida

Izolacija i prečišćavanje plazmida iz uspešno transformisanih bakterija koje su inkubirane preko noći izvršena je upotrebom kompleta GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas Life Sciences, Litvanija). Po jedna kolonija je prebačena sterilnom ezom iz Petri šolje u 6 ml LB tečnog medijuma (Fermentas Life Sciences, Litvanija) u kome je bio prisutan ampicilin. Inkubacija je vršena na 37 °C tokom 12–16 sati. Nakon toga, bakterije su istaložene centrifugiranjem na 8.000 rpm u mikrocentrifugi 2 minuta na sobnoj temperaturi, a supernatant odliven. Dalja izolacija plazmida se odvija po uputstvu proizvođača:

1. Dodati 250 µl rastvora za liziranje (engl. lysis solution) i jako promešati okretanjem tube dok se ne razbistri.
2. Dodati 350 µl rastvora za neutralizaciju (engl. Neutralization solution) i odmah promešati okretanjem 4 do 6 puta da bi se izbeglo formiranje ćelijskih agregata.
3. Centrifugirati 5 minuta. Ćelije i hromozomska DNK ostaju u talogu.
4. Prebaciti supernatant u GeneJet spin kolonicu odlivanjem ili pipetiranjem. Izbeći prebacivanje taloga.
5. Centrifugirati 1 minut i odbaciti sve što je prošlo kroz kolonicu.
6. Dodati 500 µl rastvora za ispiranje (engl. wash solution) i centrifugirati 30-60 sekundi.

7. Ponoviti korak 6 sa još 500  $\mu$ l rastvora za ispiranje. Dodatno centrifugirati još 1 minut da bi se uklonio preostali rastvor.
8. Prebaciti kolonicu u novu tubu, pažljivo dodati 50  $\mu$ l elucionog pufera (engl. elution solution), inkubirati na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 minuta, pa centrifugirati 2 minuta. Ponovljena elucija sa dodatnom zapreminom elucionog pufera dovodi do povećanja prinosa plazmida od 10-20%.

Prečišćeni plazmidi se čuvaju zamrznuti na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pre sekvenciranja vršena je provera prisustva inserta u plazmidu restrikcijom, upotrebom restrikcionih enzima PstI i HindIII (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka). U smešu za restrikciju finalnog volumena od 18  $\mu$ l (1  $\mu$ l PstI, 1  $\mu$ l HindIII, 2  $\mu$ l 10X pufera za restrikciju, 0,2  $\mu$ l BSA i 13,8  $\mu$ l MQ vode) dodato je 2  $\mu$ l plazmidne DNK i inkubirano na  $37^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 2 sata. Provera reakcija je vršena vizuelizacijom na 0,8 % agaroznom gelu (0,8g agaroze rastvriti u 100ml 1XTBE pufera).

#### **3.4.4 Sekvenciranje kloniranih inserta**

Ukoliko je prisustvo inserta potvrđeno, poređenjem molekulske težine plazmida sa insertom i markera molekulske težine, pristupalo se njegovom sekvenciranju. Sekvenciranje je obavljeno u oba smera i to primenom modifikovane metode po Sanger-u (engl. dye-terminator sequencing). Ova modifikacija se zasniva na primeni fluorescentno obeleženih dideoksinukleotida (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP; po jedna fluorescentna boja za svaki tip ddNTP) koji se u jedinstvenoj reakciji sinteze DNK ugrađuju u rastući lanac i prekidaju sintezu. Dobijeni fragmenti, se razdvajaju automatskom elektroforezom a tip inkorporiranog ddNTP tj. sekvenca se očitava prema talasnoj dužini emitovanog fluorescentnog signala nakon pobuđivanja laserom u automatskom sekvenatoru. Za samu proceduru sekvenciranja upotrebljen je komplet za sekvenciranje BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, SAD). Sastav PCR smeše za sekvenciranje je dat u tabeli 7.

**Tabela 7.** PCR Reakciona smeša za sekvenciranje

<b>Komponenta</b>	<b>Volumen</b>
Reakcioni miks (engl. Ready Reaction Mix)	4 $\mu$ l
5X Pufer	2 $\mu$ l
2 $\mu$ M prajmer iz kita za kloniranje (pJET 1.2 primer)	2 $\mu$ l
Plazmidska DNK (nesečena restrikcionim enzimom)	8 $\mu$ l
MQ voda, bez nukleaze	4 $\mu$ l
<b>Ukupna zapremina</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

Program PCR-a za sekvenciranje se sastoji iz inicijalne denaturacije DNK na temperaturi od 96 °C u trajanju od 1 minut, a zatim od 25 ciklusa (96 °C u trajanju od 10 sekundi, 60 °C u trajanju od 4 minuta), i na kraju 4 °C neograničeno dugo. Dobijeni PCR proizvodi su istaloženi. Ukratko, PCR proizvodima su dodati EDTA (25 mM finalno) i EtOH (70-75% finalno). Smeša je inkubirana 15 min na sobnoj temperaturi a potom centrifugirana 30-45 min na 6000 rpm i temperaturi od +4 °C. Odliven je supernatant i dodata nova količina 70% EtOH i smeša ponovo centrifugirana ali ovog puta 25 min na 5000 rpm na istoj temperaturi od +4 °C. Supernatant je ponovo odliven a dobijeni talog je osušen na 90 °C. Fragmentima u talogu je dodato 15  $\mu$ l Hi-dye formamida (Applied Biosystems, SAD) kako bi se efikasno denaturisali na 95 °C u trajanju od 2 minuta. 10  $\mu$ l amplikona rastvorenih u formamidu je potom podvrgnuto automatskoj elektroforezi i očitavanju sekvence na aparatu ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, SAD). Dobijene sekvence analizirane su BLAST softverom u bazi podataka NCBI GenBank database.

### **3.5 Analiza mutacionog statusa p53 gena**

#### **3.5.1 PCR SSCP metoda**

Da bi se odredio mutacioni status pet najčešće mutiranih egzona p53 gena (egzoni 5-9) tumorska DNK svih 30 pacijentata je prvo umnožena PCR metodom, a zatim analizirana primenom SSCP metode (engl. single strand conformation polymorfism). Paralelno sa tumorskim uzorcima, uzorak krvi je korišćen kao kontrola. Amplimeri i uslovi PCR reakcija korišćeni u eksperimentu su prikazani u tabeli 5. Po završenoj amplifikaciji, PCR produkti su analizirani na prisustvo mutacija. Metoda SSCP se zasniva na detekciji

mutacija na osnovu različite pokretljivosti različitih konformacija denaturisane jednolančane DNK tokom elektroforeze na poliakrilamidnom gelu, a koje su posledica razlika u primarnoj strukturi DNK, tj. baznog sastava. Prethodno denaturisani DNK molekuli putuju različitom brzinom kroz PAA gel ukoliko se razlikuju u primarnoj strukturi, tj. ukoliko su prisutne mutacije. Zahvaljujući različitoj pokretljivosti lanaca iz istog uzorka koji se razlikuju po baznom sastavu dolazi do njihovog razdvajanja u poliakrilamidnom gelu, što se uspešno uočava bojenjem gela. Primenom ove metode moguće je uočiti razlike na nivou pojedinačnih nukleotida. Metoda je izvedena po proceduri opisanoj u radu Orita i saradnika (1989) i sastoji se iz pripreme uzoraka, elektroforeze na poliakrilamidnom gelu i bojenja gela srebrom. Uzorci, prethodno umnoženi PCR reakcijom, su pripremljeni tako što im je dodata boja bromfenol plavo/ksilencijanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) pomešana sa formamidom u odnosu 1:4 (7.5  $\mu$ l uzorka i 10  $\mu$ l boje) i potom su termički obrađeni 5 minuta na 95<sup>0</sup>C i stavljeni na led. Na ovaj način se vrši hemijska i termička denaturacija i sprečava renaturacija dvolančanih DNK molekula pre njihovog nanošenja na gel. Direktno sa leda uzorci su nanošeni na prethodno pripremljeni nedenaturišući poliakrilamidni gel i to pod voltažom (80 V) kako bi se sprečila renaturacija uzoraka. Koncentracije gelova u rasponu od 8-12% sa ili bez glicerola (5-10%) zavisile su od egzona koji je analiziran. Elektroforeza nanetih uzoraka je vršena na 150V u trajanju od najmanje 5 sati (SE 600, Vertical Slab Gel Unit, Hoefer Scientific Instruments, SAD). Nakon toga je gel bojen srebro-nitratom, po prethodno opisanoj proceduri (strana 54). Vizuelnom uporednom analizom prisustva tj. odsustva traka između tumorskih uzoraka i kontrole određeno je koji su egzoni *p53* gena mutirani i kod kojih pacijenata.

### 3.5.2 DNK sekvenciranje

Po završenoj analizi rezultata dobijenih PCR SSCP metodom, svi uzorci u kojima su detektovane mutacije su pripremljeni za potvrđivanje metodom automatskog sekvenciranja. Priprema uzoraka za sekvenciranje podrazumeva njihovu amplifikaciju pod uslovima navedenim u Tabeli 4, kao i prečišćavanje dobijenih PCR produkata iz 1,5% agaroznog gela upotrebom kompleta za ekstrakciju DNK iz gela (DNA Extraction Kit, Fermentas Life Sciences, Litvanija) po prethodno opisanoj proceduri (strana 55). Kvalitet prečišćenih fragmenta je proveren na 2% agaroznom gelu nanošenjem na gel 3  $\mu$ l uzorka smešanog sa 1  $\mu$ l boje uporedo sa 2,5  $\mu$ l DNK markera (Fermentas, Litvanija). U odnosu na intenzitet

traka i sadržaj DNK markera denzitometrijski su određene koncentracije prečišćenih uzoraka. Sekvenciranje je potom obavljeno u oba smera (5' i 3') upotrebom odgovarajućih prajmera za dati egzon (tabela 4) i kompleta za sekvenciranje BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, SAD), prema protoklu proizvođača sa 10 ng prečišćenih DNK amplikona i 4 pmol finalne koncentracije prajmera pod sledećim amplifikacionim uslovima: inicijalna denaturacija na 96<sup>0</sup>C 1 min, 25 ciklusa na 96<sup>0</sup>C 10 s, 5 s na 50<sup>0</sup>C i 60<sup>0</sup>C 4 min, i na kraju 4<sup>0</sup>C neograničeno dugo. Dobijeni amplikoni su zatim istaloženi prema proceduri opisanoj na strani 59. Po 10 µl amplikona rastvorenih u formamidu je potom podvrgnuto automatskoj elektroforezi i očitavanju sekvence na aparatu ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, SAD). Na kraju su dobijene sekvence analizirane i upoređenje sa "wild type" sekvencom p53 gena korišćenjem BLAST programa u NCBI GenBank bazi podataka.

### **3.6 Analiza gubitka heterozigotnosti (LOH) p53, PTEN i p16 gena**

DNK izolovana iz tumorskog tkiva i krvi svih 30 pacijenata je korišćena za detekciju gubitka heterozigotnosti (engl. Loss of heterozygosity, LOH) *p53*, *PTEN* i *p16* tumor supresora. LOH analiza se zasniva na korišćenju visoko polimorfničkih mikrosatelitskih markera vezanih za odgovarajući tumor supresor gen, njihovoj PCR amplifikaciji i kapilarnoj elektroforezi. Ukoliko su prisutna dva različita alela analiziranog lokusa u kontrolnom uzorku, a detektovan značajan gubitak usled delecija jednog od njih u tumorskom tkivu, govorimo o gubitku heterozigotnosti datog lokusa. Pravilnim izborom mikrosatelitskih markera, lociranih u blizini ili u okviru samog tumor supresor gena omogućava se prezizna i visoko specifična LOH analiza. Za svaki od analiziranih gena izabran je set odgovarajućih polimorfničkih markera. Tako su za LOH analizu p53 gena izabrani TP53pentanucleotide, TP53dinucleotide, D17S1537 i D17S786, čiji su uzvodni amplimeri bili obeleženi na 5' kraju fluorescentnim bojama i to redom Fam, Pet, Ned i Vic (Galipeau i saradnici, 1999, Reid i saradnici, 2001). Sekvence prajmera, dužina PCR proizvoda, uslovi reakcije i sastav PCR smeše za svaki mikrosatelit su prikazani u tabeli 8.



**Tabela 8.** Sekvence prajmera, dužina PCR proizvoda, uslovi reakcije i sastav PCR smeše za mikrosatelitske markere *p53* lokusa

Prajmer	Dužina (bp)	Sekvenca prajmera	PCR profil	PCR reakciona smeša (25µl)
TP53pentanucleotide-F <sup>a</sup>	74	5'-FAM-TAAAAAGGGAGAAGGAGGGG-3'	95°C (45s) 62°C (45s) 72°C(60s) 35 ciklusa 72°C(1h)	0,2mM svakog dNTP-a; 2mM MgCl <sub>2</sub> ; 1µM prajmera; 1,5UTaq DNK polimeraze; 150 ng DNK/reakciji
TP53pentanucleotide-R <sup>b</sup>		5'-GGAAGGGTCAACATCTTTTACA-3'		
TP53 dinucleotide-F	202	5'-PET-GTCCTGCTTGCTTACCTCGCTTAGT-3'	95°C (45s) 60°C (45s) 72°C(60s) 35 ciklusa 72°C(1h)	0,2mM svakog dNTP-a; 3mM MgCl <sub>2</sub> ; 1µM prajmera; 1,5UTaq DNK polimeraze; 150 ng DNK/reakciji
TP53 dinucleotide-R		5'-ACCTGATTTCCTTACTGCCTCTTGC-3'		
D17S1537-F	175-205	5'-NED-CTTTAGTCTGGGCACCAAGA-3	95°C (45s) 62°C (45s) 72°C(60s) 35 ciklusa 72°C(1h)	0,2mM svakog dNTP-a; 2,5mM MgCl <sub>2</sub> ; 1µM prajmera; 1,5UTaq DNK polimeraze; 150 ng DNK/reakciji
D17S1537-R		5'-CCATCTTAGTCTCCCAAGCA-3'		
D17S786-F	125-160	5'-VIC-TACAGGGATAGGTAGCCGAG-3'	95°C (45s) 60°C (45s) 72°C(60s) 35 ciklusa 72°C(1h)	0,2mM svakog dNTP-a; 3mM MgCl <sub>2</sub> ; 1µM prajmera; 1,5UTaq DNK polimeraze; 150 ng DNK/reakciji
D17S786-R		5'-GGATTGGGCTCTTTTGTA-3'		

Za određivanje gubitka heterozigotnosti *PTEN* gena izabrano je i analizirano pet polimorfnih mikrosatelitskih lokusa koji okružuju ili se nalaze u okviru ovog gena: D10S579, D10S1765, D10S215, AFM086wg9 i D10S541 (Feilotter i saradnici, 1998, Hahn i saradnici, 1999). Sekvence prajmera, dužina PCR proizvoda, uslovi reakcije i sastav PCR smeše za svaki mikrosatelit su prikazani u tabeli 9.

**Tabela 9.** Sekvence prajmera, dužina PCR proizvoda, uslovi reakcije i sastav PCR smeše za mikrosatelitske markere *PTEN* lokusa

Prajmer	Dužina (bp)	Sekvenca prajmera	PCR profil	PCR reakciona smeša (25µl)
D10S1765-F <sup>a</sup>	166-184	5'-VIC- ACACTTACATAGTGCTTTCTGCG-3'	95°C (30s) 55°C (45s) 72°C(45s)	0,2mM svakog dNTP-a; 1,5mM MgCl <sub>2</sub> ; 1,2µM prajmera; 1U Taq DNK polimeraze; 150 ng DNK/reakciji
D10S1765-R <sup>b</sup>		5'-CAGCCTCCCAAAGTTGC-3'	40 ciklusa 72°C(1h)	
D10S541-F	108-130	5'-FAM- TTTTGAGTTTCTGTACCCATCCC-3'	95°C (30s) 55°C (45s) 72°C(45s)	0,2mM svakog dNTP-a; 1,5mM MgCl <sub>2</sub> ; 1µM prajmera; 1U Taq DNK polimeraze; 150 ng DNK/reakciji
D10S541-R		5'-ATCCACAAGTAACAGAAAGCC-3'	40 ciklusa 72°C(1h)	
D10S215-F	152-208	5'-NED-TGGCATCATTCTGGGGA-3'	95°C (60s) 55°C (60s) 72°C(60s)	0,2mM svakog dNTP-a; 1,5mM MgCl <sub>2</sub> ; 1,2µM prajmera; 2U Taq DNK polimeraze; 0,1mg/ml BSA; 200 ng DNK/reakciji
D10S215-R		5'-GCTTTACGTTTCTTCACATGGT-3'	40 ciklusa 72°C(1h)	
D10S579-F	260-276	5'-FAM-CCGATCAATGAGGAGTGCC-3'	95°C (30s) 55°C (45s) 72°C(45s)	0,2mM svakog dNTP-a; 1,5mM MgCl <sub>2</sub> ; 1µM prajmera; 1,5U Taq DNK polimeraze; 150 ng DNK/reakciji
D10S579-R		5'-ATACACCCAGCCAATGCTGC-3'	40 ciklusa 72°C(1h)	
AFM086wg9-F	154-162	5'-PET-AAATGTACGGTTCATTGACTT-3'	95°C (30s) 55°C (45s) 72°C(45s)	0,2mM svakog dNTP-a; 1,5mM MgCl <sub>2</sub> ; 1,2µM prajmera; 2U Taq DNK polimeraze; 0,1mg/ml BSA; 200 ng DNK/reakciji
AFM086wg9-R		5'-GACTGACTACAAATGGGCA-3'	40 ciklusa 72°C(1h)	

Gubitak heterozigotnosti je analiziran i kod p16 tumor supresor gena tj. INK4a/ARF lokusa. Za ovu analizu su korišćena tri polimorfna mikrosatelitska markera i to sledećim redom od centromernog ka telomernom regionu hromozoma 9p21-23 u kome se nalazi i p16 gen: D9S171, D9S1748 i D9S162 (Mead i saradnici, 1997, Okami i saradnici, 1998). Uzvodni amplimer za svaki mikrosatelitski lokus je obeležen na 5' kraju jednom od komercijalnih fluorescentnih boja koje su zajedno sa sekvencama amplimera, opsezima očekivanih dužina proizvoda, uslovima reakcije i sastavom PCR smeša za svaki mikrosatelit prikazane u tabeli 10.

**Tabela 10.** Sekvence prajmera, dužina PCR proizvoda, uslovi reakcije i sastav PCR smeše za mikrosatelitske markere *p16* lokusa

Prajmer	Dužina (bp)	Sekvenca prajmera	PCR profil	PCR reakciona smeša (25µl)
D9S171-F <sup>a</sup>	158- 177	5'- NED- AGCTAAGTGAACCTCATCTCTGTCT-3'	95°C (45s)	0,2mM svakog dNTP-a; 1,5mM MgCl <sub>2</sub> ; 1µM prajmera; 1U Taq DNK polimeraze; 100 ng DNK/reakciji
D9S171-R <sup>b</sup>		5'-ACCCTAGCACTGATGGTATAGTCT-3'	55°C (45s) 72°C (45s) 40 ciklusa 72°C (1h)	
D9S162-F	172- 196	5'-VIC-GCAATGACCAGTTAAGGTTC-3'	95°C (45s)	
D9S162-R		5'-AATTCCCACAACAAATCTCC-3'	55°C (45s) 72°C (45s) 40 ciklusa 72°C (1h)	
D9S1748-F	114- 148	5'-PET-CACCTCAGAAGTCAGTGAGT-3'	95°C (45s)	0,2mM svakog dNTP-a; 1,5mM MgCl <sub>2</sub> ; 1µM prajmera; 1U Taq DNK polimeraze; 100 ng DNK/reakciji
D9S1748-R		5'-GTGCTTGAAATACACCTTTCC-3'	55°C (45s) 72°C (45s) 40 ciklusa 72°C (1h)	

Provera uspešnosti PCR reakcija se vrši vizuelizacijom proizvoda elektroforezom na 2% agaroznom gelu na 80V u trajanju od 30 minuta, po postupku opisanom na strani 5. Dobijeni PCR proizvodi su, u zavisnosti od jačine signala na gelu, razblaženi 50-400 puta, zatim denaturisani pomoću Hi-Dye formamida (AppliChem GmbH, Nemačka) na temperaturi 95°C u trajanju od 5 minuta, i na kraju razdvajani kapilarnom elektroforezom u ABI Prism 3130 automatskom sekvenatoru. Veličina fragmenata je određivana na osnovu GeneScan-500 LIZ standard (Applied Biosystems, SAD) koji je dodat svakom uzorku pre denaturacije. Mikrosateliti su na kraju analizirani pomoću GeneMapper programa (Applied Biosystems, SAD). Ukratko, kao referentni uzorak za tumorsku DNK svakog pacijenta korišćena je odgovarajuća DNK izolovana iz uzorka krvi istog pacijenta. Marker je definisan kao neinformativan ukoliko je detektovan samo jedan alelski pik u DNK uzorku krvi (homozigot). S druge strane, marker je posmatran kao informativan i dalje je analiziran kada su postojala dva glavna alelska pika u referentnom uzorku (heterozigot). Ukoliko kod informativnih slučajeva u tumorskom uzorku dolazi do potpunog ili delimičnog gubitka jednog od alelskih pikova onda se taj uzorak smatra kandidatom za gubitak heterozigotnosti analiziranog lokusa.

Kao meru stepena gubitka heterozigotnosti program automatski izračunava "LOH skor" prema jednačini:

$$\frac{(\text{visina pika normalnog alela 2}) / (\text{visina pika normalnoga alela 1})}{(\text{visina pika tumorskog alela 2}) / (\text{visina pika tumorskog alela 1})} = \text{LOH Score}$$

Smatra se da je kod tumorskog uzorka došlo do gubitka heterozigotnosti ukoliko je ovaj odnos manji od 0,67 ili veći od 1,35.

### **3.7 Detekcija homozigotnih delecija INK4a/ARF LOKUSA**

Homozigotne delecije predstavljaju gubitak oba alela jednog genskog lokusa. Ovaj vid mutacionog događaja se detektuje komparativnom PCR amplifikacijom gena od interesa i kontrolnog gena iz genomske DNK i određivanjem relativnog odnosa njihovih intenziteta između tumorskog i normalnog tkiva istog pacijenta.

Za analizu homozigotnih delecija INK4a/ARF lokusa, tj. *p16* gena, u istoj PCR reakciji je umnožen egzon 2 ovog lokusa zajedno sa *APRT* genom (engl. adenine phosphoribosyltransferase) kao internom kontrolom (Hayashi i saradnici, 2001). *APRT* gen je izabran za kontrolu jer nisu detektovane promene kopija ovog gena u tumorskim uzorcima, a pored toga on se nalazi na hromozomu 16, te ispitivane delecije INK4a/ARF lokusa na hromozomu 9 ne mogu uticati na njega. Uzvodni prajmeri za oba gena su obeleženi FAM fluorescentnom bojom na 5' kraju kako bi se proizvodi reakcije mogli analizirati na automatskom sekvenatoru. Sekvence prajmera za oba gena, očekivane dužine PCR proizvoda, uslovi PCR reakcije i sastav PCR smeše su predstavljeni u tabeli 11.

Uspešnost amplifikacija je proverena vizuelizacijom dobijenih proizvoda na 2% agaroznom gelu po proceduri opisanoj na strani 5. Dobijeni PCR proizvodi su razblaženi 200 puta i potom pripremljeni za kapilarnu elektroforezu u automatskom sekvenatoru kao što je opisano u prethodnom poglavlju.

**Tabela 11.** Sekvence amplimera za detekciju homozigotnih delecija *INK4a/ARF* lokusa i očekivane dužine PCR proizvoda

Prajmer	Dužina (bp)	Sekvenca prajmera	PCR profil	PCR reakciona smeša (25µl)
INK4a/ARF-F <sup>a</sup>	204	5'-FAM-AGCTTCCTTTCCGTCATGC-3'	95°C (45s) 55°C (45s) 72°C (45s)	0,2mM svakog dNTP-a; 1,5mM MgCl <sub>2</sub> ; 1µM svakog prajmera; 1U Taq DNK polimeraze; 100 ng DNK/reakciji
INK4a/ARF-R <sup>b</sup>		5'-GCAGCACCACCAGCGTG-3'		
APRT- F	134	5'-FAM-CAGGGAACACATTCCTTTGC-3'	40 ciklusa	
APRT- R		5'-TGGGAAAGCTGTTTACTGCG-3'	72°C (1h)	

Prisustvo homozigotnih delecija u tumorskom uzorku je ustanovljeno na osnovu relativnog odnosa intenziteta pikova PCR fragmenata za APRT i INK4a/ARF lokuse u tumorskom uzorku u poređenju sa normalnim uzorkom. Vrednosti ovih odnosa veće od 2 su ukazivale na prisustvo homozigotnih delecija.

### **3.8 Analiza amplifikacionog statusa *EGFR* gena diferencijalnim PCR-om**

Metoda diferencijalnog PCR-a je primenjena za određivanje amplifikacionog statusa *EGFR* gena. Ova je semikvantitativna metoda za određivanje broja kopija gena, zasnovana na istovremenoj amplifikaciji gena od interesa i kontrolnog gena koji je u genomu zastupljen u samo jednoj kopiji. U ovoj studiji amplifikacioni status *EGFR* gena određivan je u odnosu na  $\beta$ -aktin (*ACTB*) kao internu kontrolu. Oba gena se nalaze na hromozomu 7. Sekvence prajmera za oba gena, očekivane dužine PCR proizvoda, uslovi PCR reakcije i sastav PCR smeše su predstavljani u tabeli 12. PCR reakcije su izvođene u GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Bioscience, SAD). PCR produkti su zatim razdvajani elektroforezom na 2% agaroznom gelu po proceduri opisanoj na strani 51.

**Tabela 12.** Sekvence prajmera, dužina PCR proizvoda, uslovi reakcije i sastav PCR smeše za određivanje amplifikacijskog statusa *EGFR* gena

Prajmer	Dužina (bp)	Sekvenca prajmera	PCR profil	PCR reakciona smeša (25µl)
EGFR- F <sup>a</sup>	110	5'-AGC CAT GCC CGC ATT AGC TC-3'	95°C (60s)	0,25mM svakog dNTP-a; 1,5mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,8µM svakog prajmera; 1U Taq DNK polimeraze; 100 ng DNK/reakciji
EGFR- R <sup>b</sup>		5'-AAA GGA ATG CAA CTT CCC AA-3'	58°C (60s) 72°C (60s)	
ACTB- F	168	5'-CTC TTT TCT TTC CCG ATA GGT-3'	30 ciklusa 72°C	
ACTB- R		5'-CTG GGA TGC TCT TCG ACC TC-3'	(10min)	

Nakon elektroforeze na 100V u trajanju od 50 minuta, kako bi se efikasno razdvojile trake bliske po dužini, produkti su vizuelizovani na Gel Doc sistemu (Gel Doc 100, Bio Rad, SAD) i analizirani denzitometrijski na Multi-Analyst/PC Software Image Analysis System (Gel Doc 1000, Bio Rad, SAD) uz pomoć programa MD ImageQuant, ver. 5.2 (Molecular Dynamics). Broj kopija *EGFR* gena određuje se relativno i smatra se da je amplifikacija *EGFR* gena prisutna u uzorku ukoliko je odnos:

$$\left( \frac{\text{Intenzitet signala } EGFR \text{ gena}}{\text{Intenzitet signala } ACTB \text{ gena}} \right)_{\text{tumor}}$$

---

> 2

$$\left( \frac{\text{Intenzitet signala } EGFR \text{ gena}}{\text{Intenzitet signala } ACTB \text{ gena}} \right)_{\text{krv}}$$

### **3.9 Statistička obrada rezultata**

Statistička analiza je rađena primenom statističkog programa STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., SAD). Sledeći kliničkopatološki i genetički parametri su analizirani: starost, pol, histološki tip, gradus, stepen genomske nestabilnosti (totalne, mikrosatelitske i hromozomske), preživljavanje pacijenata i alteracije *p53*, *PTEN*, *p16* i *EGFR* gena. Osim ovih varijabli analizirano je i prisustvo identifikovanih gena u odnosu na sve napred navedene parametre. Moguća povezanost između kliničkopatoloških parametara i genskih alteracija, kao i uočenih promena između samih gena, testirana je "Fisher exact" testom. Analiza preživljavanja pacijenata u odnosu na uočene genske promene je rađena "Kaplan & Meier product limit" metodom a razlike u ukupnom preživljavanju su utvrđene "log-rank" testom. Prethodno je proverena homogenost grupa za svaki kliničkopatološki parametar i stepen genomske nestabilnosti u odnosu na različite detektovane genotipske kombinacije korišćenjem "Fisher exact" testa i "Exact Wilcoxon rank sum" testa. Stopa preživljavanja pacijenata je računata od prvog dana nakon operacije do poslednjeg kontrolnog pregleda ili smrti pacijenta. Vrednosti svih analiza su smatrane statistički značajnim ukoliko je  $p \leq 0,05$ .

## 4 REZULTATI

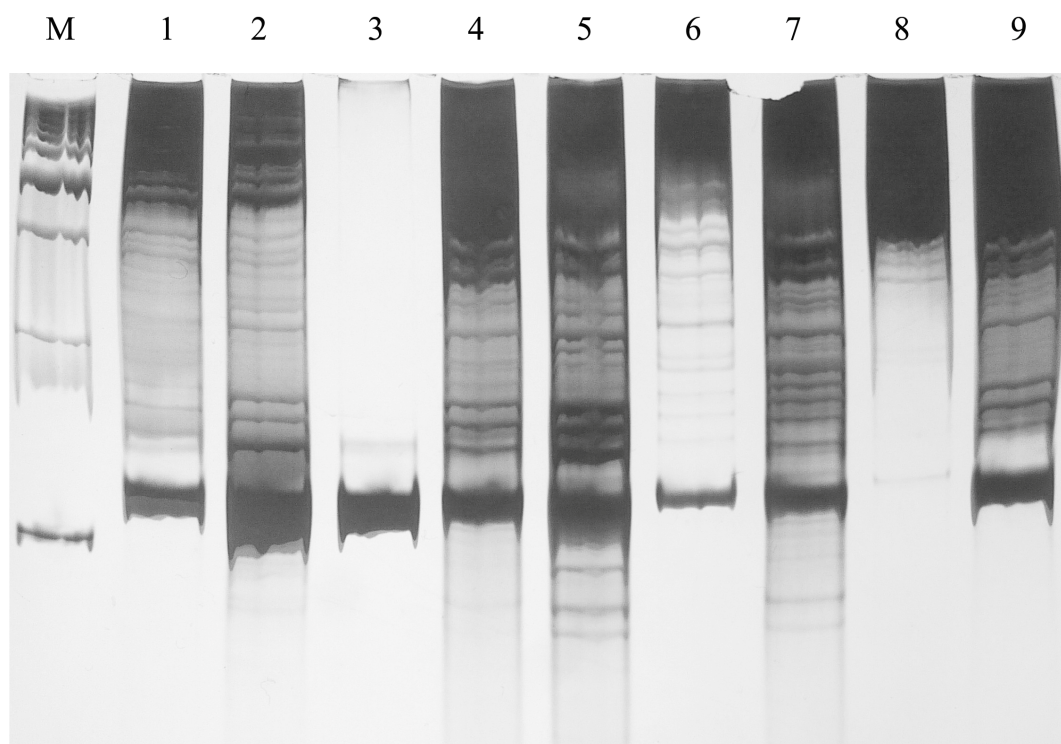
Da bi se realizovali zadati ciljevi ove doktorske disertacije, eksperimentalni deo je koncipiran tako da obuhvata dva segmenta istraživanja. Prvi deo rada je posvećen analizi genomske nestabilnosti ćelija tumora, sa posebnim osvrtom na kvantifikaciju ukupne, mikrosatelitske i hromozomske nestabilnosti. Pored toga, na osnovu razlika u AP-PCR DNK profilima tumorskog i zdravog tkiva identifikovani su geni koji do sada nisu povezani sa patogenezom malignih glioma. U drugom segmentu naseg istraživanja bavili smo se analizom statusa poznatih i najfrekventnije promenjenih tumor supresora i onkogeni u uzorcima glioma, za koje se smatra da su ključni u procesu maligne transformacije ovog tipa tumora. Analiza međusobne povezanosti dobijenih rezultata, kao i njihova korelacija sa histopatološkim parametrima je izvršena sa ciljem identifikacije potencijalnih dijagnostičkih i prognostičkih molekularnih markera odgovarajućih podtipova glioblastoma.

### **4.1 Analiza genomske nestabilnosti AP-PCR-om**

#### **4.1.1 Optimizacija AP-PCR-a**

Broj i raspored traka u DNK profilima zavisi od sastava AP-PCR reakcione smeše, stoga je potrebno odrediti optimalne uslove reakcije za dobijanje umereno složenih DNK profila, sa 30 do 50 jasno uočljivih traka, pogodnih za dalju analizu. Optimizacija se izvodi kroz 9 AP-PCR reakcija sa različitim koncentracijama  $MgCl_2$ , dezoksiribonukleotid trifosfata (dNTP), prajmera i DNK, pri čemu svaka promena dovodi do razlika u izgledu DNK profila reakcija optimizacije. Na osnovu izgleda dobijenih DNK profila na PAA gelu određuje se odgovarajuća koncentracija komponenti PCR reakcione smeše kojom će se dalje analizirati svi uzorci pacijenata datim prajmerom. Za svaki od analiziranih prajmera potrebno je izvršiti zasebnu optimizaciju. Jedan od primera je DNK profil dobijen u reakciji 5 (slika 22), koji je najpogodniji za analizu jer sadrži optimalan broj traka različitih dužina, pa su uslovi iz reakcije 5 korišćeni u daljoj analizi svih 30 pacijenata p53E8as prajmerom.



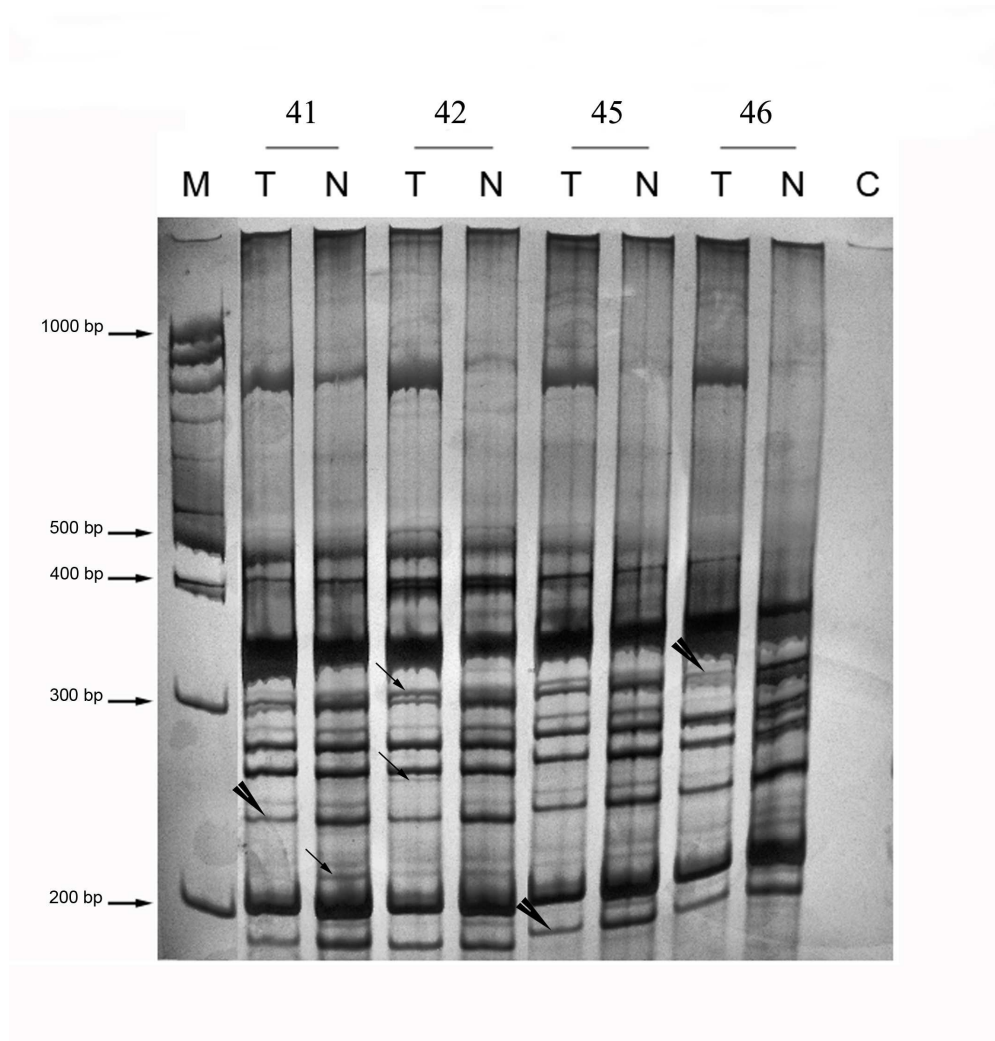


**Slika 22.** Optimizacija AP-PCR reakcija (1-9) za prajmer p53E8as. DNK profil koji nastaje u reakciji broj 5 je najoptimalniji za analizu genomske nestabilnosti.

#### 4.1.2 Podela uzoraka prema stepenu genomske nestabilnosti

Genomska nestabilnost u svim uzorcima ispitivana je DNK profilisanjem metodom AP-PCR-a. Upotrebom četiri od sedam testiranih prajmera dobijeni su informativni DNK profili kojima se razlikuje tumorsko od normalnog tkiva i uočavaju individualne razlike među pacijentima.

Karakterističan izgled DNK profila dobijenih AP-PCR-om i neke od razlika između tumorskog tkiva i krvi prikazani su na slici 22. Parovi DNK profila tumorskog tkiva i krvi svakog pacijenta su detaljno analizirani da bi se detektovale razlike u broju i intenzitetu traka. U DNK profilima se mogu uočiti dva osnovna tipa genetičkih promena (slike 23 i 24). Kvalitativne promene se uočavaju kao promene u rasporedu i broju traka, tj. kao prisustvo ili odsustvo odgovarajućih traka u tumorskom tkivu u odnosu na kontrolno zdravo tkivo, i posledica su nagomilanih promena u DNK sekvencama (mutacija) i pokazatelj su mikrosatelitske nestabilnosti (engl. microsatellite instability MIN).

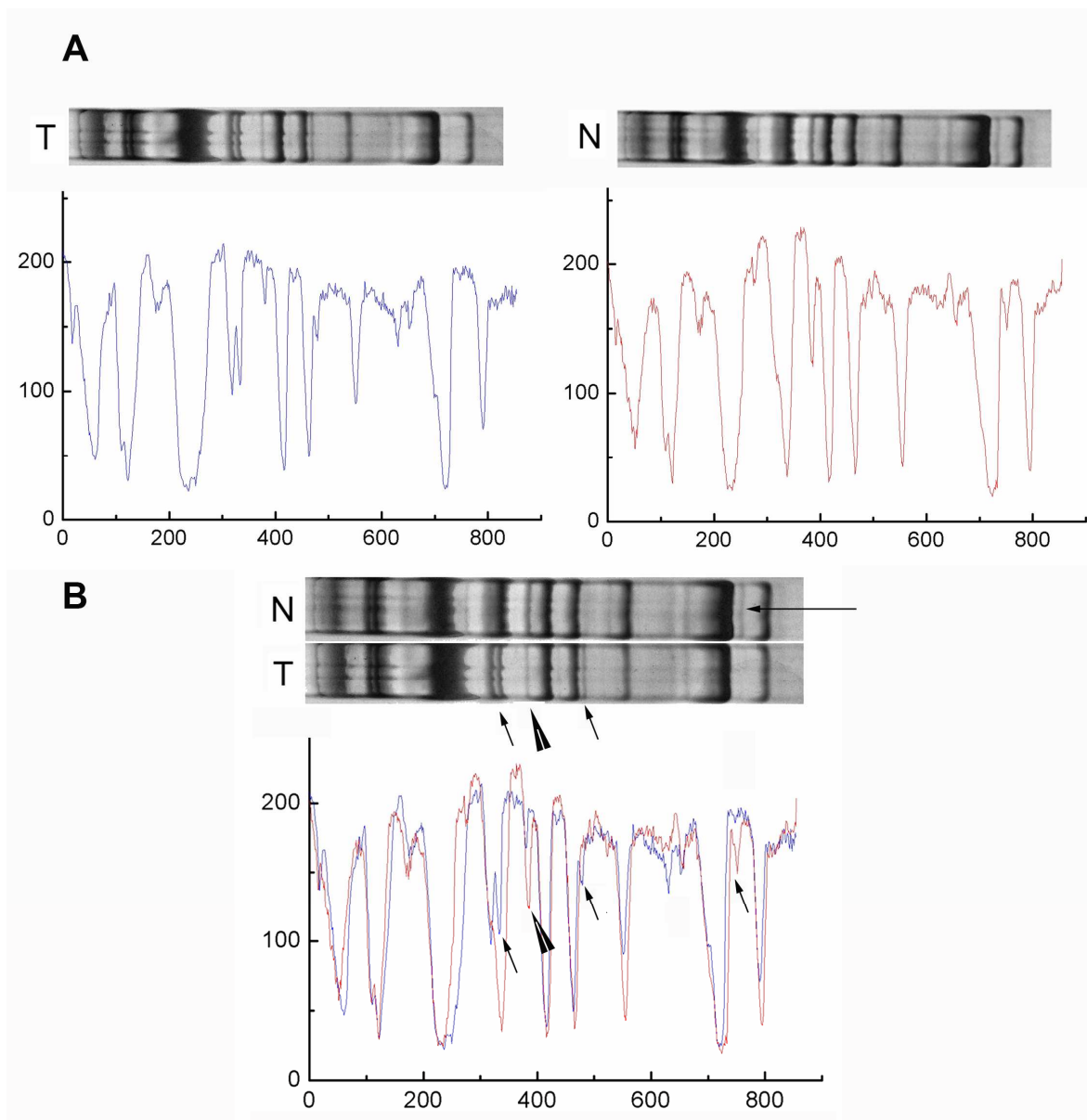


**Slika 23.** AP-PCR DNK profili tumorskog (T) i normalnog tkiva (N) pacijenata obolelih od malignih glioma dobijeni MDRa prajmerom i razdvojeni na 6% nedenaturišućem poliakrilamidnom gelu (PAA). Brojevi 41-46 označavaju pacijente; M - marker dužine DNK; strelice označavaju kvalitativne promene, a glavice strelica kvantitativne promene.

Kvantitativne promene se uočavaju kao razlike u intenzitetu traka istih dužina u DNK profilima tumorskog i kontrolnog tkiva i nastaju kao posledica amplifikacija ili delecija anonimnih regiona genoma, tj. hromozomske nestabilnosti (engl. chromosomal instability, CIN). Za svaki tip promena pojedinačno, kao i za ukupan broj promena, određena je frekvenca DNK promena koja predstavlja merilo stepena genomske nestabilnosti prema navedenim relacijama:

- Frekvenca ukupnih DNK promena (ukupna genomska nestabilnost) = Ukupan broj diferencijalnih traka u tumorskom tkivu / Ukupan broj traka u odgovarajućem kontrolnom tkivu (krv istog pacijenta)

- Frekvencija kvalitativnih DNK promena (MIN) = Broj kvalitativnih DNK promena / Ukupan broj traka u odgovarajućem kontrolnom tkivu (krv istog pacijenta)
- Frekvencija kvantitativnih DNK promena (CIN) = Broj kvantitativnih DNK promena / Ukupan broj traka u odgovarajućem kontrolnom tkivu (krv istog pacijenta)



**Slika 24.** Analiza genomske nestabilnosti primenom AP-PCR DNK profilisanja. A) AP-PCR DNK profili tumorskog tkiva (T) i krvi (N) istog pacijenta, kao i grafički prikaz intenziteta analiziranih traka dobijen pomoću specijalizovanog kompjuterskog programa „Image J“ (National Institute of Health, USA, [www.rsb.info.nih.gov/ij](http://www.rsb.info.nih.gov/ij)) upotrebom funkcije „adaphisteq“. B) Strelice i glavice strelica pokazuju neke od kvalitativnih i kvantitativnih razlika koje se uočavaju na preklapljenim graficima tumorskog tkiva i krvi.

Dobijeni podaci (tabela 13) ukazuju da su kvalitativne i kvantitativne promene skoro podjednako zastupljene u genomima tumora mozga glijalnog porekla. Naime, izračunate frekvence kvalitativnih promena su bile u opsegu od 0,06-0,27, frekvence kvantitativnih promena u opsegu od 0,05-0,27, dok su frekvence ukupnih DNK promena bile u opsegu od 0,14-0,49. Na osnovu distribucije frekvenci DNK promena, određene su okvirne granice za svaki tip nestabilnosti na osnovu kojih su uzorci raspoređeni u dve grupe, sa visokom (H, engl. high) i niskom (L, engl. low) frekvencom DNK promena (tabela 13).

**Tabela 13.** Frekvencija DNK promena i stepen genomske nestabilnosti

Broj pacijenta	Frekvencija ukupnih DNK promena	Frekvencija kvalitativnih DNK promena	Frekvencija kvantitativnih DNK promena	Ukupna genomska nestabilnost	MIN	CIN
1	0,30	0,19	0,11	L <sup>a</sup>	H <sup>b</sup>	L
2	0,34	0,21	0,13	H	H	L
6	0,39	0,25	0,15	H	H	L
8	0,35	0,17	0,18	H	H	H
11	0,31	0,17	0,14	L	H	L
22	0,31	0,15	0,16	L	L	L
25	0,49	0,22	0,27	H	H	H
27	0,44	0,19	0,25	H	H	H
30	0,31	0,13	0,17	H	L	H
32	0,45	0,25	0,20	H	H	H
34	0,35	0,24	0,11	H	H	L
35	0,43	0,27	0,16	H	H	H
38	0,37	0,16	0,20	H	H	H
40	0,39	0,13	0,26	H	L	H
41	0,35	0,16	0,19	H	H	H
42	0,35	0,15	0,20	H	L	H
45	0,33	0,13	0,20	H	L	H
46	0,35	0,15	0,20	L	L	H
52	0,30	0,12	0,19	L	L	H
53	0,30	0,16	0,14	L	H	L
54	0,24	0,11	0,13	L	L	L
55	0,25	0,08	0,17	L	L	H
59	0,30	0,17	0,13	L	H	L
82	0,35	0,15	0,20	H	L	H
83	0,35	0,09	0,26	H	L	H
84	0,36	0,17	0,19	H	H	H
85	0,30	0,17	0,13	L	H	L
86	0,18	0,06	0,13	L	L	L
87	0,14	0,09	0,05	L	L	L
89	0,19	0,13	0,07	L	L	L

MIN-mikrosatelitska nestabilnost, CIN-hromozomska nestabilnost, <sup>a</sup>L-nizak nivo, <sup>b</sup>H-visok nivo nestabilnosti

Tako je 11 pacijenata imalo nizak nivo ukupne genomske nestabilnosti (frekvencija  $\leq 0,3$ ; srednja vrednost = 0,24) dok je kod preostalih 19 pacijenata detektovan visok nivo ukupne genomske nestabilnosti (frekvencija  $> 0,3$ ; srednja vrednost = 0,37). U slučaju mikrosatelitske nestabilnosti, 14 pacijenata je imalo nisku frekvenciju ( $\leq 0,15$ ; srednja vrednost = 0,12), dok je 16 pacijenata imalo visoku frekvenciju kvalitativnih promena ( $> 0,15$ ; srednja vrednost = 0,20). Nizak nivo kvantitativnih promena, tj. hromozomske nestabilnosti uočen je kod 13 pacijenata (frekvencija  $\leq 0,16$ ; srednja vrednost = 0,12), dok je 17 pacijenata imalo visok nivo ovih promena (frekvencija  $> 0,16$ ; srednja vrednost = 0,21) (tabela 14).

**Tabela 14.** Distribucija broja pacijenata prema tipu i stepenu genomske nestabilnosti

Tip i stepen genomske nestabilnosti	Ukupan BP <sup>a</sup>
Ukupno	30
Ukupna genomska nestabilnost	
niska $\leq 0,3$	11
visoka $> 0,3$	19
Mikrosatelitska nestabilnost	
niska $\leq 0,15$	14
visoka $> 0,15$	16
Hromozomska nestabilnost	
niska $\leq 0,16$	13
visoka $> 0,16$	17

<sup>a</sup>BP, broj pacijenata

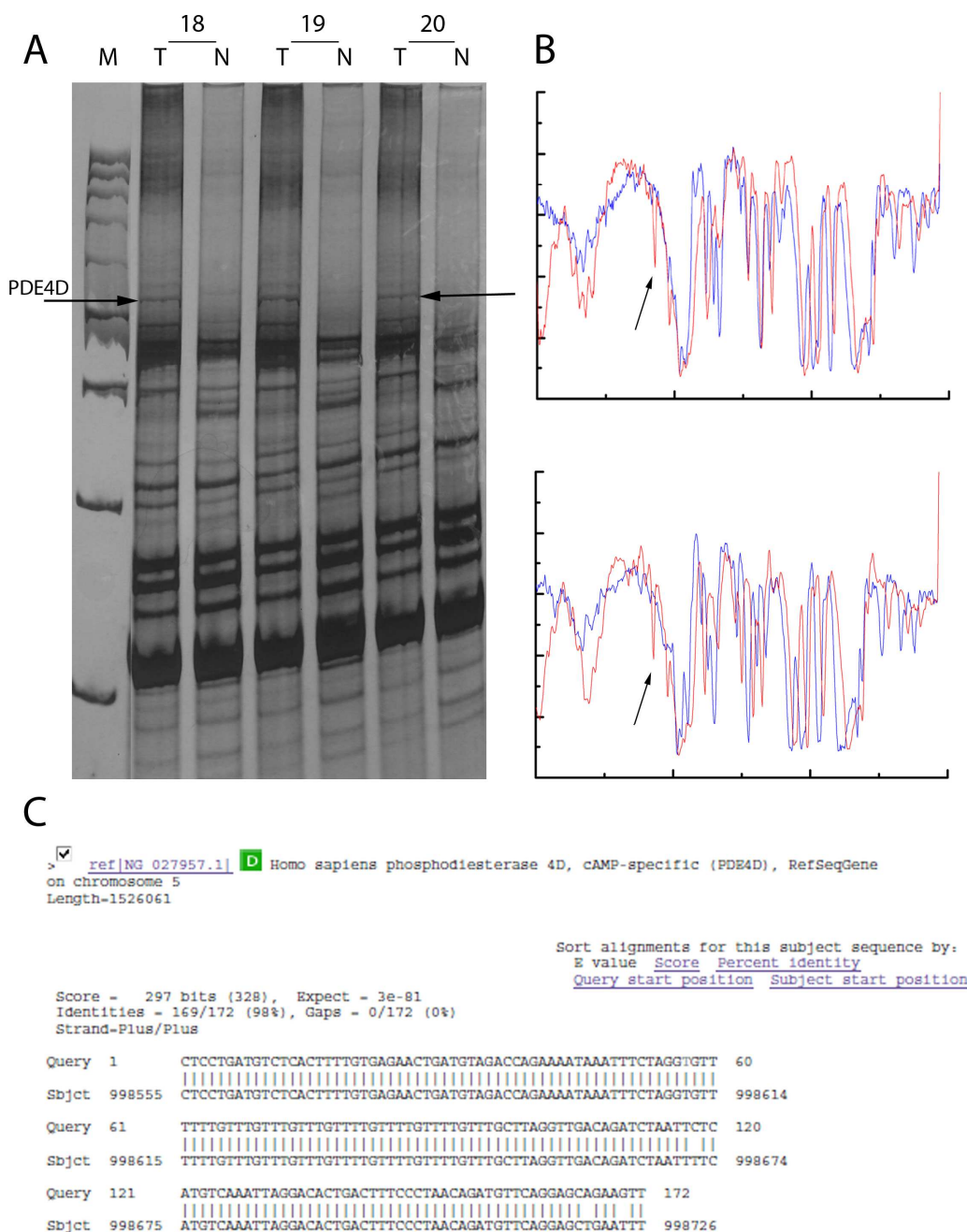
#### 4.1.3 Povezanost stepena genomske nestabilnosti sa histopatološkim i demografskim podacima

Kod pacijenata sa anaplastičnim astrocitomima gradusa III srednje vrednosti stepena ukupne, mikrosatelitske i hromozomske nestabilnosti su 0,34; 0,19 i 0,15, dok su kod pacijenata sa dijagnozom glioblastoma multiforme (gradus IV) ove vrednosti 0,33 za nivo ukupne genomske nestabilnosti, 0,16 za mikrosatelitsku i 0,16 za hromozomsku nestabilnost.

Uočili smo trend da uzorci pacijenata starijih od 50 godina imaju viši frekvenciju oba tipa DNK promena, posebno kvantitativnih, iako su ovi rezultati bez statističke značajnosti.

#### **4.2 Identifikacija izmenjenih traka iz AP-PCR DNK profila**

Poređenjem profila normalnog i tumorskog tkiva uočeno je više od 200 traka sa promenjenom pokretljivošću ili intenzitetom. Posle izvršene analize i podele uzoraka prema stepenu genomske nestabilnosti, pristupili smo identifikaciji nekih od njih koje su prisutne u DNK profilima što većeg broja pacijenata, da bi izbegli dobijanje lažnih rezultata usled individualne varijabilnosti (slika 25). Dvadeset traka, prisutnih samo tumorskom, ali ne i u zdravom tkivu, izolovano je sa gela, ponovo amplifikovano, klonirano i sekvencirano. Trake (amplikoni) sa istom elektroforetskom pokretljivošću su izolovane i identifikovane iz DNK profila bar dva različita pacijenta da bi se potvrdilo da se radi o istoj DNK sekvenci. Sekvencirana su dva klona svake sekvence. Dobijene sekvence su analizirane na osnovu homologije sa već poznatim sekvencama u bazama podataka NCBI i EBI (Sanger Institut).




**Slika 25.** Izolacija i identifikacija traka sa promenjenom pokretljivošću iz AP-PCR DNK profila pacijenata sa gliomima. A) AP-PCR DNK profili tumorskog (T) i normalnog tkiva (N) pacijenata 18-20, dobijeni MDRA prajmerom i razdvojeni na 6% nedenaturišućem poliakrilamidnom gelu (PAA); M - marker dužine DNK. Strelica označava trake koje su izdvojene sa PAA gela, klonirane, sekvencirane i identifikovane kao gen *PDE4D*. B) Grafički prikaz intenziteta promene intenziteta specifične trake dobijen pomoću kompjuterskog programa „Image J“. C) identifikacija nepoznate sekvence na osnovu homologije sa već poznatim sekvencama u bazama podataka NCBI i EBI (Sanger Institut).



Neke od sekvenci su lako identifikovane jer su se poklapale sa sekvencama poznatih gena u pretraženim bazama podataka, dok se ostale nalaze u još uvek neidentifikovanim regionima hromozoma 1, 2, 8q21-q23, 9 i 12, i njihova identifikacija tek treba da usledi. Na ovaj način je identifikovano 11 gena: fuzioni partner HMGIC gena-3 u lipomima (*LHFPL3*), sarkoglikan gama (*SGCG*), 5-hidroksitriptamin (serotonin) receptor 4 (*HTR4*), integrin beta 1 (*ITGB1*), mitohondrijska karbamoil-fosfat sintetaza 1 (*CPS1*), protein S (alpha) (*PROS1*), glikoprotein 2 (*GP2*, *ZAP75*), član 2 kalijum-zavisne subfamilije G (*KCNG2*), cAMP-zavisna 3',5'-ciklična fosfodiesteraza 4D (*PDE4D*), imunoglobulinski receptor ćelija ubica (NK ćelija) (*KIR3DL3*) i inozitol polifosfat-5-fosfataza (*INPP5A*). Šta više, zahvaljujući očitanim sekvencama bili smo u mogućnosti da identifikujemo tipove mutacija u identifikovanim genima. Tako smo identifikovali pojedinačne nukleotidne zamene u *KIR3DL3*, *INPP5A* i *KCNG2* genima, višestruke nukleotidne zamene u *SGCG*, *PDE4D* i *LHFPL3* genima, a u *HTR4*, *ITGB1*, *CPS1*, *PROS1* i *GP2* genima i višestruke nukleotidne zamene i delecije 2 nukleotida. Sekvence identifikovanih gena, kao i detektovane promene u njima su prikazane na slici. (slika 26, 27, 28, 29 i 30).

- ***SGCG*** (Sarcoglycan, gamma; hromozom 13)

[ref|NG\\_008759.1](#)  Homo sapiens sarcoglycan, gamma (35kDa dystrophin-associated glycoprotein) (*SGCG*), RefSeqGene (LRG\_207) on chromosome 13  
Score = 439 bits (486), Expect = 3e-125 Identities = 299/332 (90%), Gaps = 4/332 (1%)

```

Query 32      CTGCTCCTGAATGACTACKGGGTAATAGCAAAATGAAGGCAGAAATAAAGATGTTCTTT 91
             |||
Sbjct 83903    CTGCTCCTGAATGACTACTGGGTAATAATGAAATGAAGGCAGAAATAAAGATGTTCTTT 83844

Query 92      GAAACTAATGAGAACAAGACACAAGTGKACCAGAATCTCTGGGATATATTTAAAGTACA 151
             |||
Sbjct 83843    GAAACCAATGAGAACAAGACACAA-TGTACCAGAATCTCTGGGATGCATTTAAAGCAGT 83785

Query 152     -TGTAGAGGAAAATTTAGAGCACTAAATGCCACAAAAGAAAGGAGGAAAGATCTAAAAT 210
             |||
Sbjct 83784    GTGTAGAGGAAAATTTATAGCACTAAATGCCACAAGAGAAAGCAGGAAAGATCTAAAAT 83725

Query 211     TGATACCCTAACATCAAAATTTAAAGCAATAGAGAGGCAAGAGCAAAACAAATTCAAAAGC 270
             |||
Sbjct 83724    TAACACCCTAACATCACAATTTAAAGAAGCTAGAGAAGCAAGAGCAAAACAAATTCAAAAGC 83665

Query 271     TAGCAGAAAACAAGAAATGACTAAGATCAGAGCAGAAGTGAAGGAAATAGAGACAGCAAA 330
             |||
Sbjct 83664    TAGCAGAAGACAAGAAATAACTAAGATCAGAGCAGAAGTGAAGGAGATAGAAACATAAAA 83605

Query 331     AACCTTCAAATAATCAATGACATC-AGGAGC 361
             |||
Sbjct 83604    AACCTTCAAAAATCAATGA-ATCTAGGAGC 83574

```

**Slika 26.** Analiza varijantne AP-PCR trake u NCBI GenBank banci podataka koja je kao rezultat dala gen *SGCG*. Query – naša sekvenca; Sbjct – homologa sekvenca iz GenBank baze podataka.



- **LHFPL3** (Lipoma HMGIC fusion partner-like 3 protein; hromozom 7)

[ref|NT\\_007933.15|](#) D Homo sapiens chromosome 7 genomic contig, GRCh37.p5 Primary Assembly  
 Length=77412220 Features in this part of subject sequence: [lipoma HMGIC fusion partner-like 3 protein](#)  
 Score = 823 bits (912), Expect = 0.0 Identities = 466/473 (99%), Gaps = 0/473 (0%)

```

Query 41      AGGAGAATATCATCAGAGAGAGAGAAGAGAGTCAAGTATTGWAAGGGAGGTAGAAGTCCA 100
              |||
Sbjct 42207158 AGGACAATATCATCAGAGAGAGAGAAGAGAGTCAAGTATTGAAAGGGAGGTAGAAGTCCA 42207099

Query 101     AGAAGCAAAAAGGGAGGCCAAAGATCACGAAACTAGCAGAGATGGAAGCAAACAGTGCAG 160
              |||
Sbjct 42207098  AGAAGCAAAAAGGGAGACCAAAGATCACGAAACTAGCAGAGATGGAAGCAAACAGTGCAG 42207039

Query 161     TCAAATCTGGAGTCCCTGAACCAAGTGGACAAGAGCAGTAACCAGAAGGCTGAGAGTAAA 220
              |||
Sbjct 42207038  TCAAATCTGGAGTCCCTGAACCAAGTGGACAAGAGCAGTAACCAGAAGGCTGAGAGTAAA 42206979

Query 221     GCTGGAGCTGCTGTAGCAACTACCTTGTGTAGGCACTGATTTGTGTGCCTGGGTGAGTT 280
              |||
Sbjct 42206978  GCTGGAGCTGCTGTAGCAACTACCTTGTGTAGGCACTGATTTGTGTGCCTGGGTGAGTT 42206919

Query 281     GGTCAAGATTAAGAAGCAGAGATGGAATTAAGTGTGGATTATGAAAGGGAGCAGAAAG 340
              |||
Sbjct 42206918  GGTCAAGATTAAGAAGCAGAGATGGAATTAAGTGTGGATTATGAAAGGGAGCAGAAAG 42206859

Query 341     AGGGGTACAGGTTAGTGAAGAGAAGTTGAAGCATTCTGCTTTGGACATGTTGAGTTTGA 400
              |||
Sbjct 42206858  AGGGGTACAGGTTAGTGAAGAGAAGTTGAAGCATTCTGCTTTGGACATGTTGAGTTTGA 42206799

Query 401     GGTACTATGGAACATTCAGATGAAGGTATCCAGCAGGGATCTGGGCAGGGATGAGTGAGT 460
              |||
Sbjct 42206798  GGTACTATGGAACATTCAGATGAAGGTATCCAGCAGGGATCTGGGCAGGGATGAGTGAGT 42206739

Query 461     CATTAGCAGATTGCTGGTGGCTAAAACCTCTGAGAGTAGGTGATATTCTCCTGG 513
              |||
Sbjct 42206738  CATTAGCAGATTGCTGGTGGCTAAAACCTCTGAGAGTAGGTGAGATTATCCTGG 42206686
  
```

- **HTR4** (5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4; hromozom 5)

[ref|NG\\_029052.1|](#) D Homo sapiens 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4 (HTR4),  
 RefSeqGene on chromosome 5 Length=210145 Score = 535 bits (592), Expect = 2e-148 Identities  
 = 317/330 (96%), Gaps = 2/330 (1%)

```

Query 40      GCTCCTGAATTCATTGATTTTTGAAGGGATTTTTGTGTCTCTATTTCTTCAGTTCTGC 99
              |||
Sbjct 154471     GCTCCTGGATTCATTGATTTTTGAAGGGTTTTTTGTGTCTCTATTTCTTCAGTTCTGC 154530

Query 100     TCTGATCTTAGTTAATTTCTTGCCTTCTGCTAGCTTTTGAATGTGTTTGTCTTCTGCTC 159
              |||
Sbjct 154531     TCTGATCTTAGTTAATTTCTTGCCTTCTGCTAGCTTTTGAATGTGTTTGTCTTCTGCTC 154590

Query 160     TAGTTCTTTAATTGTGATGTTAGTGTGTCATTTTAGATCTTTCTGCTTCTCTTTG 219
              |||
Sbjct 154591     TAGTTCTTTAATTGTGATGTTAGGGTGTCAATTTTAGATCTTTCTGCTTCTCTTTG 154650

Query 220     GGCATTTAGTGTCTATAAAATTTCCCTCTACACACTGCTTTAAATGTGTCCAGAGATTCTG 279
              |||
Sbjct 154651     GGCATTTAGTGTCTATAAAATTTCCCTCTACACACTGCTTTAAATGTGTCCAGAGATTCTG 154710

Query 280     GTACAT--TGTGTTTGTCTCACTGGTTTCAAAGAACATCTTTATTTCTGCCTTCATTT 337
              |||
Sbjct 154711     GTATGTCATGCTTTGTTCTCACTGGTTTCAAAGAATATCTTTATTTCTGCCTTCATTT 154770

Query 338     GTTATGTACCCAGTAGTCACTCAGGAGCAG 367
              |||
Sbjct 154771     GTTATGTACCCAGTAGTCACTCAGGAGCAG 154800
  
```

**Slika 27.** Identifikacija izmenjenih traka na osnovu homologije sa već poznatim sekvencama u bazama podataka NCBI i EBI (Sanger Institut) koja je kao rezultat dala gene *LHFPL3* i *HTR4*. Query – naša sekvenca; Sbjct – homologa sekvenca iz GenBank baze podataka.

- **PDE4D** (Phosphodiesterase 4D, cAMP-specific; hromozom 5)

[ref|NT\\_006713.15](#) D Homo sapiens chromosome 5 genomic contig, GRCh37.p5 Primary Assembly Length=42230487 Features in this part of subject sequence: [cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D isoform P](#) Score = 286 bits (316), Expect = 3e-74 Identities = 165/172 (96%), Gaps = 0/172 (0%)

```
Query 42      CTCCGTGATGTCCTCACTTTTGTGAGAAGTGAAGYWKACCAGAAAATAAATTCTAGGTGTT 101
             |||
Sbjct 9384730  CTCCGTGATGTCCTCACTTTTGTGAGAAGTGAAGYWKACCAGAAAATAAATTCTAGGTGTT 9384671

Query 102     TTTTGTGTTGTTGTTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTT 161
             |||
Sbjct 9384670  TTTTGTGTTGTTGTTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTT 9384611

Query 162     ATGTCAAATTAGGACACTGACTTTCCTAACAGATGTTTCCAGGACAGAGTT 213
             |||
Sbjct 9384610  ATGTCAAATTAGGACACTGACTTTCCTAACAGATGTTTCCAGGACAGAGTT 9384559
```

- **ITGB1** (Integrin beta 1; hromozom 10)

[ref|NG\\_029012.1](#) D Homo sapiens integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12) (ITGB1), RefSeqGene on chromosome 10 Length=65048 Score = 535 bits (592), Expect = 2e-148 Identities = 317/330 (96%), Gaps = 2/330 (1%)

```
Query 36      GCTCCTGAATTCATTGATTTTTGAAGGGATTTTGTGCTCTATTTCCCTCAGTTCTGC 95
             |||
Sbjct 47988    GCTCCTGGATTCATTGATTTTTGAAGGGCTTTTATGCTCTATCTCCTCAGTTCTGC 48047

Query 96      TCTGATCTTAGTTATTTCTTGCCTTCTGCTAGCTTTTGAATGTGTTGCTCTTGCTTCTC 155
             |||
Sbjct 48048    TCTGATCTTAGTTATTTCTTGCCTTCTGCTAGCTTTTGAATGTGTTGCTCTTGCTTCTC 48107

Query 156     TAGTTCTTTTAAATGTGATGTTAGTGTGTCATTTTAGATCTTTTCTGCTTCTCTTTG 215
             |||
Sbjct 48108    TAGTTCTTTTAAATGTGATGTTAGGTTGTCATTTTAGATCTTTCTGCTTCTCTTTG 48167

Query 216     GGCATTTAGTGCTATAAAATTTCCCTCTACACTGCTTTAAATGTGTCCAGAGATTCTG 275
             |||
Sbjct 48168    GGCATTTAGTGCTATAAAATTTCCCTCTACACTGCTTTAAATGTGTCCAGAGATTCTG 48227

Query 276     GTACATTGTG--TTTGTCTCACTGGTTTCAAAGAACAATCTTTATTTCTGCCTTCATTT 333
             |||
Sbjct 48228    GTATGTTGTGCTTTGTTCTCACTGGTTTCAAAGAACAATCTTTATTTCTGCCTTCATTT 48287

Query 334     GTTATGTACCCAGTAGTCACTCAGGAGCAG 363
             |||
Sbjct 48288    GTTATGTATCCAGTAGTCACTCAGGAGCAG 48317
```


- **INPP5A** (Type I inositol 1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase; hromozom 18)

[ref|NW\\_001838014.1](#) D Homo sapiens chromosome 10 genomic contig, alternate assembly HuRef SCAF\_1103279182339, whole genome shotgun sequence Length=2024395 Features in this part of subject sequence: [type I inositol 1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase](#) Score = 62.6 bits (68), Expect = 7e-07 Identities = 34/34 (100%), Gaps = 0/34 (0%)

```
Query 189     CCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACAT 222
             |||
Sbjct 1113511  CCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACAT 1113544
```

**Slika 28.** Analiza varijantnih AP-PCR traka u NCBI GenBank banci podataka koja je kao rezultat dala gene *PDE4D*, *ITGB1* i *INPP5A*. Query – naša sekvenca; Sbjct – homologa sekvenca iz GenBank baze podataka.

- **CPS1** (Carbamoyl-phosphate synthase 1, mitochondrial; hromozom 2)

[ref|NG\\_008285.1](#)  Homo sapiens carbamoyl-phosphate synthase 1, mitochondrial (CPS1), RefSeqGene (LRG\_336) on chromosome 2 Length=208423  
Score = 535 bits (592), Expect = 2e-148, Identities = 317/330 (96%), Gaps = 2/330 (1%)

```

Query 36      GCTCCTGAATTCATTGATTTTTTGAAGGGATTTTGTGTCTCTATTCCTTCAGTTCTGC 95
              |||
Sbjct 35907   GCTCCTGGATTCATTGATTTTTTGAAGGGATTTTGTGTCTCTATTCCTTCAGTTCTGC 35848

Query 96      TCTGATCTTAGTTATTTCTTGCCTTCTGCTAGCTTTTGAATGTGTTGCTCTTGCTTCTC 155
              |||
Sbjct 35847   TCTGATCTTAGTTATTTCTTGCCTTCTGCTAGCTTTTAAATGTGTTGCTCTTGCTTCTC 35788

Query 156     TAGTTCTTTTAAATGTGATGTTAGTGTGTCATTTTAGATCTTTTCTGCTTCTCTTGTG 215
              |||
Sbjct 35787   TAGTTCTTTTAAATGTGATGTTAGGGGTGTCATTTTAGATCTTTCTGCTTCTCTTGTG 35728


Query 216     GGCATTTAGTGTCTATAAAATTCCTCTACACACTGCTTTAAATGTGTCCAGAGATTCTG 275
              |||
Sbjct 35727   GGCATTTAGTGTCTATAAAATTCCTCTACACACTGCTTTGAATGTGTCCAGAGATTCTG 35668

Query 276     GTACATTGTG--TTTGTCTCACTGGTTTCAAAGAACATCTTTATTTCTGCCTTCATTT 333
              |||
Sbjct 35667   GTATGTTGTGTCTTTTGTCTCATTGTTTCAAAGAACATCTTTATTTCTGCCTTCATTT 35608

Query 334     GTTATGTACCCAGTAGTCACTCAGGAGCAG 363
              |||
Sbjct 35607   ATTATGTACCCAGTAGTCACTCAGGAGCAG 35578

```

- **KIR3DL3** (killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 3)

[gb|GU182356.1](#)  Homo sapiens haplotype RSH KIR A KIR gene cluster, complete sequence Length=151486 Score = 713 bits (790), Expect = 0.0, Identities = 395/395 (100%), Gaps = 0/395 (0%)

```

Query 23      GATATCAGACCAGTCAACAAGTACAATGGGCATCGTATTGCCCGAACAGATAAAGCTAGC 82
              |||
Sbjct 7721     GATATCAGACCAGTCAACAAGTACAATGGGCATCGTATTGCCCGAACAGATAAAGCTAGC 7780

Query 83      ATGCCAACGGTATACAGCGAGTCGCTCTTTGTGGAGGTGACGATTACCTAACAAATCGGTC 142
              |||
Sbjct 7781     ATGCCAACGGTATACAGCGAGTCGCTCTTTGTGGAGGTGACGATTACCTAACAAATCGGTC 7840

Query 143     GATTCGTTTGTATGTTATGTTTGTCTCGCTTTGGTTGGCAGGTTACGGCCAAGTTCGGT 202
              |||
Sbjct 7841     GATTCGTTTGTATGTTATGTTTGTCTCGCTTTGGTTGGCAGGTTACGGCCAAGTTCGGT 7900

Query 203     AAGAGTGAGAGTTTACAGTCAAGTAAGGCGTGCCAGCCAACGTTAAGCTGTTGAGTCG 262
              |||
Sbjct 7901     AAGAGTGAGAGTTTACAGTCAAGTAAGGCGTGCCAGCCAACGTTAAGCTGTTGAGTCG 7960

Query 263     TTTTAAGTGTAATTCGGGGCAGAATTGGTAAAGAGACTCGTGTAATAATCGAGTTCGCA 322
              |||
Sbjct 7961     TTTTAAGTGTAATTCGGGGCAGAATTGGTAAAGAGACTCGTGTAATAATCGAGTTCGCA 8020

Query 323     CATTTTGTGTCTGATTATTGATTTTGGCGAAACCATTGATCATATGACAAGATGTGT 382
              |||
Sbjct 8021     CATTTTGTGTCTGATTATTGATTTTGGCGAAACCATTGATCATATGACAAGATGTGT 8080

Query 383     ATCTACCTTAACTTAATGATTTTGATAAAAAATCAT 417
              |||
Sbjct 8081     ATCTACCTTAACTTAATGATTTTGATAAAAAATCAT 8115

```

**Slika 29.** Analiza varijantnih AP-PCR traka u NCBI GenBank banci podataka koja je kao rezultat dala gene *CPS1* i *KIR3DL3*. Query – naša sekvenca; Sbjct – homologa sekvenca iz GenBank baze podataka

- **KCNG2** (Potassium voltage-gated channel subfamily G member 2; hromozom 18)

[ref|NT\\_025028.14](#) | D Homo sapiens chromosome 18 genomic contig, GRCh37.p5 Primary Assembly

Features in this part of subject sequence: [potassium voltage-gated channel subfamily G member 2](#)

Score = 342 bits (378), Expect = 5e-91, Identities = 190/191 (99%), Gaps = 0/191 (0%)

```

Query 39      CTGCTCCTGATAGACACAGAACCTCTCTTGCTGASATTATTCCTAGGCCTTTCATATTTT 98
              ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 25425221 CTGCTCCTGATAGACACAGAACCTCTCTTGCTGAGATTATTCCTAGGCCTTTCATATTTT 25425162

Query 99      TGTATTAGGGTGACTGGAATAGTTTTTCTATTAAGTTTTCTATGACTGATGGCATAGAG 158
              ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 25425161 TGTATTAGGGTGACTGGAATAGTTTTTCTATTAAGTTTTCTATGACTGATGGCATAGAG 25425102

Query 159     GAAGGTGGCTGATGGCGGTGGCTGTACAGCTTTTCTCAATCGGCCAACAAAACACAGTT 218
              ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 25425101 GAAGGTGGCTGATGGCGGTGGCTGTACAGCTTTTCTCAATCGGCCAACAAAACACAGTT 25425042

Query 219     CAGGAGCAGAA 229
              ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 25425041 CAGGAGCAGAA 25425031

```

- **GP2** (Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2; hromozom 16)

[ref|NT\\_010393.16](#) | D Homo sapiens chromosome 16 genomic contig, GRCh37.p5 Features in this part of subject sequence: [pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2 isoform 3 precursor](#) Score = 53.6 bits (58), Expect = 3e-04 Identities = 36/39 (92%), Gaps = 1/39 (3%)

```

Query 179     GGGCAGGGAAGTGGAGGGCAAAGGGAAGAGAGAGGGAGA 217
              ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 20268265 GGGCAGGGAAG-GGAGGGGAAAGGGAAGAGAGAGGGAGA 20268228

```

- **PROS1** (Protein S, alpha; hromozom 2)

[gb|AY308744.1](#) | D Homo sapiens protein S (alpha) (PROS1) gene, partial cds, Length=93089 Score = 535 bits (592), Expect = 2e-148 Identities = 317/330 (96%), Gaps = 2/330 (1%)

```

Query 36      GCTCCTGAATTCATTGATTTTTGAAGGGATTTTGTGCTCTATTCCTTCAGTTCTGC 95
              ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 23007     GCTCCTGGAATTCATTGATTTTTGAAGGGATTTTGTGCTCTATTCCTTCAGTTCTGC 23066

Query 96      TCTGATCTTAGTTATTTCTTGCCTTCTGCTAGCTTTTGAATGTGTTGCTCTTGCTTCTC 155
              ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 23067     TCTGATTTTAGTTATTTCTTGCCTTCTGCTAGCTTTTGAATGTGTTGCTCTTGCTTCTC 23126

Query 156     TAGTTCCTTTAATTTGTGATGTTAGTGTGCAATTTTAGATCTTTCTGCTTCTCTTGTG 215
              ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 23127     TAGTTCCTTTAATTTGTGATGTTAGGGTGTCAATTTTAGATCTTTCTGCTTCTCTTGTG 23186

Query 216     GGCATTTAGTGCTATAAATTTCCCTCTACACACTGCTTTAAATGTGTCCAGAGATTCTG 275
              ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 23187     GGCATTTAGTGCTATAAATTTCCCTCTACACACTGCTTTAAATGTGTCCAGAGATTCTG 23246

Query 276     GTACATTGTG--TTTGTCTCACTGGTTTCAAAGAACATCTTTATTTCTGCCTTCATTT 333
              ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 23247     GTATGTTGTGCTTTGTTCTCATTGGTTTCAAAGAACATCTTTATTTCTGCCTTCATTT 23306

Query 334     GTTATGTACCCAGTAGTCACTCAGGAGCAG 363
              ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 23307     GTTATGTACCCAGTAGTCACTCAGGAGCAG 23336

```

**Slika 30.** Identifikacija izmenjenih traka na osnovu homologije sa već poznatim sekvencama u bazama podataka NCBI i EBI (Sanger Institut) koja je kao rezultat dala gene *KCNG2*, *GP2* i *PROS1*. Query – naša sekvenca; Sbjct – homologa sekvenca iz GenBank baze podataka.

#### 4.2.1 Povezanost identifikovanih gena sa genomskom nestabilnošću i kliničkopatološkim parametrima

Nakon identifikacije ovih gena pristupili smo ispitivanju odnosa između njihovih promena u tumorskim tkivima i kliničkopatoloških parametara pacijenata uključujući podtip i histološki gradus, kao i sa demografskim podacima (pol, starost) (tabele 15a i 15b).

**Tabela 15a** Odnos učestalosti promena u identifikovanim genima i kliničkopatoloških parametara

Parametar	BP	LHFPL3			SGCG			PDE4D			HTR4		
		BP	%	<i>p</i>	BP	%	<i>p</i>	BP	%	<i>p</i>	BP	%	<i>p</i>
Ukupno	30	10	33.3		8	26.6		9	30		8	26.6	
<b>Histološki podtip</b>													
Anaplastični astrocitomi	8	2	25.0		3	37.5		2	25.0		3	37.5	
Glioblastomi multiforme	22	8	36.4	0.45	5	22.7	0.36	7	31.8	0.55	5	22.7	0.36
<b>Pol</b>													
Muški	19	8	42.1		5	26.3		5	26.3		5	26.3	
Ženski	11	2	18.2	0.18	3	27.3	0.64	4	36.4	0.43	3	27.3	0.64
<b>Godine</b>													
< 50g	6	0	00.0		3	50.0		2	33.3		3	50.0	
≥ 50g	24	10	41.7	0.06	5	20.8	0.17	7	29.2	0.42	5	20.8	0.17
<b>Ukupna genomski nestab.</b>													
Niska	13	1	7.7		5	38.5		3	23.1		5	38.5	
Visoka	17	9	52.9	<b>0.005</b>	3	17.6	0.19	6	35.3	0.38	3	17.6	0.19
<b>Mikrosatelitska nestab.</b>													
Niska	14	4	28.6		3	21.4		6	42.8		3	21.4	
Visoka	16	6	37.5	0.45	5	31.2	0.42	3	18.8	0.15	5	31.2	0.42
<b>Hromozomska nestab.</b>													
Niska	13	2	15.4		7	53.8		1	7.7		7	53.8	
Visoka	17	8	47.1	0.07	1	5.9	<b>0.005</b>	8	47.1	<b>0.02</b>	1	5.9	<b>0.005</b>

<sup>a</sup>AA - anaplastični astrocitomi; GBM - glioblastoma multiforme; <sup>b</sup>Podebljana slova ukazuju na statističku značajnost; <sup>c</sup>BP – broj pacijenata u grupi.; LHFPL3 - lipoma HMGIC fusion partner-like 3; SGCG - sarcoglycan, gamma; PDE4D - cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D; HTR4-5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4

Kao što se i vidi iz tabela 15a i 15b, nije pokazan statistički značajan odnos identifikovanih DNK promena i starosti i pola pacijenata. *LHFPL3* je promenjen kod 10 od 30 pacijenata (33%), prevashodno u uzorcima glioblastoma gradusa IV (36,4% u odnosu na 25% u uzorcima anaplastičnih astrocitoma gradusa III). Promene u ovom genu se javljaju sa značajno većom učestalošću u uzorcima sa visokim stepenom ukupne genomske nestabilnosti (52,9% u odnosu na 7,7% u uzorcima sa niskim stepenom,  $p=0,005$ ). Isti trend, ali bez statističke značajnosti uočen je i u slučaju mikrosatelitske (37,5% uzoraka sa visokim u odnosu na 28,6% uzoraka sa niskim stepenom MIN-a) i hromozomske nestabilnosti (47,1% uzoraka sa visokim u odnosu na 15,4% uzoraka sa niskim stepenom CIN-a).

**Tabela 15b** Odnos učestalosti promena u identifikovanim genima i kliničkopatoloških parametara

Parametar	BP	ITGB1			INPP5A			CPS1			PROS1		
		BP	%	<i>p</i>	BP	%	<i>p</i>	BP	%	<i>p</i>	BP	%	<i>p</i>
Ukupno	30	8	26.6		13	43.3		8	26.6		8	26.6	
<b>Histološki podtip</b>													
Anaplastični astrocitomi	8	3	37.5		5	62.5		3	37.5		3	37.5	
Glioblastoma multiforme	22	5	22.7	0.36	8	36.4	0.19	5	22.7	0.36	5	22.7	0.36
<b>Pol</b>													
Muški	19	5	26.3		10	52.6		5	26.3		5	26.3	
Ženski	11	3	27.3	0.64	3	27.3	0.17	3	27.3	0.64	3	27.3	0.64
<b>Godine</b>													
< 50g	6	3	50.0		1	16.7		3	50.0		3	50.0	
≥ 50g	24	5	20.8	0.17	12	50.0	0.16	5	20.8	0.17	5	20.8	0.17
<b>Ukupna genomska nestab.</b>													
Niska	13	5	38.5		5	38.5		5	38.5		5	38.5	
Visoka	17	3	17.6	0.19	8	47.0	0.46	3	17.6	0.19	3	17.6	0.19
<b>Mikrosatelitska nestab.</b>													
Niska	14	3	21.4		5	35.7		3	21.4		3	21.4	
Visoka	16	5	31.2	0.42	8	50.0	0.34	5	31.2	0.42	5	31.2	0.42
<b>Hromozomska nestabilnost</b>													
Niska	13	7	53.8	<b>0.005</b>	4	30.8	0.20	7	53.8	<b>0.005</b>	7	53.8	<b>0.005</b>
Visoka	17	1	5.9		9	52.9		1	5.9		1	5.9	

<sup>a</sup>AA, anaplastični astrocitomi; GBM, glioblastoma multiforme; <sup>b</sup>Podebljana slova ukazuju na statističku značajnost; <sup>c</sup>BP – broj pacijenata u grupi; ITGB1- integrin, beta 1; INPP5A- inositol polyphosphate-5-phosphatase; CPS1 - carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial; PROS1 - protein S (alpha)

Promene u *SGCG*, *HTR4*, *ITGB1*, *CPS1* i *PROS1* genima su pronađene kod 26.6% pacijenata (8 od 30), predominantno kod pacijenata sa anaplastičnim astroцитomima (37,5%) u poređenju sa GBM (22,7%), kao i u uzorcima sa niskim nivoom ukupne genomske nestabilnosti (38.5% u odnosu na 17,64% u uzorcima sa visokim nivoom). Analizirajući hromozomsku nestabilnost, zaključili smo da se promene u ovim genima javljaju značajno češće u uzorcima sa niskim nivoom CIN-a, tj. kod 53,8% pacijenata sa niskim nivoom CIN-a, u poređenju sa samo 5,9% pacijenata sa visokim nivoom CIN-a ( $p=0.005$ ).

*PDE4D* gen je promenjen u tumorskim uzorcima 9 pacijenata (30%) i njegove promene se javljaju sa skoro podjednakom učestalošću u uzorcima gradusa III i gradusa IV (25% u odnosu na 31,8%). Promene u *PDE4D* se mogu povezati sa visokim stepenom hromozomske nestabilnosti ( $p=0.02$ ), jer su detektovane kod 47% pacijenata iz ove grupe, u odnosu na 7,7% pacijenata sa niskim stepenom CIN-a (Tabela 15a).

Promene *INPP5A* gena predstavljaju najučestalije promene u našoj grupi uzoraka, detektovane kod 43,3% pacijenata, pretežno sa anaplastičnim astroцитomima gradusa III (62,5% u odnosu na 36,4% pacijenata sa GBM), kao i kod pacijenata sa visokim stepenom genomske nestabilnosti (Tabela 15b).

### **4.3 Analiza promena u p53, PTEN, p16 i EGFR genima**

*p53*, *PTEN* i *p16* spadaju u grupu najčešće inaktiviranih gena u tumorskim uzorcima, kao i amplifikacija *EGFR* onkogeni. U ovoj studiji su proučavani najčešći mehanizmi koji dovode do njihovih promena, te je u slučaju *p53* gena analiziran njegov mutacioni status i gubitak heterozigotnosti (LOH). Gubitak heterozigotnosti je određivan i u slučaju *PTEN*-a i *p16* tumor supresor gena. Amplifikacioni status *EGFR* onkogeni je određen metodom diferencijalnog PCR-a. Dobijeni rezultati su predstavljeni u tabeli 16.

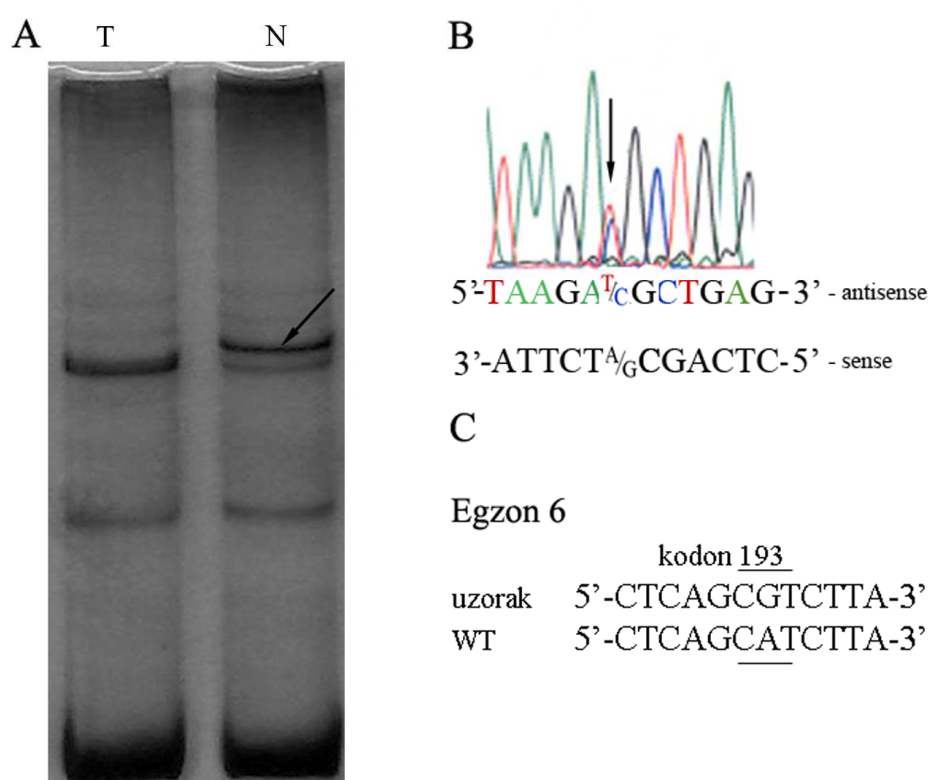
**Tabela 16.** Pregled promena *p53*, *PTEN*, *p16* i *EGFR* gena kod 30 pacijenata obolelih od NSCLC

R.br.	Broj pacijenta	<i>p53</i>	<i>PTEN</i>	<i>p16</i>	<i>EGFR</i>
1	1	X	X	X	X
2	2		X		X
3	6		X	X	
4	8			X	
5	11		X	X	X
6	22	X		X	
7	25	X	X	X	
8	27	X			
9	30	X	X		X
10	32		X	X	X
11	34	X		X	
12	35		X		X
13	38		X		
14	40	X	X	X	
15	41	X	X	X	
16	42	X		X	
17	45		X	X	X
18	46		X	X	
19	52		X		
20	53				
21	54	X			
22	55		X	X	
23	59		X	X	
24	82				X
25	83		X		
26	84		X	X	X
27	85	X		X	X
28	86		X		X
29	87				X
30	89	X	X	X	X
<b>Ukupno</b>		12	20	18	13
<b>%</b>		40	66,7	60	43,3



### 4.3.1 Mutacioni status *p53* tumor supresor gena

Za dobijanje podataka o mutacionom statusu *p53* analizirano je 5 najčešće mutiranih egzona (egzon 5 – egzon 9) metodom PCR SSCP-a. Tumorski uzorci svih 30 pacijenata su analizirani ovom metodom i detektovane su aberacije u 20. Ovi uzorci su dalje podvrgnuti analizi na automatskom sekvenatoru da bi se potvrdile i identifikovale DNK mutacije (slika 31).



**Slika 31.** A) PCR-SSCP analiza egzona 6 *p53* gena kod tumorskog (T) u odnosu na kontrolni uzorak (N); strelica pokazuje postojanje mutiranog jednolančanog konformera u tumorskom uzorku. B) Segment elektroferograma i očitana sekvenca dobijeni sekvenciranjem mutiranog egzona 6 *p53* gena „antisense“ amplimerom sa odgovarajućom komplementarnom „sense“ sekvencom; strelica pokazuje mutacionu promenu. C) Uporedna analiza očitane sekvence tumorskog uzorka i „wild type“ sekvence egzona 6 *p53* gena i identifikacija mutacije A→G (podvučeno) u kodonu 193.

Ovom metodom je potvrđeno 13 mutacija kod 9 pacijenata (30%). Podaci o mutiranim egzonima, kodonima, identifikovanim nukleotidnim promenama i predviđeni efekti na proteinsku strukturu svih 13 mutacija navedeni su u tabeli 17.

Najveći broj mutacija je detektovan u kodonu 144 egzona 5, a ujedno je ovo najfrekventnije mutirani egzon u našoj grupi uzoraka.

**Tabela 17.** Identifikovane mutacije p53 gena

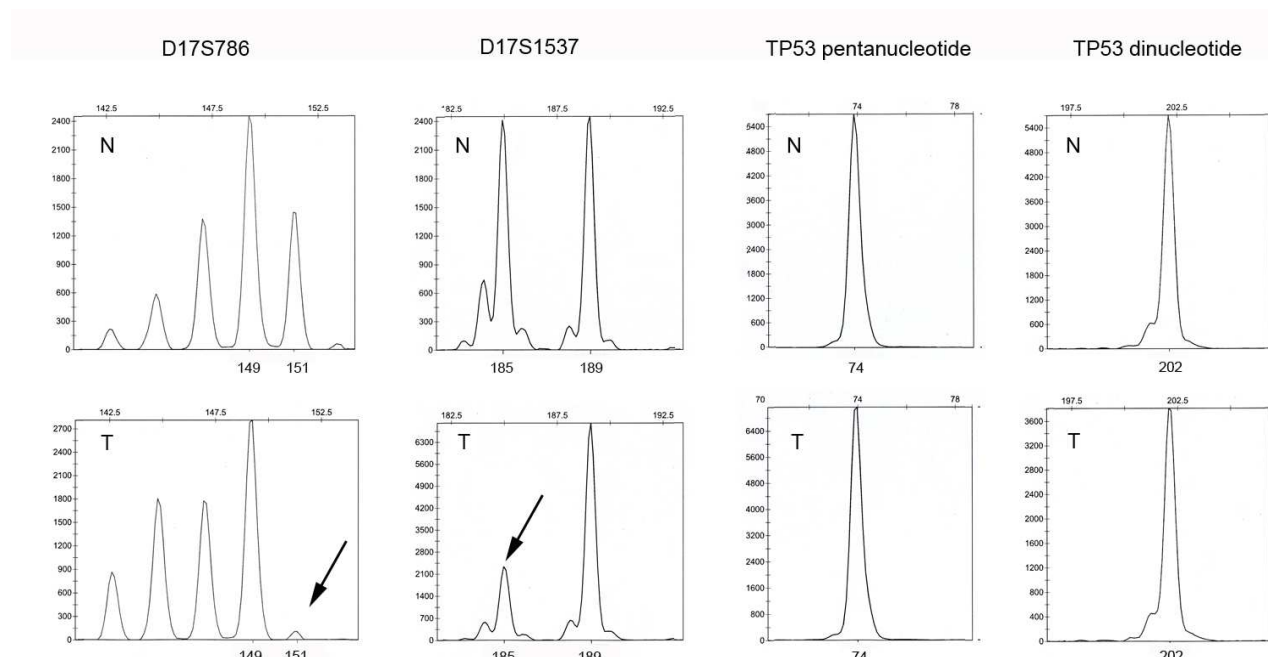
Broj pacijenta	Egzon / intron	Kodon	Nukleotidna zamena	Predviđeni efekat
1	egzon 5	144	CAG→CAC <sup>a</sup>	Gln→Hist
22	egzon 5	158	CGC→CAC	Arg→His
	egzon 8	267	CGG→TGG	Arg→Trp
	egzon 8	286	GAA→TAA <sup>a</sup>	Glu→Stop
25	egzon 5	144	CAG→CAC	Gln→Hist
27	egzon 5	144	CAG→CAC	Gln→Hist
30	egzon 5	144	CAG→CAC	Gln→Hist
32	intron 9	-	TGG→CGG	Polimorfizam
40	egzon 6	193	CAT→CGT	His→Arg
	egzon 6	208	GAC→GGC <sup>a</sup>	Asp→Gly
42	egzon 6	195	ATC→ACC	Ile→Thr
	egzon 7	231	ACC→ACCT	frameshift
89	egzon 8	289	CTC→CTTC <sup>a</sup>	frameshift

<sup>a</sup>Mutacije koje nikada ranije nisu pokazane u uzorcima pacijenata obolelih od malignih glioma (<http://p53.bii.a-star.edu.sg>)

Pojedinačno posmatrano, identifikovali smo 10 nukleotidnih zamena, od kojih 9 dovode do promene aminokiselinske sekvence p53 proteina (engl. missense), dok jedna prekida dalju sintezu proteinskog lanca (engl. nonsense). Dve mutacije nastaju kao posledica umetanja nukleotida (engl. insertion) i takodje dovode do promena u aminokiselinskoj sekvenci p53 proteina. Jedna identifikovana mutacija predstavlja polimorfizam i nalazi se u intronu 9. Od ukupno 13 identifikovanih promena, 4 nikada ranije nisu opisane u uzorcima malignih glioma (podaci preuzeti sa <http://p53.bii.a-star.edu.sg>). To su „missense“ mutacije u kodonima 144 i 208, zatim „nonsense“ mutacija u kodonu 286 i „frameshift“ mutacija u kodonu 289, koje dovode do sinteze aberantnog p53 proteina.

### 4.3.2 Analiza gubitka heterozigotnosti *p53* tumor supresora

Dalja analiza promena u *p53* genu uključivala je proveru gubitka heterozigotnosti (LOH analiza) u tumorskim uzorcima u odnosu na odgovarajuće kontrolne uzorke fragmentnom analizom (slika 32).



**Slika 32.** LOH analiza 4 mikrosatelitska markera *p53* gena kod tumorskog (T) u odnosu na normalni uzorak (N); strelice pokazuju alele koji se gube u tumorskim uzorcima. Markeri TP53 pentanucleotide i TP53 dinucleotide su neinformativni jer su prisutni u homozigotnom obliku.

Dobijeni rezultati za svaki od 4 ispitivana mikrosatelitska lokusa su dati u tabeli 18. Od 30 analiziranih uzoraka 29 su bili heterozigoti, tj. informativni za bar jedan od ispitivanih lokusa, a kod 20,7% (7 od 28) je detektovan LOH.

Tabela 18. Rezultat LOH analize *p53* lokusa

R.br.	Broj pacijenta	LOH p53			
		D17S786	D17S1537	TP53 penta-nucleotide	TP53 di-nucleotide
1	1	I	NI	NI	NI
2	2	I	NI	NI	NI
3	6	NI	I	NI	NI
4	8	I	NI	NI	NI
5	11	I	NI	NI	NI
6	22	LOH-MSI	I	NI	NI
7	25	NI	LOH	NI	NI
8	27	I	NI	NI	NI
9	30	I	I	NI	NI
10	32	I	I	NI	NI
11	34	I	LOH	NI	NI
12	35	NI	I	NI	NI
13	38	I	I	NI	NI
14	40	I	NI	NI	NI
15	41	LOH	NI	NI	NI
16	42	I	NI	NI	NI
17	45	I	I	NI	NI
18	46	NI	NI	NI	NI
19	52	I	NI	NI	NI
20	53	NI	I	NI	NI
21	54	NI	LOH	NI	NI
22	55	I	NI	NI	NI
23	59	I	I	NI	NI
24	82	I	NI	NI	NI
25	83	I	I	NI	NI
26	84	I	I	NI	NI
27	85	NI	LOH	NI	NI
28	86	I	I	NI	NI
29	87	NI	I	NI	NI
30	89	NI	I	NI	NI

I-informativni marker (heterozigot), NI-neinformativni marker (homozigot),  
LOH-gubitak heterozigotnosti

Rezultati mutacione i fragmentne analize pokazali su da je *p53* tumor supresor inaktiviran kod 12 pacijenata, što čini 40% analiziranog uzorka.

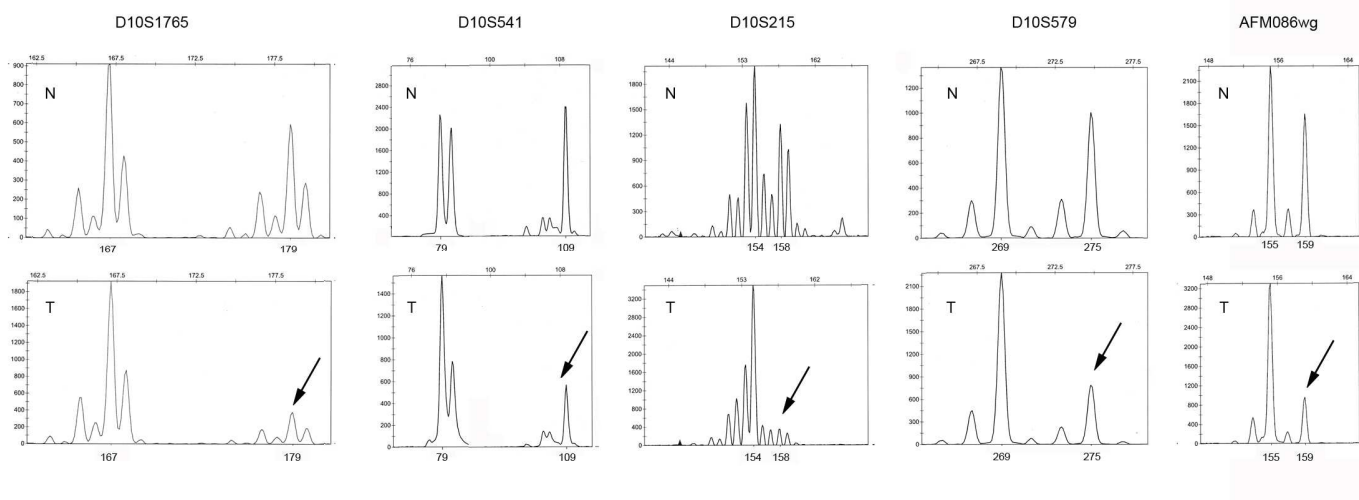
### 4.3.3 Analiza gubitka heterozigotnosti *PTEN* tumor supresora

Gubitak heterozigotnosti *PTEN* tumor supresora takođe je proučavan fragmentnom analizom i dobijeni rezultati za 5 ispitivanih mikrosatelitskih lokusa su predstavljeni u tabeli 19 i na slici 33.

**Tabela 19.** Rezultat LOH analize *PTEN* lokusa

R.br.	Broj pacijenta	LOH <i>PTEN</i>				
		D10S1765	D10S541	D10S215	D10S579	afm086wg
1	1	LOH	NI	LOH	LOH	NI
2	2	LOH	I	LOH	I	NI
3	6	I-LOH	LOH	I	NI	NI
4	8	I	NI	I-MSI	I	NI
5	11	NI	NI	LOH	I	NI
6	22	NI-MSI	NI	NI	NI	NI
7	25	LOH	NI	LOH-MSI	LOH	NI
8	27	I	NI	I-MSI	NI	I
9	30	LOH	NI	LOH-MSI	NI	NI
10	32	LOH	NI	I-MSI	NI	NI
11	34	I	NI	I-MSI	NI	NI
12	35	LOH	NI	I	NI	NI
13	38	I	I	LOH	I	NI
14	40	I	NI	LOH	I	NI
15	41	LOH	NI	I-MSI	NI	NI
16	42	I	NI	NI-MSI	NI	NI
17	45	LOH	NI	LOH	NI	NI
18	46	LOH	I	LOH	LOH	NI
19	52	NI	I	I	I	LOH
20	53	I	NI	I-MSI	NI	NI
21	54	I	NI	I	I	NI
22	55	LOH	NI	NI	NI	NI
23	59	I	NI	I	LOH	I
24	82	I	NI	I	NI	NI
25	83	I	NI-MSI	LOH	LOH	NI
26	84	LOH	NI	I	LOH	NI
27	85	NI	NI-MSI	NI	NI	NI
28	86	LOH	NI	I	NI	NI
29	87	I	NI-MSI	I-MSI	I	NI
30	89	LOH	NI-MSI	LOH	NI	NI

I-informativni marker (heterozigot), NI-neinformativni marker (homozigot), LOH-gubitak heterozigotnosti

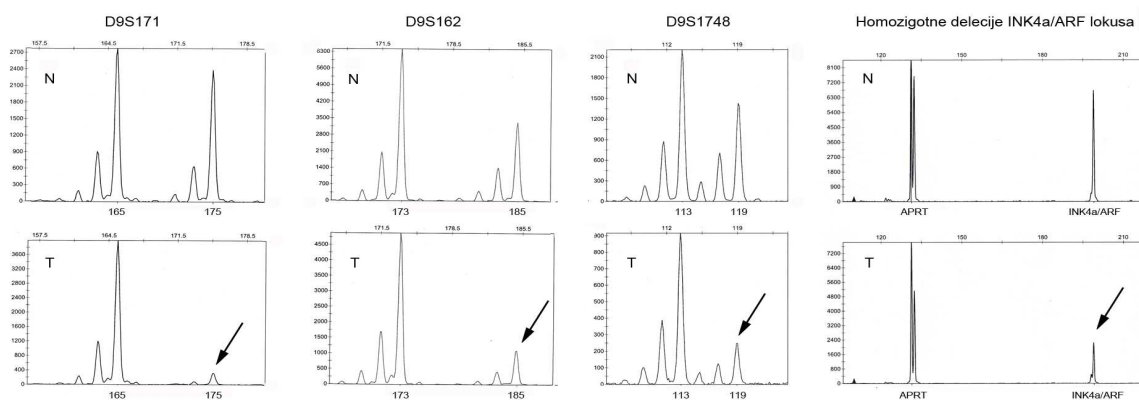


**Slika 33.** LOH analiza 5 mikrosatelitskih markera *PTEN* gena kod tumorskog (T) u odnosu na normalni uzorak (N); strelice pokazuju alele koji se gube u tumorskim uzorcima.

Od 30 ispitivanih uzoraka 28 su bili heterozigoti za bar jedan od ispitivanih lokusa, pri čemu je LOH pokazan kod 20 uzoraka, te je frekvencija gubitka jednog alela ovog gena izrazito visoka (71,4%). Inaktivacija *PTEN*-a predstavlja i najčešći događaj u analiziranoj grupi uzoraka jer je prisutna kod 20 od 30 pacijenata (66,7%).

#### 4.3.4 Analiza gubitka heterozigotnosti i homozigotnih delecija *p16* tumor supresora

Inaktivacija *p16* tumor supresora je proučavana analizom gubitka heterozigotnosti, a zatim i detekcijom prisustva homozigotnih delecija (slika 34).



**Slika 34.** Analiza gubitka heterozigotnosti i homozigotnih delecija kod tumorskog (T) u odnosu na normalni uzorak (N); strelice pokazuju alele koji se gube u tumorskim uzorcima.

Dobijeni rezultati za svaki od 3 ispitivana mikrosatelitska lokusa (D9S171, D9S1748, D9S5162) su prikazani u tabeli 20. U slučaju *p16*, za razliku od *p53* i *PTEN* tumor supresor gena, svih 30 uzoraka je informativno tj. heterozigoti su za bar jedan ispitivani lokus.

**Tabela 20.** Rezultat LOH analize i prisustva homozigotnih delecija *p16* lokusa

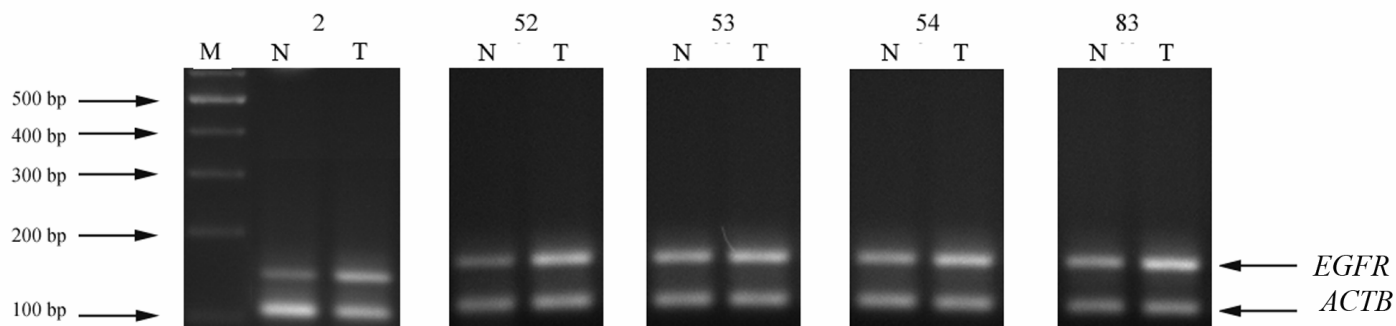
R.br.	Broj pacijenta	LOH <i>p16</i>			Homozigotne delecije <i>p16</i>
		D9S171	D9S162	D9S1748	
1	1	LOH	I	I	
2	2	I	I	NI	
3	6	I	I	I	HD
4	8	I	I	NI	HD
5	11	NI	LOH	I	HD
6	22	LOH	LOH	LOH	
7	25	I	I	I	HD
8	27	I	I	NI	
9	30	NI	I	I	
10	32	NI	LOH	I	HD
11	34	LOH	LOH	LOH	HD
12	35	I	I	I	
13	38	I	I	I	
14	40	NI	NI	LOH	HD
15	41	LOH	NI	I	HD
16	42	LOH	LOH	I	
17	45	NI	NI	I	HD
18	46	LOH	NI	LOH	
19	52	I	I	I	
20	53	I	I	I	
21	54	I	I	I	
22	55	NI	LOH	I	HD
23	59	LOH	NI	I	
24	82	I	I	I	
25	83	NI	NI	I	
26	84	LOH	NI	I	
27	85	LOH	LOH	LOH	
28	86	I	NI	I	
29	87	I	I	I	
30	89	LOH	LOH	I	HD

I-informativni marker (heterozigot), NI-neinformativni marker (homozigot), LOH-gubitak heterozigotnosti

Od 30 uzoraka u14 tumora je prisutan gubitak jednog alela (46,7%). Analiza prisustva homozigotnih delecija u okviru *INK4a/ARF* lokusa je pokazala da su oba alela *p16* gena deletirana kod 11 pacijenata (36,7%). Rezultati analiza gubitka heterozigotnosti i homozigotnih delecija *p16* tumor supresora, pokazali su da je ovaj gen inaktiviran kod 18 pacijenata (60%).

#### 4.3.5 Amplifikacioni status *EGFR* onkogeno

Amplifikacioni status *EGFR*-a analiziran je diferencijalnim PCR-om (slika 35). Dobijeni rezultati su pokazali da je povećan broj kopija ovog gena prisutan u genomima 13 glijalnih tumora (43,3%).



**Slika 35.** Analiza amplifikacionog statusa *EGFR* gena kod tumorskih uzoraka (T) u odnosu na normalne uzorke (N). Kod svih predstavljenih uzoraka na slici je detektovana amplifikacija *EGFR*-a.



#### 4.3.6 Povezanost genskih promena sa histopatološkim i demografskim parametrima i genomskom nestabilnošću

Nakon analize promena u *p53*, *PTEN*, *p16* i *EGFR* genima pristupili smo korelacionoj analizi dobijenih rezultata sa histopatološkim i demografskim podacima pacijenata (tabela 21).

**Tabela 21.** Odnos učestalosti promena u *p53*, *PTEN*, *p16* i *EGFR* genima i histopatoloških parametara i stepena genomске nestabilnosti

Parametar	<i>p53</i>			<i>PTEN</i>		<i>p16</i>		<i>EGFR</i>	
	BP	BP %	p	BP %	p	BP %	p	BP %	p
<b>Histološki podtip</b>									
Anaplastični astrocitomi	8	6 (75,0)	<b>0,03</b>	2 (25,0)	<b>0,007</b>	6 (75,0)	0,28	1 (12,5)	<b>0,047</b>
Glioblastomi multiforme	22	6 (27,3)		18 (81,8)		12 (54,5)		12 (54,5)	
<b>Pol</b>									
Muški	19	7 (36,8)	0,47	13 (68,4)	0,55	11 (57,9)	0,53	7 (36,8)	0,29
Ženski	11	5 (45,4)		7 (63,6)		7 (63,6)		6 (54,5)	
<b>Godine</b>									
≤50g	7	4 (57,1)	0,27	1 (14,3)	<b>0,002</b>	3 (42,8)	0,27	2 (28,6)	0,32
>50g	23	8 (34,8)		19 (82,6)		15 (65,2)		11 (47,8)	
<b>Ukupna genomска nestabilnost</b>									
Niska	13	4 (36,4)	0,53	8 (61,3)	0,45	8 (61,5)	0,59	6 (46,2)	0,54
Visoka	17	8 (42,1)		12 (70,6)		10 (58,8)		7 (41,2)	
<b>Mikrosatelitska nestabilnost</b>									
Niska	14	6 (42,9)	0,53	9 (64,3)	0,55	7 (50,0)	0,25	6 (42,8)	0,62
Visoka	16	6 (37,5)		11 (68,8)		11 (68,8)		7 (43,8)	
<b>Hromozomska nestabilnost</b>									
Niska	13	6 (46,2)	0,41	7 (53,8)	0,18	8 (61,5)	0,59	7 (53,8)	0,26
Visoka	17	6 (35,3)		13 (76,5)		10 (58,8)		6 (35,3)	

<sup>a</sup> Podebljane vrednosti su statistički značajne; <sup>b</sup>BP, broj pacijenata u grupi

Primenom „Fisher exact“ statističkog testa pokazano je da se promene u *p53* genu javljaju značajno češće u tumorima nižeg gradusa (AA) u poređenju sa primarnim glioblastomima (75% u odnosu na 27,3%,  $p=0,03$ ). Takođe, promene u ovom genu se češće javljaju u grupi pacijenata mlađih od 50 godina, mada bez statističke značajnosti (57% u odnosu na 34% starijih pacijenata). Suprotno ovome, promene u *PTEN*-u značajno češće se javljaju u uzorcima pacijenata sa primarnim glioblastomima u odnosu na pacijente sa anaplastičnim astrocitomima (81,8% u odnosu na 25%,  $p=0,007$ ), kao i kod pacijenata starijih od 50 godina (82,6% u odnosu na 14,3% mlađih pacijenata,  $p=0,002$ ). Promene u *p16* genu su prisutne u oba podtipa glioma, i javljaju se kod 75% uzoraka anaplastičnih astrocitoma i 54,5% uzoraka glioblastoma gradusa IV. Promene u ovom genu se češće javljaju kod pacijenata starijih od 50 godina (65,2% u odnosu na 42,8% mlađih pacijenata). Amplifikacija *EGFR* gena je karakteristična za uzorke GBM gradusa IV (54,5% u odnosu na 14,3% uzoraka AA,  $p=0,047$ ), kao i za grupu starijih pacijenata (47,8% u odnosu na 28,6% pacijenata mlađih od 50 godina). Amplifikovan *EGFR* se značajno češće javlja u grupi pacijenata starijih od 60 godina (64,3% u poređenju sa 25% pacijenata mlađih od 60 godina,  $p=0,03$ ).

#### **4.4 Međuzavisnost promena u analiziranim genima**

##### **4.4.1 Međuzavisnost promena u *p53*, *PTEN*, *p16* i *EGFR* genima**

Sledeći korak u našem radu je bila međusobna korelaciona analiza identifikovanih promena u analiziranim genima. Uzimajući u obzir sve detektovane promene u *p53* i *PTEN* tumor supresorima, uočava se da je od 30 pacijenata njih 6 imalo promene u oba gena, kod 5 je inaktiviran samo *p53*, 14 ih je imalo aberantan *PTEN*, dok kod 5 pacijenata nije pronađena ni jedna promena u ovim genima (tabela 22). Statistička analiza distribucije promena u *p53* i *PTEN* genima „Fisher exact“ testom nije pokazala značajnu povezanost ovih gena.

**Tabela 22.** Povezanost ukupnih promena u *p53* i *PTEN* tumor supresor genima

Varijabla	<i>p53</i> promene		p vrednost
	Da BP (%)	Ne BP (%)	
<i>PTEN</i> promene			
Da	6 (30,0)	14 (70,0)	0.25
Ne	5 (50,0)	5 (50,0)	

Analiza međuzavisnosti promena u *p53* i *p16* genima, takođe nije pokazala da se u analiziranim uzorcima ovi geni značajno češće javljaju zajedno. Od 30 analiziranih pacijenata 9 je imalo promene u oba gena, kod 9 pacijenata su detektovane promene samo u *p16* genu, 3 pacijenta su imali inaktiviran *p53* gen, dok kod preostalih 9 nisu detektovane promene ni u jednom od ova dva gena (tabela 23).

**Tabela 23.** Povezanost ukupnih promena u *p53* i *p16* tumor supresor genima

Varijabla	<i>p53</i> promene		p vrednost
	Da BP (%)	Ne BP (%)	
<i>p16</i> promene			
Da	9 (50,0)	9 (50,0)	0.16
Ne	3 (25,0)	9 (75,0)	

Promene u *p53* i u *EGFR* genu detektovane su kod samo 4 pacijenta, dok 9 pacijenata nije imalo promene ni u jednom od ovih gena. 9 pacijenata je imalo amplifikovan *EGFR*, a preostalih 8 inaktiviran *p53* (tabela 24).

**Tabela 24.** Povezanost ukupnih promena u *p53* i *EGFR* genima

Varijabla	<i>p53</i> promene		p vrednost
	Da BP (%)	Ne BP (%)	
<i>EGFR</i> promene			
Da	4 (30,8)	9 (69,2)	0.30
Ne	8 (47,1)	9 (52,9)	

Istovremena inaktivacija *PTEN* i *p16* gena takođe nije statistički značajan događaj, iako je detektovana kod 13 pacijenata. Preostalih 7 pacijenata imalo je inaktiviran *PTEN*, 5 njih inaktiviran *p16*, dok kod 5 nisu detektovane promene ni u jednom od ova dva gena (tabela 25).

**Tabela 25.** Povezanost ukupnih promena u *PTEN* i *p16* tumor supresor genima

Varijabla	<i>PTEN</i> promene		p vrednost
	Da BP (%)	Ne BP (%)	
<i>p16</i> promene			
Da	13 (72,2)	5 (27,8)	0.34
Ne	7 (58,3)	5 (41,7)	

Sličan rezultat je dobijen i kada su analizirane promene u *PTEN* i *EGFR* genima koje su zajedno prisutne kod 10 pacijenata. Kod istog broja pacijenata (10) su detektovane promene samo u *PTEN*-u dok su samo 3 pacijenta imali amplifikovan *EGFR*. Čak 7 pacijenata nije imalo promene ni u jednom od ovih gena (tabela 26).

**Tabela 26.** Povezanost ukupnih promena u *PTEN* i *EGFR* genima

Varijabla	<i>PTEN</i> promene		p vrednost
	Da BP (%)	Ne BP (%)	
<i>EGFR</i> promene			
Da	10 (76,9)	3 (23,1)	0.26
Ne	10 (58,8)	7 (41,2)	

Promene u *p16* i *EGFR* genima zajedno su detektovane kod 7 analiziranih pacijenata, kod 11 pacijenata je nađena promena u *p16* genu, kod 6 pacijenata je amplifikovan *EGFR*, dok isti broj pacijenata ima neizmenjena oba gena (tabela 27).

**Tabela 27.** Povezanost ukupnih promena u *EGFR* i *p16* genima

Varijabla	<i>EGFR</i> promene		p vrednost
	Da BP (%)	Ne BP (%)	
<i>p16</i> promene			
Da	7 (38,9)	11 (61,1)	0.41
Ne	6 (50,0)	6 (50,0)	

Proučavanjem sveukupnih promena u analiziranim genima uočava se da je najređi slučaj kada su sva četiri gena „wild type“ što je detektovano kod samo jednog pacijenta (3,3%) (tabela 28). Sledeći događaj po učestalosti su istovremene promene u sva 4 gena, što je nađeno kod dva pacijenta (6,6%). Najčešći događaj u našoj grupi pacijenata je promena dva od četiri gena, što je detektovano kod 10 pacijenata (33,3%). Kao što se vidi iz tabele 28, promena u jednom i promene u tri gena se u našoj grupi uzoraka javljaju sa približno istom učestalošću (26,4% za jedan gen i 29,7% za tri gena). Međutim, nijedan genotip nije statistički značajno prisutniji od ostalih genotipova u ispitivanom setu uzoraka.

**Tabela 28.** Učestalosti različitih *p53/PTEN/p16/EGFR* genotipova kod 30 pacijenata sa gliomima

Genotip	Frekvencija
p53 <sup>a</sup> /PTEN <sup>+</sup> /EGFR <sup>+</sup> /p16 <sup>+</sup>	1/30 (3,3%)
p53 <sup>-b</sup> /PTEN <sup>+</sup> /EGFR <sup>+</sup> /p16 <sup>+</sup>	2/30 (6,6%)
p53 <sup>+</sup> /PTEN <sup>-</sup> /EGFR <sup>+</sup> /p16 <sup>+</sup>	3/30 (9,9%)
p53 <sup>+</sup> /PTEN <sup>+</sup> /EGFR <sup>-</sup> /p16 <sup>+</sup>	2/30 (6,6%)
p53 <sup>+</sup> /PTEN <sup>+</sup> /EGFR <sup>+</sup> /p16 <sup>-</sup>	1/30 (3,3%)
$\Sigma^c$	8/30 (26,4%)
p53 <sup>-</sup> /PTEN <sup>-</sup> /EGFR <sup>+</sup> /p16 <sup>+</sup>	0/30 (0%)
p53 <sup>-</sup> /PTEN <sup>+</sup> /EGFR <sup>-</sup> /p16 <sup>+</sup>	0/30 (0%)
p53 <sup>-</sup> /PTEN <sup>+</sup> /EGFR <sup>+</sup> /p16 <sup>-</sup>	3/30 (9,9%)
p53 <sup>+</sup> /PTEN <sup>-</sup> /EGFR <sup>-</sup> /p16 <sup>+</sup>	3/30 (9,9%)
p53 <sup>+</sup> /PTEN <sup>-</sup> /EGFR <sup>+</sup> /p16 <sup>-</sup>	4/30 (13,2%)
p53 <sup>+</sup> /PTEN <sup>+</sup> /EGFR <sup>-</sup> /p16 <sup>-</sup>	0/30 (0%)
$\Sigma^d$	10/30 (33,0%)
p53 <sup>-</sup> /PTEN <sup>-</sup> /EGFR <sup>-</sup> /p16 <sup>+</sup>	1/30 (3,3%)
p53 <sup>-</sup> /PTEN <sup>+</sup> /EGFR <sup>-</sup> /p16 <sup>-</sup>	1/30 (3,3%)
p53 <sup>+</sup> /PTEN <sup>-</sup> /EGFR <sup>-</sup> /p16 <sup>-</sup>	4/30 (13,2%)
p53 <sup>-</sup> /PTEN <sup>-</sup> /EGFR <sup>+</sup> /p16 <sup>-</sup>	3/30 (9,9%)
$\Sigma^e$	9/30 (29,7%)
p53 <sup>-</sup> /PTEN <sup>-</sup> /EGFR <sup>-</sup> /p16 <sup>-</sup>	2/30 (6,6%)

<sup>a</sup> „wild type“ gen (+), <sup>b</sup> Promenjen gen (-), <sup>c</sup> Ukupan broj pacijenata sa jednim promenjenim genom, <sup>d</sup> Ukupan broj pacijenata sa dva promenjena gena, <sup>e</sup> Ukupan broj pacijenata sa tri promenjena gena

#### 4.4.2 Međuzavisnost promena u *p53*, *PTEN* i *p16* tumor supresorima

Da bi utvrdili međusobnu povezanost analiziranih tumor supresora pristupili smo korelacionoj analizi statističkim „Fisher exact“ testom. Pacijente smo podelili u dve grupe za svaki od tri analizirana tumor supresora u zavisnosti da li je inaktiviran ili nepromenjen („wild type“). Na taj način smo želeli da proverimo da li u našim uzorcima postoji značajno češći obrazac inaktivacije analiziranih tumor supresora.

**Tabela 29.** Veze između različitih *p53/PTEN/p16* genotipova

Varijabla	<i>PTEN</i> inaktiviran <i>p53</i> promene			<i>PTEN</i> „wild type“ <i>p53</i> promene		
	Da BP (%)	Ne BP (%)	p vrednost	Da BP (%)	Ne BP (%)	p vrednost
<i>p16</i> promene						
Da	5	8	0.28	4	1	0.26
Ne	1	6		2	3	

**Tabela 30.** Veze između različitih *p53/PTEN/p16* genotipova

Varijabla	<i>p53</i> inaktiviran <i>PTEN</i> promene			<i>p53</i> „wild type“ <i>PTEN</i> promene		
	Da BP (%)	Ne BP (%)	p vrednost	Da BP (%)	Ne BP (%)	p vrednost
<i>p16</i> promene						
Da	5	4	0.50	7	2	0.50
Ne	1	2		6	3	

**Tabela 31.** Veze između različitih *p53/PTEN/p16* genotipova

Varijabla	<i>p16</i> inaktiviran <i>p53</i> promene			<i>p16</i> „wild type“ <i>p53</i> promene		
	Da BP (%)	Ne BP (%)	p vrednost	Da BP (%)	Ne BP (%)	p vrednost
<i>PTEN</i>						
Da	5	8	0.15	1	6	0.36
Ne	4	1		2	3	

Kao što se vidi iz Tabela 29, 30 i 31, ne postoji statistički značajna povezanost među analiziranim grupama.

#### 4.4.3 Veza identifikovanih gena iz AP-PCR DNK profila sa *p53*, *PTEN*, *p16* i *EGFR* genima

U cilju daljeg proučavanja mehanizma nastanka i progresije glioma, analizirali smo međusobnu zavisnost identifikovanih gena iz AP-PCR DNK profila svih pacijenata sa promenama u *p53*, *PTEN*, *p16* i *EGFR* genima (Tabela 32). Promene u *PDE4D* genu su statistički značajno češće prisutne u uzorcima sa „wild type“ *p53* i *p16* tumor supresorima ( $p=0,04$  i  $p=0,05$ ). Sa druge strane, promene u *INPP5A* se statistički značajno češće javljaju u uzorcima u kojima nije detektovana amplifikacija *EGFR* onkogeno ( $p=0,05$ ). Preostali identifikovani geni nisu pokazali povezanost sa promenama u poznatim tumor supresorima i amplifikacijom EGFR-a.

Zanimljivo je da ne postoji statistički značajna povezanost između inaktiviranog PTEN-a i bilo kojeg novog identifikovanog gena.

**Tabela 32.** Međusobna zavisnost promena identifikovanih gena sa statusom *p53*, *PTEN*, *p16* i *EGFR*

Gen	<sup>b</sup> BP	<i>p53</i>			<i>PTEN</i>			<i>p16</i>			<i>EGFR</i>		
		BP	%	<i>p</i>	BP	%	<i>p</i>	BP	%	<i>p</i>	BP	%	<i>p</i>
Total	30	12	40,0		20	66,7		18	60		13	43,3	
<b>LHFPL3</b>													
Da	10	5	50,0		7	70,0		5	50,0		5	50,0	
Ne	20	7	35,0	0,34	13	65,0	0,56	13	65,0	0,34	8	40,0	0,45
<b>SGCG</b>													
Da	8	4	50,0		4	50,0		6	75,0		5	62,5	
Ne	22	8	36,4	0,40	16	72,7	0,23	12	54,5	0,28	8	36,4	0,19
<b>PDE4D</b>													
Da	9	1	11,1		6	66,7		3	33,3		3	33,3	
Ne	21	11	50,0	<b>0,04<sup>a</sup></b>	14	66,7	0,67	15	71,4	<b>0,05</b>	10	47,6	0,38
<b>HTR4</b>													
Da	8	4	50,0		4	50,0		6	75,0		5	62,5	
Ne	22	8	36,4	0,40	16	72,7	0,23	12	54,5	0,28	8	36,4	0,19
<b>ITGB1</b>													
Da	8	4	50,0		4	50,0		6	75,0		5	62,5	
Ne	22	8	36,4	0,40	16	72,7	0,23	12	54,5	0,28	8	36,4	0,19
<b>INPP5A</b>													
Da	13	7	53,8		7	53,8		8	61,5		3	23,1	
Ne	17	5	29,4	0,16	13	76,5	0,18	10	58,8	0,59	10	58,8	<b>0,05</b>
<b>CPS1</b>													
Da	8	4	50,0		4	50,0		6	75,0		5	62,5	
Ne	22	8	36,4	0,40	16	72,7	0,23	12	54,5	0,28	8	36,4	0,19
<b>PROS1</b>													
Da	8	4	50,0		4	50,0		6	75,0		5	62,5	
Ne	22	8	36,4	0,40	16	72,7	0,23	12	54,5	0,28	8	36,4	0,19

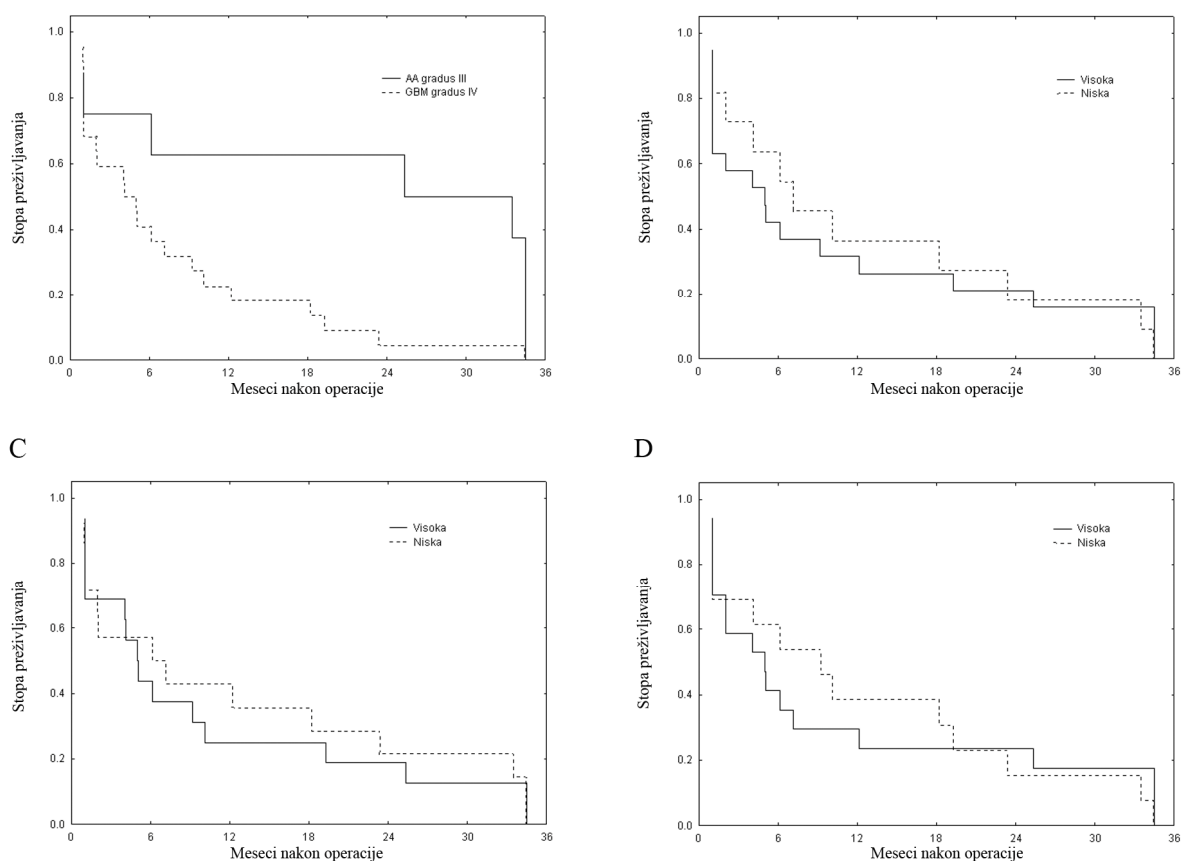
<sup>a</sup> Podebljane vrednosti su statistički značajne; <sup>b</sup>BP, broj pacijenata u grupi; LHFPL3- lipoma HMGIC fusion partner-like 3; SGCG- sarcoglycan, gamma; PDE4D- cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D; HTR4-5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4; ITGB1- integrin, beta 1; INPP5A- inositol polyphosphate-5-phosphatase; CPS1 - carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial; PROS1 - protein S (alpha)



## 4.5 Uticaj analiziranih genskih promena na preživljavanje pacijenata

### 4.5.1 Uticaj histološkog podtipa i genomske nestabilnosti na stopu preživljavanja pacijenata

Korišćenjem Kaplan & Meier (product-limit method) statističke analize preživljavanja, ispitivali smo preživljavanje pacijenata u zavisnosti od histološkog podtipa tumora, genomske nestabilnosti i svih analiziranih genskih alteracija. Pacijenti koji su imali dijagnozu glioblastoma gradusa IV imali su statistički značajno kraće preživljavanje u poređenju sa pacijentima sa nižim gradusom tumora ( $p=0,01$ , Slika 36A).



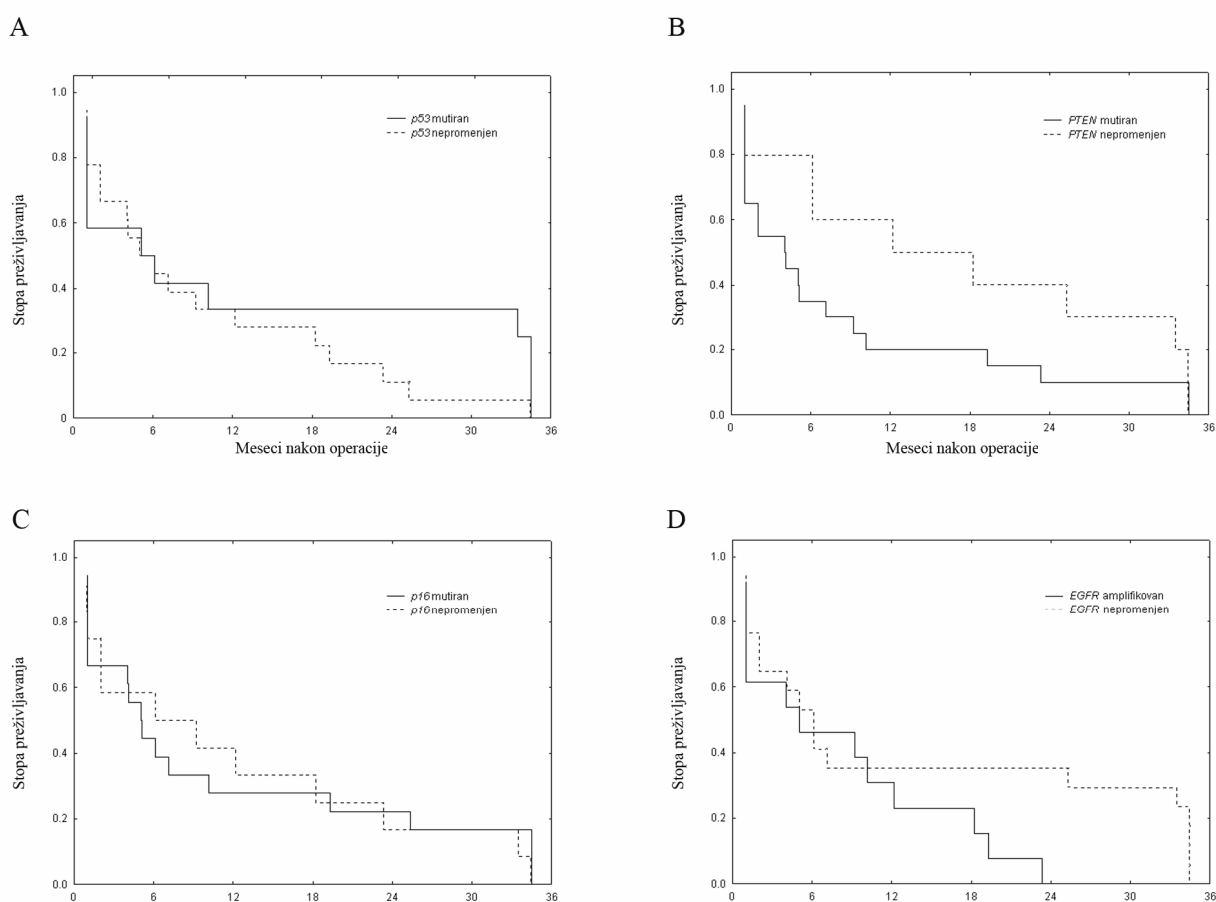
**Slika 36.** Kaplan-Meier krive preživljavanja. Razlike u preživljavanju pacijenata u zavisnosti od histopatološkog podtipa tumora, AA-anaplastični astrocitomi, GBM-glioblastoma multiforme,  $p=0,01$  (A), stepena ukupne genomske nestabilnosti (B), stepena mikrosatelitske nestabilnosti (C) i stepena hromozomske nestabilnosti (D).

Zatim smo analizirali preživljavanje pacijenata u odnosu na detektovanu genomsku nestabilnost izraženu frekvencom DNK promena. Za sva tri tipa genomske nestabilnosti formirane su po dve grupe pacijenata, sa visokim i niskim stepenom. Stepem ukupne

genomske nestabilnosti nije imao uticaj na stopu preživljavanja pacijenata, a slični rezultati su dobijeni i za mikrosatelitsku i hromozomsku nestabilnost (slika 36B,C,D).

#### 4.5.2 Promene u *p53*, *PTEN*, *p16* i *EGFR* genima i stope preživljavanja pacijenata

Dalje smo analizirali uticaj promena u *p53*, *PTEN* i *p16* tumor supresorima, kao i amplifikacije *EGFR*-a na preživljavanje pacijenata.

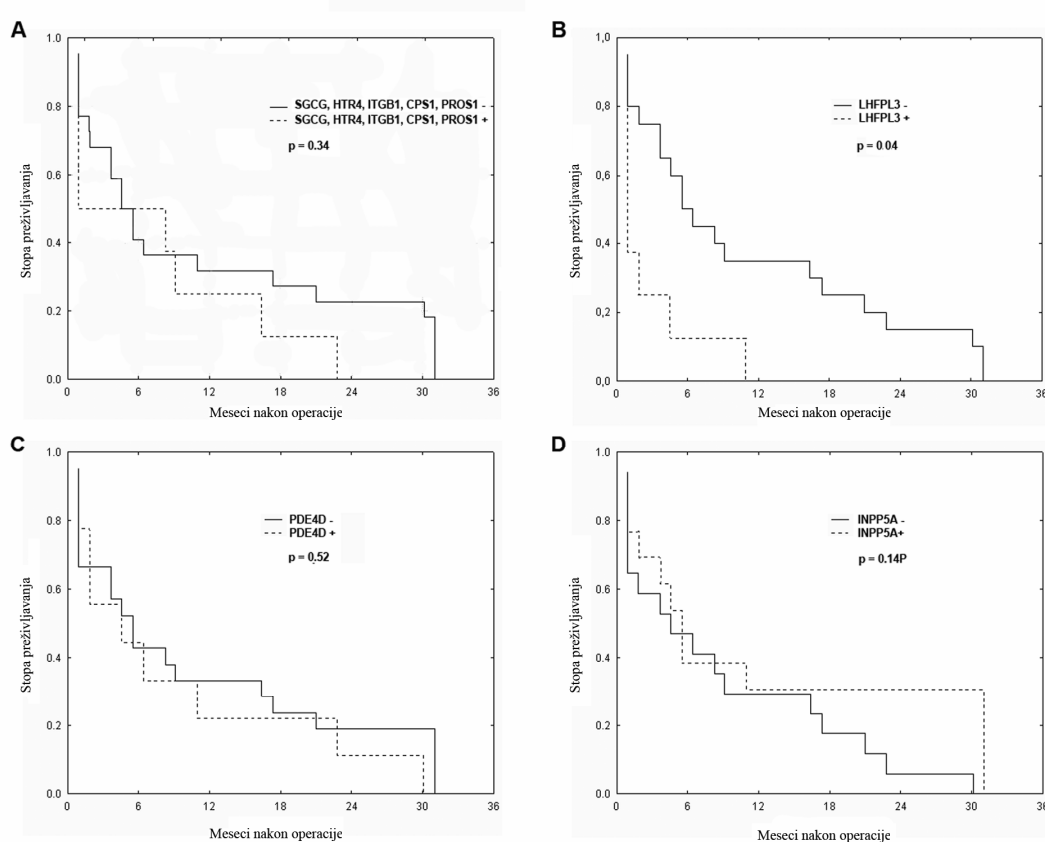


**Slika 37.** Kaplan-Meier krive preživljavanja. Razlike u preživljavanju pacijenata u zavisnosti od statusa *p53* gena (A), *PTEN* (B), *p16* (C) i *EGFR* gena (D). Ni u jednom slučaju nisu dobijeni statistički značajni rezultati.

Promene ni u jednom od ovih gena nisu značajno uticale na stope preživljavanja pacijenata (Slika 37), iako je uočena tendencija da promene u *PTEN*-u i *EGFR*-u skraćuju životni vek pacijenata nakon operacije.

### 4.5.3 Uticaj promena u identifikovanim genima iz AP-PCR DNK profila pacijenata na preživljavanje pacijenata

Preživljavanje svih 30 pacijenata je analizirano u odnosu na prisustvo ili odsustvo promena u identifikovanim genima koji do sada nisu povezani sa nastankom i progresijom glioma. Za svaki analizirani gen, pacijenti su podeljeni u dve grupe, sa i bez promena. Preživljavanje pacijenata sa promenama u *LHFPL3* genu je bilo značajno kraće u odnosu na pacijente kod kojih je ovaj gen nepromenjen ( $p=0,04$ , Fig. 38B).



**Slika 38.** Kaplan-Meier krive preživljavanja. Razlike u preživljavanju pacijenata u zavisnosti od statusa *SGCG*, *HTR4*, *ITGB1*, *CPS1* i *PROS1* (A), *LHFPL3*,  $p=0,04$  (B), *PDE4D* (C) i *INPP5A* gena (D).

Pacijenti sa pomenjenim *SGCG*, *HTR4*, *ITGB1*, *CPS1* i *PROS1* genima su imali kraći životni vek u odnosu na grupu pacijenata bez ovih promena, iako ovde nije pokazana statistička značajnost (Slika 38A). Promene *PDE4D* i *INPP5A* gena izgleda da ne utiču na stope preživljavanja pacijenta (Slika 38C,D).

## 5 DISKUSIJA

Gliomi predstavljaju najbrojniju grupu malignih tumora centralnog nervnog sistema, u okviru kojih se glioblastomi multiforme (GBM) izdvajaju kao najfrekventnija i najmalignija podgrupa. Karakterizacijom genetičkih i epigenetičkih promena u gliomima omogućen je uvid u osnovne mehanizme nastanka ovog oboljenja, Iako većina procesa koji dovode do maligne transformacije još uvek nije detaljno objašnjena, jasno je da je reč o izuzetno kompleksnim odnosima, koji obezbeđuju tumorskim ćelijama brzo prilagođavanje i dinamični odgovor na specifične uslove mikrosredine. Efikasnije razumevanje složenih procesa unutar ćelija tumora, kao i između njih, doprinosi boljem terapijskom pristupu, kao i preciznijem postavljanju dijagnoze. Profilisanje glioma, detaljnijom klasifikacijom na osnovu genskih promena i ekspresionog obrasca, vodi ka implementaciji novih lekova i personalizovanoj terapiji, što predstavlja mehanizam prevazilaženja rezistencije na standardne hemioterapeutike. Takođe, osnovni uslov za povećanje stope preživljavanja pacijenata obolelih od glioma predstavlja identifikacija i povezivanje svih molekularnih događaja koji dovode do nastanka i progresije ove bolesti. Uprkos napretku u dijagnostici i lečenju ostalih tipova tumora, u slučaju glioma, a naročito glioblastoma, nije postignut značajan napredak u odnosu na preživljavanje obolelih. Gliomi i danas predstavljaju neizlečivu bolest, jer ne postoje metode i biomarkeri za njihovu ranu detekciju, pa se pregled pacijenata vrši nakon pojave kliničkih simptoma, kada je bolest najčešće već u podmaklom stadijumu (Kelly, 2010).

Najmaligniji i, nažalost, najučestaliji tip glioma su glioblastomi (GBM). Na osnovu mehanizma nastanka razlikujemo primarne, koji nastaju *de novo* i u grupi starijih pacijenata, i sekundarne glioblastome, za koje je karakteristična progresija iz astrocitoma nižih gradusa prevashodno kod mlađih pacijenata. Međutim, histološki ove dve podgrupe GBM je skoro nemoguće razlikovati, što predstavlja značajan problem u dijagnostici i određivanju adekvatne terapije. Iako je razjašnjen redosled pojedinih događaja tokom nastanka sekundarnih GBM, mehanizam progresije primarnih GBM je nepoznat, prvenstveno zbog nemogućnosti izolacije prekursorskih ćelija ovog podtipa. Osim toga,

izražena heterogenost tumorske mase, kao i veliki broj faza takom progresije tumora otežavaju identifikaciju potencijalnih biomarkera za predviđanje ishoda bolesti i odgovora na terapiju. Pored promene ekspresije pojedinih specifičnih gena, za proces nastanka i progresije glioma je karakterističan visok stepen genomske nestabilnosti, pri čemu je naročito izražena hromozomska nestabilnost (Kanu i Hughes, 2009). Detekcija specifičnih genskih promena, ali i kvantifikacija i karakterizacija ukupne genomske nestabilnosti, kao i njenih podtipova, predstavlja osnovni cilj ove doktorske disertacije. Na osnovu toga, pokušaćemo da identifikujemo odgovarajuće mehanizme koji dovde do nastanka primarnih i sekundarnih glioblastoma, kao i potencijalne biomarkere koji bi omogućili bolju dijagnozu i prognozu toka i ishoda bolesti.

DNK profilisanje metodom AP-PCR-a (engl. Arbitrarily primed polymerase chain reaction) omogućava brzu i jednostavnu detekciju i karakterizaciju promenjenih regiona u genomima tumorskih ćelija, u poređenju sa odgovarajućim normalnim tkivom. Prednost ove metode se ogleda u brznoj analizi kompletnog genoma, bez prethodnog poznavanja DNK sekvenci koje se proučavaju (Peinado i saradnici, 1992). Primenom ove metode moguće je detektovati skoro sve tipove genetičkih promena karakterističnih za proces kancerogeneze: homozigotne delecije, gubitak heterozigotnosti, veće i manje insercije i delecije, translokacije, amplifikacije, kao i tačkaste mutacije (Navarro i Jorcano, 1999). Naši rezultati su, takođe, potvrdili da je AP-PCR izuzetno koristan metod za detekciju i karakterizaciju genetičkih promena u gliomima. Poređenjem parova DNK profila tumorskog tkiva i krvi detektovali smo brojne kvalitativne i kvantitativne promene, što ukazuje na značajan nivo genomske nestabilnosti kod svih pacijenata. Kvalitativne promene se uočavaju kao gubitak ili pojava nove trake usled tačkastih mutacija na mestima interakcije amplimera i matrice, i predstavljaju zbirnu meru mikrosatelitske nestabilnosti (MIN) i nestabilnosti pojedinačnih nukleotida (PIN). Za razliku od njih, kvantitativne razlike koje se uočavaju kao promene u intenzitetu traka, nastaju usled delecija ili amplifikacija većih hromozomskih regiona i ukazuju na hromozomsku nestabilnost (CIN). Iako je uobičajeno da se mikrosatelitska i hromozomska nestabilnost međusobno isključuju, u našem slučaju, oba tipa genomske nestabilnosti su podjednako zastupljena u tumorskim uzorcima. Sličan rezultat kojim se potvrđuje istovremeno prisustvo MIN i CIN u

glioblastomima su dobili Leung i saradnici (2000) kod pacijenata sa naslednim mutacijama MMR gena (Leung i saradnici, 2000). Iako su rezultati nekih studija suprotni od naših, i ukazuju na nisku zastupljenost MIN u gliomima (Martinez i saradnici, 2005), ovo može biti posledica različitih metoda u detekciji mikrosatelitske nestabilnosti. Naime, primena AP-PCR-a omogućava ispitivanje velikog broja nasumičnih regiona, za razliku od samo nekoliko specifičnih lokusa koji se analiziraju drugim metodama. Visok stepen genomske nestabilnosti detektovan u svim tumorskim uzorcima ukazuje na prisustvo brojnih nasumičnih i specifičnih mutacija, koje pogađaju “kancer gene”, onkogene i tumor-supresore, obezbeđujući ćelijama tumora selektivnu prednost u rastu i ekspresiju tzv. „mutator“ fenotipa ((Loeb, 1991, 2001, Vogelstein i Kinzler, 2001).

Detaljnija statistička analiza nije ukazala na povezanost stepena genomske nestabilnosti sa histopatološkim parametrima, iako postoji trend da stariji pacijenti imaju izraženiju genomsku nestabilnost, što se može povezati sa akumulacijom genetičkih promena tokom starenja. Prema evolucionoj teoriji nastanka kancera, očekuje se da je povećana genomski nestabilnost karakteristična za rane faze progresije kancera, gde dovodi do ubrzavanja procesa somatske evolucije povećanjem međućelijske genetičke varijabilnosti (Breivik and Gaudernack, 1999, Cahill, Kinzler, 1999). Pored pozitivnog efekta na ćelijsku proliferaciju, povećana stopa mutacija dovodi do akumulacije štetnih ili letalnih promena, što predstavlja genetičko opterećenje ćelije i može dovesti do smrti (Tomlinson i saradnici, 1996). Samo one ćelije u kojima broj mutacija ne prelazi prag tolerancije imaju mogućnost proliferacije. Zbog toga je očekivano da se ekspresija “mutator” fenotipa smanjuje u zadnjim fazama progresije tumora usled gubitka “neprikladnih” populacija ćelija sa prevelikim genetičkim oštećenjima. Osim toga, pod dejstvom selektivnih pritisaka dolazi do favorizovanja najbolje adaptiranih klonova, što dodatno utiče na smanjenje genomske nestabilnosti tokom progresije tumora, kako je i pokazano u nesitnoćelijskim tumorima pluća (Markovic i saradnici, 2008). U našem radu, skoro ista prosečna frekvencija DNK promena detektovana u genomima anaplastičnih astrocitoma gradusa III i primarnih glioblastoma gradusa IV, na prvi pogled deluje kontradiktorno. Međutim, svi analizirani glioblastomi spadaju u grupu primarnih GBM, koji nastaju *de novo*, a ne progresijom iz astrocitoma nižih gradusa. Mehanizam nastanka primarnih glioblastoma ukazuje da su

dobijeni rezultati u skladu sa evolucionom teorijom neoplastične transformacije, i nagoveštava da niži stepen genomske nestabilnosti potencijalno predstavlja biomarker za detekciju sekundarnih GBM, koji se histološki ne mogu razlikovati od primarih. Kao dodatnu potvrdu naših rezultata možemo navesti rad Nishizaki i saradnika (2002) koji su primenom metode FISH (engl. fluorescence in situ hybridization) pokazali da ne postoje značajne razlike u stepenu heterogenosti malignih glioma gradusa III i IV.

Poznato je da izražena genomska nestabilnost, detektovana u svim analiziranim uzorcima, povećana ukupna stopa mutacija i ekspresija „mutator“ fenotipa dovode do akumulacije promena u onkogenima i tumor-supresor genima. Najčešće genetičke promene u gliomima pogađaju *p53*, *PTEN* i *p16* tumor supresore, kao i *EGFR* onkogen. Ovi geni su kod skoro svih tipova maligniteta izmenjeni sa velikom učestalošću, prvenstveno zbog njihove naglašene uloge u regulisanju ključnih ćelijskih procesa. Osim toga, izabrani tumor supresori predstavljaju učesnike različitih signalnih puteva što je od velikog značaja s obzirom da su mnoge studije pokazale da alteracije u komponentama istog signalnog puta ne daju selektivnu prednost ćelijama u procesu kancerogeneze (Gorgoulis i saradnici, 1998). Mutacionom analizom *p53* gena identifikovano je ukupno 13 promena u strukturi ovog gena kod 9 pacijenata. Mutacije su detektovane u svim analiziranim egzonima, a najčešće u egzonu 5 (kodon 144), pri čemu se ni jedna od identifikovanih mutacija ne nalazi u „hotspot“ kodonima 248 i 273. Prema podacima iz literature, 57% mutacija *p53* gena u sekundarnim GBM pogađaju pomenute kodone, za razliku od primarnih GBM kod kojih su mutacije uniformnije raspoređene u ovom genu (Ohgaki i saradnici, 2004). Ovo je potvrđeno i na našem uzorku glioblastoma, koji čine isključivo primarni GBM. Pored promena u egzonima, detektovali smo jedan polimorfizam u sekvenci introna 9. Izuzetno je značajan podatak da pomenuta najčešće prisutna mutacija u kodonu 144 egzona 5, kao i još tri druge identifikovane mutacije u egzonima 6 i 8, nikada ranije nisu uočene u gliomima. Osim mutacione inaktivacije, LOH *p53* gena predstavlja dodatni mehanizam kojim se ukida njegova tumor supresorska funkcija. Fragmentna analiza *p53* gena, korišćenjem mikrosatelitskih markera hromozomskog regiona 17p13, je pokazala gubitak heterozigotnosti *p53* gena u 25% informativnih slučajeva. Zbirno posmatrano, inaktivacija *p53* tumor supresora potvrđena je kod 12 pacijenata, što čini 40% analiziranih uzoraka, i u

skladu je sa rezultatima drugih studija (Van Meir i saradnici, 2010). Poznato je da mutacije *p53* gena predstavljaju rani genetički događaj tokom progresije sekundarnih glioblastoma (Ohgaki i Kleihues, 2007), što je potvrđeno i na našem uzorku, gde se ove promene značajno češće javljaju kod mlađih pacijenata sa anaplastičnim astrocitomima gradusa III u poređenju sa primarnim GBM. Iako se, zbog svoje uloge u održavanju stabilnosti genoma, *p53* tumor supresor naziva čuvarom genoma (Morris, 2002), naši rezultati nisu ukazali na povezanost inaktivacije ovog gena i povećane genomske nestabilnosti glioma. Ovo je još jedna potvrda da primarne i sekundarne GBM treba posmatrati kao genetički potpuno različita oboljenja, sa različitim mehanizmima kancerogeneze. Dok su promene *p53*, učestalo prisutne u AA, odgovorne za povećanje genomske nestabilnosti tokom ranih faza višestepenog procesa progresije sekundarnih GBM, njihov uticaj na povećanje genomske nestabilnosti primarnih GBM nije značajan, čak se može pretpostaviti da, zbog nespecifičnog obrasca mutacija i njihove niske učestalosti, alteracije *p53* gena predstavljaju sekundarni događaj, tj. posledicu „mutator“ fenotipa u ovom podtipu glioma.

Za razliku od *p53*, promene *PTEN* tumor supresor su karakteristične za primarne GBM, pri čemu gubitak heterozigotnosti ovog gena predstavlja ključni mehanizam njegove inaktivacije u gliomima. Šta više, LOH 10q regiona na kome je lociran ovaj gen (10q23), je najfrekventniji genetički događaj u malignim gliomima, prisutan u 60-80% uzoraka (Fujisawa i saradnici, 2000). Fragmentnom analizom, korišćenjem mikrosatelitskih markera hromozomskog regiona 10q23, detektovali smo gubitak heterozigotnosti *PTEN*-a kod 20 od ukupno 30 analiziranih pacijenata (66,7%), što je u potpunosti u skladu sa podacima iz literature (Fujisawa i saradnici, 2000). Pored toga, ove promene se značajno češće javljaju u primarnim GBM, kao i u grupi starijih pacijenata (starijih od 50 godina), što dodatno ukazuje da ne postoje razlike u našoj populaciji u odnosu na svetsku. Gubitak *PTEN*-a dovodi do poremećaja u aktivnosti brojnih ćelijskih enzima i signalnih molekula, pri čemu se favorizuje sticanje tumor-promovišućih svojstava kao što je besmrtnost, invazivnost i proliferacija (Kanu i saradnici, 2009). Zbog toga značajna učestalost ovih promena u primarnim GBM može uticati na njihovu izrazito agresivnu prirodu i kraće preživljavanje pacijenata sa ovom dijagnozom. Kao i u slučaju *p53* gena, u našim uzorcima nije pokazana zavisnost između statusa *PTEN*-a i stepena bilo kog tipa genomske nestabilnosti, iako sam



mehanizam njegove inaktivacije, LOH, predstavlja manifestaciju hromozomske nestabilnosti. Pored toga, pokazano je da gubitak PTEN-a utiče na povećanje hromozomske nestabilnosti, inaktivacijom Chk1 i Rad51, enzima odgovornih za detekciju i popravku oštećenja na DNK molekulima, kao i izostankom interakcija sa CENP-C proteinom, komponentom kinetohora ključnom za održanje hromozomske stabilnosti (Yin i Shen, 2008). Iako naši rezultati ne pružaju podršku navedenom, ne treba zanemariti da je u svim našim uzorcima detektovan visok stepen genomske nestabilnosti (34%), kao i da je podela na dve kategorije prema ovom kriterijumu uslovna. Osim toga, ovo je prva studija koja se bavila proučavanjem ovog tipa korelacija na uzorku malignih glioma.

Prema našim rezultatima, ali i brojnim podacima iz literature (Louis, 2006, Nakamura, Watanabe, 2001), *p16* tumor supresor igra važnu ulogu u progresiji oba podtipa glioblastoma. Ukupne promene ovog gena (gubitak heterozigotnosti i homozigotne delecije) detektovane su u 60% analiziranih uzoraka, što je u skladu sa podacima objavljenim od strane TCGA (2008). Delecije ovog gena predstavljaju najučestaliji način inaktivacije RB signalnog puta, ključnog regulatora ćelijskog ciklusa. Pored toga, delecija *p16/p14<sup>ARF</sup>* lokusa utiče i na inaktivaciju *p53* signalnog puta, destabilizacijom MDM2 proteina. Učestalost inaktivacije ovog tumor supresora ne zavisi od histološkog podtipa naših uzoraka, što potvrđuje njegov značaj u dramatičnom povećanju stepena proliferacije, karakterističnom za transformaciju i progresiju glioma. Velika učestalost inaktivacije *p16* gena u našim uzorcima je u skladu sa hipotezom Snuderl i saradnika (2011), prema kojoj delecija ovog gena predstavlja rani događaj koji obezbeđuje selektivnu prednost za proliferaciju svojim nosiocima (engl. driver mutation), te je prisutna u skoro svim ćelijama tumora. Ovo je potvrđeno i u *in vitro* eksperimentima na neurosferama, koje vode poreklo od stem ćelija jezgra tumora mozga, i takođe imaju inaktiviran ovaj tumor supresor gen (Tunici i saradnici, 2004). Gubitak *p16* gena se češće javlja kod analiziranih pacijenata starijih od 50 godina, iako ovo treba potvrditi na većem uzorku. Kao i u slučaju *p53* i PTEN-a, korelacije između promena *p16* gena i genomske nestabilnosti do sada nisu razmatrane kod glioma. Ni u ovom slučaju naši rezultati nisu pokazali da postoje značajne korelacije među navedenim parametrima, iako se zna da *p16* utiče na održavanje stabilnosti genoma. Naime, *p16* u kooperaciji sa *p21*, između ostalog sprečava razdvajanje parova

centriola i povećanje broja centrozoma u ćeliji. Gubitak ovog gena dovodi do formiranja multipolarnih deobnih vretena usled povećanog broja centrozoma, pri čemu dolazi do formiranja aneuploidnih kćerki ćelija zbog neravnomerne podele genetičkog materijala tokom mitoze (McDermott i saradnici, 2006). Iako je ovaj mehanizam pokazan *in vitro* na HMEC (engl. human mammary epithelial cells) ćelijama, potrebno je potvrditi njegov efekat na malignim gliomima.

Kao što je već navedeno, EGFR/PTEN/Akt/mTOR je ključni signalni put u razviću primarnih glioblastoma. Pored inaktivacije *PTEN*-a, negativnog regulatora ovog signalnog puta, amplifikacija *EGFR*-a predstavlja alternativni način njegove aktivacije. Amplifikacija ovog onkogeno je prisutna u čak 54% uzoraka primarnih GBM, za razliku od samo 12% AA gradusa III, što je u skladu sa podacima iz literature (Ohgaki i saradnici, 2004). Osim toga, amplifikacija ovog gena se značajno češće javlja u grupi pacijenata starijih od 60 godina, kao što je i očekivano, imajući u vidu korelaciju histopatološkog podtipa GBM i starosti pacijenata. Amplifikacija *EGFR*-a, praćena ekspresijom mutirane varijante ovog gena *EGFRvIII*, dovodi do konstitutivne aktivacije receptora, što povećava stepen proliferacije ćelija. Pored toga, aktivacija receptora nezavisna od vezivanja liganda sprečava internalizaciju receptora, značajno produžavajući njegov poluživot i mitogenu signalizaciju (Hatanpaa i saradnici, 2010). EGFR predstavlja jedan od osnovnih targeta za terapiju GBM primenom tirozin kinaznih inhibitora (TKI), monoklonalnih antitela, vakcina i različitih RNK molekula. Iako je testiranje većine terapeutika uključeno u klinička ispitivanja, osnovni problem predstavlja izražena urođena i stečena rezistencija tumorskih ćelija. Uloga EGFR-a u popravci dvolančanih DNK prekida nehomologom rekombinacijom, predstavlja jedan od potencijalnih mehanizama izbegavanja odgovora na radio- i hemiotrapiju (Nyati i saradnici, 2006). Nije pokazana statistički značajna korelacija amplifikacije *EGFR*-a i stepena genomske nestabilnosti u našim uzorcima, iako postoji trend da su ove promene karakteristične za uzorke sa nižim stepenom hromozomske nestabilnosti, što je u skladu sa njegovom ulogom u procesu popravke oštećenja DNK molekula.

Pored pojedinačog doprinosa svakog od ovih molekula patogenezi glioblastoma, potrebno je proučavati i njihove brojne i kompleksne međusobne interakcije, jer su oni uključeni u

regulaciju većinom istih ćelijskih procesa ali kroz nezavisne signalne puteve. Pored toga, proučavanje njihovih međusobnih interakcija može da ukaže na redosled promena, kao i na mehanizam delovanja. Statistička analiza je pokazala da se promene u analiziranim genima u našim uzorcima međusobno isključuju. Naime, nije pokazana statistički značajna učestalost nijednog para ko-alteracija proučavanih gena. Pošto inaktivacija *p53* tumor supresora predstavlja karakteristiku sekundarnih GBM, za razliku od promena PTEN-a i EGFR-a, koji se značajno češće javljaju u primarnim GBM, njihovo međusobno isključivanje se podrazumeva, i u skladu je sa podacima iz literature (Ohgaki i saradnici, 2004, Rasheed i saradnici, 1997). Pored toga, PTEN i EGFR učestvuju u istom signalnom putu, pa ko-alteracije ova dva gena ne bi dovela do selektivne prednosti tumora. Međutim, iako se očekuje pozitivna korelacija promena *p16* gena sa preostalim genima (Hayashi i saradnici, 1997), u našem slučaju ovo nije pokazano. Proučavanjem sveukupnih promena u analiziranim genima pokazano je da je najređi slučaj kada su sva četiri gena „wild type“, tj. kada nisu detektovane promene ni u jednom od njih. Ovakav nalaz, prisutan u samo jednom od trideset uzoraka, potvrđuje neosporan značaj promena analiziranih gena u patogenezi GBM. Najčešći događaj u našoj grupi pacijenata je promena dva od četiri gena, što je detektovano kod trećine obolelih, pri čemu su prisutne isključivo kombinacije *p53* i *p16* (30%); *PTEN* i *EGFR* (30%), kao i *PTEN* i *p16* gena (40%). Čak 21 pacijent (69%) ima promene u dva ili više analiziranih gena. Na osnovu ovoga se može zaključiti da svaki od analiziranih proteina ima specifičnu ulogu, neophodnu za razvoj tumora, te da predstavljaju delove nezavisnih signalnih puteva. Pretpostavku da su višestruke promene neophodne za progresiju GBM potvrđuje rad Ishii i saradnika, koji su analizirajući 34 ćelijske linije glioma, identifikovali dve ili više promena kod čak 31 ćelijske linije (Ishii i saradnici, 1999). Svi ovi podaci, zajedno sa našim rezultatima, navode na zaključak da višestruke promene u genomu pružaju veću selektivnu prednost tumoru nego pojedinačne aberacije ili njihovo odsustvo.

Hipoteza „mutator“ fenotipa, kao i visoka frekvencija genetičkih promena detektovana u svim analiziranim uzorcima ukazuje da su u proces nastanka i progresije glioma uključeni brojni geni, od kojih neki još uvek nisu identifikovani ili povezani sa patogenezom ove bolesti. Analiza razlika u parovima AP-PCR DNK profila tumorskog i zdravog tkiva, osim

kvantifikacije stepena genomske nestabilnosti, omogućava identifikaciju uočenih razlika, direktno ukazujući na gene uključene u odgovarajuće faze neoplastične transformacije. Odabrane trake, koje su se jasno razlikovale u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo, su izdvojene sa PAA gelova, ponovo amplifikovane, klonirane i sekvencirane. Dobijene sekvence su upoređene sa sekvencama deponovanim u bazama podataka radi identifikacije gena izmenjenih u tumorskim uzorcima pacijenata obolelih od malignih glioma, kao i tipova mutacija u njima.

Na ovaj način je identifikovano 11 gena: fuzioni partner HMGIC gena-3 u lipomima (*LHFPL3*), sarkoglikan, gama (*SGCG*), 5-hidroksitriptamin (serotonin) receptor 4 (*HTR4*), integrin beta 1 (*ITGB1*), mitohondrijska karbamoil-fosfat sintetaza 1 (*CPS1*), protein S (alpha) (*PROS1*), glikoprotein 2 (*GP2*, *ZAP75*), član 2 kalijum-zavisne subfamilije G (*KCNG2*), cAMP-zavisna 3',5'-ciklična fosfodiesteraza 4D (*PDE4D*), imunoglobulinski receptor ćelija ubica (NK ćelija) (*KIR3DL3*), inozitol polifosfat-5-fosfataza (*INPP5A*). Preostale sekvence pripadaju još uvek neidentifikovanim delovima hromozoma 1, 2, 8q21-q23, 9 i 12, i njihova identifikacija tek treba da usledi. Naši rezultati ukazuju da bi osam od ukupno jedanaest identifikovanih gena moglo da ima značajnu ulogu u patogenezi glijalnih tumora, dok promene u *GP2*, *KCNG2* i *KIR3DL3* genima treba posmatrati kao posledicu „mutator“ fenotipa i povećene stope mutacija u ćelijama kancera. Pretpostavljamo da je do promena u ova tri gena došlo tokom procesa klonalne ekspanzije ćelija tumora, jer njihova ekspresija nije karakteristična za glijalne ćelije.

Prema našim rezultatima, promene u *LHFPL3* genu predstavljaju potencijalni marker primarnih glioblastoma, jer su sa većom učestalošću detektovane u glioblastomima gradusa IV, kod starijih pacijenata i u uzorcima sa višim stepenom genomske nestabilnosti, karakterističnim za *de novo* glijalne tumore. Ovaj gen koji se nalazi na dugačkom kraku hromozoma 13, otkriven je 1998. godine kao translokacioni partner *HMGIC* gena u lipomima sa učestalom translokacijom t(12;13) (Petit i saradnici, 1999). Iako uloga ovog gena u patogenezi glioma nije poznata, Nagaishi i saradnici (2012) su pokazali da je njegova amplifikacija karakteristična za mezenhimalnu komponentu gliosarkoma, retkog podtipa glioblastoma koji sadrži regione glijalne i mezenhimalne diferencijacije. Naši rezultati ukazuju da brojne detektovane nukleotidne zamene u ovom genu utiču na

povećanje invazivnost glioma, što je potvrđeno značajno kraćim preživljavanjem pacijenata kod kojih su pokazane ove promene.

Za razliku od *LHFPL3* gena, promene u *SGCG*, *HTR4*, *ITGB1*, *CPS1*, *PROS1* i *INPP5A* genima su detektovane uglavnom u anaplastičnim astrocitomima, što ukazuje na njihovu ulogu u progresiji sekundarnih glioblastoma, dok je *PDE4D* značajan za progresiju oba podtipa GBM. Iako do sada nije potvrđena njihova funkcija u razviću glioma, većina identifikovanih gena učestvuje u prenosu signala ili ćelijskoj adheziji, izuzetno važnim procesima za nastanak i progresiju kancera. Pojedinačno posmatrajući, *HTR4* i *PDE4D* učestvuju u cAMP signalnom putu (Conti i saradnici, 2003, Noda i saradnici, 2004), dok *INPP5A* reguliše aktivnost druga dva sekundarna glasnika, fosfatidilinozitol (1,4,5)-trisfosfat i inozitol-1,3,4,5-tetrakisfosfat (Majerus, 1996).

U različitim tipovima tumora mozga je detektovana niža koncentracija cAMP-a u poređenju sa normalnim tkivom (Furman and Shulman, 1977), kao i dodatno smanjenje tokom progresije tumora, usled povećane ekspresije *PDE4D* (Goldhoff i saradnici, 2008). Brojni članovi PDE4 familije cAMP fosfodiesteraza snižavaju unutarćelijsku koncentraciju cAMP-a vršeći njegovu hidrolizu, te zajedno sa adenilat ciklazama (AC) koje ga sintetišu, utiču na dalju signalnu transdukciju zavisnu od ovog sekundarnog glasnika. cAMP inhibira rast ćelija brojnim mehanizmima, uključujući regulaciju ćelijskog ciklusa, apoptoze i diferencijacije. Osim toga, cAMP dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G1 fazi, smanjenjem ekspresije ciklina A i D1, i aktivacijom p21Cip1 i p27Kip1, inhibitora ciklin-zavisnih kinaza (Gagelin i saradnici, 1994). cAMP utiče i na aktivnost brojnih matriksnih metaloproteinaza, različitih signalnih proteina i modulatora ćelijskog ciklusa. Tokom procesa apoptoze, on dovodi do aktivacije kaspaza, posredstvom brojnih medijatora kao što su p38 MAPK, PI3K i pro-apoptotski protein Bim (Ahn i saradnici, 2005). PDE4, cAMP-zavisna 3',5'-ciklična fosfodiesteraza, je prisutna u astrocitima i neuronima, gde ima značajnu ulogu u normalnim i patološkim stanjima (Sengupta i saradnici, 2011). Povećanje ekspresije *PDE4*, karakteristično za gliome, predstavlja jedan od ključnih događaja u progresiji tumora mozga jer dovodi do snižavanja koncentracije cAMP-a ukidajući njegova inhibitorna anti-tumorska svojstva. Naši rezultati ukazuju da, pored izmenjene ekspresije, nukleotidne zamene detektovane u našim uzorcima mogu dovesti do povećane aktivnosti

ovog enzima. Statistički značajna povezanost promena u ovom genu sa visokom hromozomskom nestabilnošću (CIN) ukazuje na delovanje oba mehanizma aktivacije PDE4D u našim uzorcima. Pored toga, promene u *PDE4D* genu su značajno češće prisutne u uzorcima sa „wild type” *p53* i *p16* genima. Imajući u vidu da višestruke promene istog signalnog puta ne povećavaju selektivnu prednost ćelija tumora, može se pretpostaviti da smanjena koncentracija cAMP-a pod uticajem PDE4D predstavlja jedan od mehanizama inaktivacije pomenutih tumor supresora u gliomima. Indirektnu potvrdu naše pretpostavke predstavlja podatak da povećani nivo cAMP dovodi do aktivacije p16 (Haddad i saradnici, 1999), kao i inhibicije MDM2, što se pozitivno odražava na aktivnost p53 (Hosokawa i saradnici, 1998).

Pored *PDE4D*, identifikovali smo alteracije u još jednom regulatoru cAMP signalnog puta, serotoninском receptoru *HTR4*. Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) i njegovi receptori vrše regulaciju sinteze cAMP-a, pri čemu tip receptora, tj. veza sa stimulatornim ili inhibitornim G proteinima utiče na povećanje ili smanjenje koncentracije ovog signalnog molekula (Hoyer i saradnici, 2002). 5-HT<sub>4</sub> receptor je pozitivno kuplovan sa adenilat ciklazom posredstvom Gs proteina, što dovodi do povećanja unutarćelijskog nivoa cAMP-a. Uloga serotoninских receptora u kancerogenezi je složena, jer serotonin reguliše inhibitorne (inhibicija rasta i apoptoza), ali i kancer-promovišuće procese (prekidi međućelijskih veza, nova receptorska svojstva, epitelijalno-mezenhimalna tranzicija) (Siddiqui i saradnici, 2005). Tokom progresije tumora dolazi do alteracija u ovoj signalnoj kaskadi, sticanja rezistencije na inhibitorna svojstva serotoninа, pri čemu se zadržavaju i favorizuju tumor-promovišuća dejstva i obezbeđuje značajna uloga u rastu, diferencijaciji i regulaciji genske ekspresije, što je pokazano u nekim tipovima kancera (Cartier i saradnici, 2005, Pai i saradnici, 2009), ali ne i u gliomima. Naši rezultati ukazuju da promene u genu za *HTR4* mogu biti rani događaj tokom progresije sekundarnih GBM jer su detektovane u uzorcima nižeg gradusa i kod mlađih pacijenata.

Kao što je već navedeno, INPP5A pripada brojnoj familiji inozitol polifosfat 5-fosfataza i ima izraženu supstratnu specifičnost za inozitol 1,4,5-trisfosfat i inozitol 1,3,4,5-tetrakisfosfat (Mitchell i saradnici, 2002). Ovaj enzim dovodi do zaustavljanja signalne transdukcije metabolišući navedene sekundarne glasnice, učestvujući na taj način u brojnim

ćelijskim procesima, uključujući proliferaciju. Inaktivacija ovog enzima favorizuje malignu transformaciju, a gubitak funkcije *INPP5A* je detektovan u različitim tipovima kancera, uključujući karcinome skvamoznih ćelija kože (Sekulic i saradnici, 2010), leukemije (Mengubas i saradnici, 1994) i tumore mozga (Fults and Pedone, 1993). LOH 10q, na kome se pored brojnih tumor supresora nalazi i *INPP5A* (10q26.3), predstavlja najčešću genetičku promenu u glioblastomima (Ohgaki ai Kleihues, 2007), i ukazuje na značajnu ulogu gena lociranih u ovom regionu u inhibiciji kancerogeneze. Naši rezultati ukazuju da specifične tačkaste mutacije detektovane u našim uzorcima takođe mogu uticati na inaktivaciju ovog tumor-supresora. Visoka frekvencija zastupljenosti promena ovog gena u uzorcima nižih gradusa ukazuje da je njegova inaktivacija rani događaj u progresiji glioma, kao što je već pokazano u slučaju karcinoma skvamoznih ćelija kože (Sekulic i saradnici, 2010). Uloga *INPP5A* u neoplastičnoj transformaciji je potvrđena i na ćelijskim linijama, gde je pokazano da smanjenje aktivnost ovog enzima za 50% izaziva povećanje koncentracije inozitol 1,4,5-trisfosfata (2 puta veća koncentracija), kao i kalcijuma u ćeliji (1,9 puta veća koncentracija) (Speed i saradnici, 1996). Dalje, povećanje koncentracije ovih sekundarnih glasnika dovodi do indukcije mitoze, nezavisno od prisustva faktora rasta, što predstavlja jednu od osnovnih karakteristika malignih ćelija prema Hanahan i Weinberg-u (2011). U skladu sa tim je i naš nalaz da se promene *INPP5A* gena značajno češće javljaju u uzorcima sa nepromenjenim amplifikacionim statusom *EGFR*-a. Speed i saradnici (1996) su pokazali da hronično povećanje Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> u nestimulisanim ćelijama utiče na porast bazalnog nivoa kalcijuma što dovodi do mitoze, nezavisno od uticaja faktora rasta. Osim toga, povećanje ekstraćelijske koncentracije kalcijuma od 0,1 do 1mM je dovoljno da dovede do nezavisne proliferacije fibroblasta (Huang i saradnici, 1995).

Na osnovu naših rezultata možemo pretpostaviti da tokom progresije glioma dolazi i do promena *CPS1*, jednog od pet ključnih enzima ciklusa uree (Mitchell i saradnici, 2009). Iako se ovaj enzim eksprimira prvenstveno u ćelijama jetre i intestinuma, kao i u fibroblastima, mi smo detektovali brojne nukleotidne zamene i dinukleotidne delecije u okviru *CPS1* gena u gliomima. Pretpostavljamo da ove promene utiču na ekspresiju ovog gena ili dovode do sinteze aberantnog proteina tokom progresije tumora mozga. Do sada su identifikovane brojne mutacije i polimorfizmi u okviru *CPS1* gena koji na različite načine

menjaju njegovu biološku funkciju, utičući na pojavu različitih patoloških stanja, pa i kancera. Promenjena ekspresija ovog gena je potvrđena u ćelijama karcinoma želuca (Liu, 1989), hepatocelularnim karcinomima (Liu i saradnici, 2011), kao i adenokarcinomima tankog creva (Cardona i saradnici, 2009), ali ne i u ostalim tipovima tumora, uključujući i gliome. Iako promene ovog gena, prema našim rezultatima, mogu biti karakteristične za progresiju sekundarnih GBM, jer se predominantno javljaju u astrocitomima gradusa III i uzorcima sa nižim stepenom genomske nestabilnosti, ostaje mogućnost da su detektovane mutacije posledica „mutator“ fenotipa bez direktnog efekta na proces maligne transformacije glioma.

Proteinski produkti *SGCG* i *PROS1* gena su glikoproteini uključeni u ćelijsku adheziju (Dahlback, 2007, Ozawa i saradnici, 2005), dok transmembranski receptor ITGB1 ima i dodatnu ulogu u prenosu signala i regulaciji ćelijskog ciklusa (Giancotti i Ruoslahti, 1999). Nema dovoljno podataka o ulozi ovih gena u kancerogenezi, iako su proteini koje kodiraju uključeni u procese koji su značajni za malignu transformaciju.

Članovi familije sarkoglikana,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - i  $\epsilon$ -sarkoglikani, učestvuju u obrazovanju složenog transmembranskog sistema koji obezbeđuje mehaničku i signalnu vezu citoskeleta sa ekstraćelijskim matriksom. Ovi transmembranski proteini su karakteristični i, stoga, najbolje proučeni u mišićnom tkivu, pri čemu se zanemaruje njihova široka rasprostranjenost i u drugim tkivima. Smanjena ekspresija *SGCG* je pokazana u uzorcima nesitnoćelijskog karcinoma pluća, gde dovodi do modifikacije citoskeleta i ekstraćelijskog matriksa tokom progresije kancera i formiranja metastaza (Valk i saradnici, 2010). Prema najnovijim podacima, sarkoglikani imaju ulogu i u nastanku tumora dojke, posebno prilikom progresije iz benignih u maligne forme (Arco i saradnici, 2012). Smanjena koncentracija sarkoglikana uočena u biopsijama obolelih pacijentkinja ukazuje na slabljenje međućelijskih veza epitelijalnih ćelija, što olakšava progresiju tumora i povećava njegovu invazivnost (Arco i saradnici, 2012). U našim uzorcima promene *SGCG* gena su karakteristične za astrocitome gradusa III, što nas je navelo da pretpostavimo da predstavljaju kasni događaj u progresiji ovih tumora u viši gradus, naročito imajući u vidu da se statistički značajno češće javljaju u uzorcima sa niskim CIN-om, markerom progresije



sekundarnih GBM. U skladu sa tim je i nalaz da pacijenti kod kojih su detektovane promene u ovom genu imaju kraće vreme preživljavanja.

Pored sarkoglikana, identifikovali smo alteracije u još jednom genu čiji je proteinski produkt uključen u procese ćelijske adhezije, što potvrđuje značaj modulacije međućelijskih veza za razviće glijalnih tumora. Protein S je vitamin K-zavisni antikoagulantni protein plazme. Osim uloge u sprečavanju koagulacije, ovaj protein učestvuje u brojnim ćelijskim procesima. PROS1 se vezuje za negativno naelektrisane površine plazma membrane apoptotskih ćelija, promovišući njihovu fagocitozu pomoću makrofaga (Anderson i saradnici, 2003). Pored toga, PROS1 ima izraženu mitogenu aktivnost (Gasic i saradnici, 1992), kao i ulogu u zaštiti neurona od ishemije i hipoksije (Liu i saradnici, 2003). Uloga PROS1 u kanceru je nedovoljno poznata. Saraon i saradnici su detektovali povećanu koncentraciju ovog proteina u uzorcima viših gradusa tumora prostate, predlažući ga za potencijalnog biomarkera agresivnijih formi ovog oboljenja (Saraon i saradnici, 2012). Međutim, poređenje ekspresionih profila meningioma različitih gradusa ukazuje na smanjenje ekspresije ovog proteina sa povećanjem gradusa tumora (Fevre-Montange i saradnici, 2009). Iako na prvi pogled kontradiktorni, navedeni rezultati su dobijeni na dva tipa tumora, primenom različitih metoda, kao i bez detaljnije analize mehanizma delovanja PROS1 na kancerogenezu. Detektovna niža stopa preživljavanja naših pacijenata sa promenama u *PROS1* genu ukazuje da one dovode do agresivnijeg ponašanje tumora. Kao i u slučaju *SGCG*, promene *PROS1* gena mogu imati značajnu ulogu u patogenezi sekundarnih glioblastoma, jer su prisutne prevashodno u uzorcima anaplastičnih astrocitoma gradusa III, prekursora navedenih GBM.

Integrini, familija površinskih ćelijskih receptora, učestvuju u komunikaciji ćelija sa ekstraćelijskim matriksom, tj. prenose mehaničke i hemijske signale iz ECM. Na osnovu primljenih informacija, reguliše se aktivnost receptora faktora rasta i jonskih kanala, kao i organizacija unutarćelijskih aktinskih vlakana i citoskeleta. Signali koji se prenose preko integrina direktno utiču na regulaciju ćelijskog ciklusa, usmeravajući ćelije ka proliferaciji ili diferencijaciji (Giancotti i Ruoslahti, 1999). Većina integrina aktivira fokalnu adhezionu kinazu (FAK, engl. focal adhesion kinase) i članove familije SRC-kinaza koji vrše fosforilaciju i aktivaciju nishodnih učesnika ovog signalnog puta (Guo and Giancotti, 2004).

Značaj integrina za progresiju tumora je veliki jer učestvuju u regulaciji adhezije, migracije, invazije i proliferacije tumorskih ćelija. Postoje bojni dokazi da integrini obezbeđuju kontakt tumorskih ćelija sa ECM, kao i transdukciju signala koji dovode do uspostavljanja malignog fenotipa, nekontrolisanog rasta i migracije (Grzesiak i saradnici, 2007). Ovo je posebno izraženo u tumorima pankreasa, kod kojih je prisutna povećana koncentracija komponenti ekstraćelijskog matriksa, posebno kolagena tip I i tip IV, fibronektina i laminina, koji stupaju u direktnu interakciju sa  $\beta 1$  integrinom (Armstrong i saradnici, 2004). *In vitro* i *in vivo* modeli su pokazali da potpuni gubitak (engl. knockdown) *ITGB1* dovodi do smanjenja primarne tumorske mase za 50%, kao i do sprečavanja formiranja metastaza, potvrđujući njegov značaj za progresiju tumora i formiranje metastaza tumora pankreasa (Grzesiak i saradnici, 2011). Pored ovoga, integrin  $\beta 1$  predstavlja važan element za vezivanje epitelijalnih matičnih ćelija za bazalnu membranu, što takođe predstavlja jedan od mehanizama regulacije širenja ćelija tumora (Janes i Watt, 2006). Prekidanje ovih i međućelijskih veza oslobađa pojedinačne ćelije tumora, koje na ovaj način stiču invazivnu sposobnost i migratorni fenotip (Guo i Giancotti, 2004). Integrini omogućavaju međućelijsku komunikaciju, vršeći prenos signala na okolne ćelije. Na primeru karcinoma skvamoznih ćelija je pokazano da alteracije ili povećana ekspresija integrina direktno menjaju obrazac ponašanja okolnih ćelija, regulišući njihovu proliferaciju i sprečavajući diferencijaciju (Janes and Watt, 2006). Promene u *ITGB1* genu detektovane u našim uzorcima sugerišu da ovaj transmembranski protein doprinosi povećanju invazivnog potencijala malignih glioma. Edwards i saradnici (2011) su proučavali ulogu faktora rasta vezivnog tkiva (CTGF, engl. connective tissue growth factor) u patogenezi glioblastoma i pokazali da on dovodi do aktivacije CTGF-*ITGB1*-TrkA kompleksa što utiče na povećanje invazivnosti tumora. U našem slučaju, detektovane alteracije *ITGB1* gena, prisutne prevashodno u anaplastičnim astrocitomima, mogu imati značajnu ulogu u progresiji sekundarnih glioblastoma,. Pored toga, promene u ovom genu su povezane sa kraćim preživljavanjem pacijenata, što je još jedna potvrda uticaja integrina na povećanje agresivnosti glioma.

Kao što je prethodno navedeno, alteracije *SGCG*, *PROS1* i *ITB1* gena, detektovane prevashodno u astrocitomima gradusa III, ukazuju da promene u ćelijskoj adheziji mogu

predstavljati jednu od ključnih odlika progresije glioblastoma, naročito sekundarnih. Osim toga, promene ova tri gena se češće javljaju u uzorcima sa nižim stepenom genomske nestabilnosti, što navodi na zaključak da one predstavljaju kasni događaj u nastanku sekundarnih glioblastoma, ukoliko proces njihove neoplastične transformacije posmatramo u funkciji Darvinovih evolutivnih mehanizama. Kao što je već navedeno, ne postoji razlika u stepenu genomske nestabilnosti između astrocitoma gradusa III i primarnih GBM koji nastaju *de novo*. Kako je očekivano da tokom progresije sekundarnih GBM dolazi do smanjenja i, finalno, gubitka ekspresije “mutator” fenotipa (Loeb, 2001), pretpostavljamo da niža stopa genomske nestabilnosti u pojedinim uzorcima predstavlja indikator terminalne faze progresije tumora.

Prosečno preživljavanje naših pacijenta je 11 meseci, a 2,5-godišnja stopa preživljavanja 30%, što je u skladu sa podacima iz literature (Houillier i saradnici, 2006, Stupp i saradnici, 2005). Od svih analiziranih parametara, jedino histološki podtip i promene u *LHFPL3* genu imaju statistički značajan uticaj na preživljavanje pacijenata. Naši rezultati ukazuju da pacijenti oboleli od anaplastičnih astrocitoma imaju bolju prognozu u odnosu na one sa glioblastomima, što se može objasniti i pozitivnom korelacijom nižeg gradusa i mlađe starosne kategorije obolelih, koja predstavlja pozitivan faktor preživljavanja pacijenata (Casartelli i saradnici, 2009, Das i saradnici, 2011). Uticaj stepena genomske nestabilnosti na preživljavanje pacijenata nije potvrđen, a malobrojni rezultati se razlikuju u zavisnosti od tipa kancera. Tako je pokazano da visok stepen mikrosatelitske nestabilnosti ukazuje na bolju prognozu pacijenata sa naslednim nepolipoznim kancerom debelog creva, jer ovi pacijenti imaju produženo preživljavanje u odnosu na pacijente sa nižim stepenom MSI (Diaz, 2005). Hromozomska nestabilnost, u slučaju kancera kolona, nije posmatrana zbirno, već kroz efekat pojedinačnih delecija ili amplifikacija određenih hromozoma. Za razliku od toga, Kronenwett i saradnici (2006) su pokazali da visok stepen hromozomske nestabilnosti skraćuje vreme preživljavanja pacijentkinja sa tumorima dojke. Naši rezultati ukazuju da stepen ukupne genomske nestabilnosti nema prognostički faktor u našem setu uzoraka, a isto je pokazano u slučaju hromozomske i mikrosatelitske nestabilnosti. Iz navedenog se može zaključiti da se različiti tipovi tumora međusobno razlikuju prema tipu genomske nestabilnosti, vremenu njenog uspostavljanja, kao i efektu na preživljavanje pacijenata. U

slučaju malignih glioma, visok stepen ukupne genomske nestabilnosti, ali i izjednačen doprinos CIN i MIN, utiče na dramatično skraćenje životnog veka obolelih. Pored toga, ova analiza je dodatno otežana izuzetno brzim napredovanjem bolesti gde, posebno u slučaju *de novo* primarnih GBM, nismo u mogućnosti da identifikujemo prelazne faze progresije bolesti. Pored uticaja stepena genomske nestabilnosti na preživljavanje pacijenata, želeli smo da ispitamo uticaj promena u *p53*, *PTEN*, *p16* i *EGFR*-u, kao i u novim identifikovanim genima, značajnim za proces nastanka i progresije glioma. Podaci o uticaju alteracija *p53* tumor supresora na stopu preživljavanja pacijenata obolelih od glioma nisu usaglašeni. Dok prema rezultatima pojedinih studija preživljavanje pacijenata ne zavisi od statusa *p53* gena (Batchelor i saradnici, 2004, Newcomb i saradnici, 1998, Simmons i saradnici, 2001), većina rezultata, uključujući i naše, ukazuje da su promene ovog gena pozitivni prognostički faktor kod obolelih od glioblastoma (Ohgaki i saradnici 2004, Smith i saradnici, 2001). Pretpostavljamo da na ovakav rezultat utiče pokazana pozitivna korelacija inaktivacije *p53* gena sa nižim gradusom i mlađom grupom pacijenata. Za razliku od *p53*, u našim uzorcima je uočena međuzavisnost promena u *PTEN*-u i *EGFR*-u i kraćeg životnog veka pacijenata posle operacije, iako ovaj nalaz nije statistički značajan. Postoje brojni literaturni podaci koji su u skladu sa našim rezultatima. Pokazana je povezanost hemizigotnih delecija *PTEN* lokusa sa kraćim preživljavanjem pacijenata sa gliomima viših gradusa (Lin i saradnici, 1998), kao i značajno bolja prognoza kod pacijenata čiji tumori imaju povećanu ekspresiju *PTEN*-a (Sano i saradnici, 1999, Wager i saradnici, 2008). Smith i saradnici (2001) su potvrdili da promene *PTEN*-a značajno skraćuju preživljavanje pacijenata, kao i da amplifikacija *EGFR*-a ima isti uticaj, ali bez statističke značajnosti. Na skraćivanje životnog veka pacijenata dodatno utiče sinergističko dejstvo ova dva gena, jer je pokazano da inaktivacija *PTEN*-a dovodi do povećanja rezistencije na terapiju kod tumora sa aberantnom ekspresijom *EGFR*-a (Mellinghoff i saradnici, 2005). Dalje, naši rezultati ukazuju da inaktivacija *p16* gena nema prognostički značaj za gliome, što je u skladu sa rezultatima Newcomb i saradnika (Newcomb i saradnici, 1998), iako rezultati univarijantne analiza na većem broju uzoraka sugerišu da povećana ekspresija *p16* gena koreliše sa boljom prognozom (Wager i saradnici, 2008). Zanimljivo je da su isti autori, analizirajući efekat najznačajnijih promena u gliomima na

uzorku od preko 400 pacijenata, zaključili da analizirani markeri nemaju prognostički značaj zbog izražene heterogenosti tumora viših gradusa, te da nemaju praktičnu primenu u individualnom pristupu lečenju (Wager i saradnici, 2008). Zbog toga je značajno ispitati potencijalni efekat identifikovanih gena na preživljavanje pacijenata obolelih od tumora mozga glijalnog porekla, sa ciljem identifikacije boljih prognostičkih markera. Na osnovu iznetih rezultata možemo zaključiti da promene *LHFPL3*, karakteristične za primarne GBM, značajno skraćuju preživljavanje pacijenata, te se mogu smatrati negativnim prognostičkim faktorom. Pored toga, promene u *SGCG*, *PROS1*, *ITB1* i *HTR4* genima se češće javljaju kod pacijenata sa lošijom prognozom, ali njihov uticaj ne dostiže statističku značajnost. Preostali identifikovani geni, *PDE4D* i *INPP5A* nemaju uticaj na stope preživljavanja pacijenata. Pošto je naša studija prva te vrste koja je ukazala na potencijalni značaj identifikovanih gena u patogenezi glioma, ne postoje dodatni podaci u literaturi kojima bi se potvrdio njihov uticaj na preživljavanje pacijenata. Neophodna su dodatna istraživanja identifikovanih gena na većem broju uzoraka, kao i na *in vitro* modelima, sa ciljem razjašnjenja mehanizama njihovog delovanja tokom progresije glioma.

## 6 ZAKLJUČCI

Prezentovani rezultati, kao i njihovo tumačenje u odnosu na postojeću literaturu, navode na sledeće zaključke ove doktorske disertacije:

1. Visok stepen genomske nestabilnosti predstavlja jednu od osnovnih karakteristika malignih glioma, pri čemu su mikrosatelitska (MIN) i hromozomska nestabilnost (CIN) skoro podjednako zastupljene u svim uzorcima. Podjednak doprinos oba navedena tipa genomske nestabilnosti predstavlja značajnu novinu karakterističnu za gliome, jer se prema podacima iz literature MIN i CIN međusobno isključuju.
2. Ne postoji razlika u stepenu genomske nestabilnosti između anaplastičnih astrocitoma i glioblastoma multiforme, što je naizgled u suprotnosti sa evolucionom teorijom nastanka kancera, prema kojoj se očekuje smanjenje genomske nestabilnosti sa progresijom kancera. Međutim, svi analizirani glioblastomi spadaju u grupu primarnih GBM, koji nastaju *de novo*, a ne progresijom iz astrocitoma nižih gradusa. Naši rezultati nagoveštavaju da niži stepen genomske nestabilnosti potencijalno predstavlja biomarker za detekciju sekundarnih GBM, koji se histološki ne mogu razlikovati od primarnih.
3. Identifikovali smo 11 gena izmenjene primarne strukture, koji ranije nisu povezivani sa promocijom i progresijom glioma. Većina njih (osam) je, po našem mišljenju, uključena u procese nastanka i progresije glioma, a promene u preostala tri gena (*GP2*, *KCNG2* i *KIR3DL3*) predstavljaju posledicu „mutator“ fenotipa i povećene stope mutacija u tumorskim ćelijama. Iz korelacione analize sa histopatološkim podacima sledi da je:
  - *LHFPL3* – marker primarnih glioblastoma
  - *SGCG*, *HTR4*, *ITGB1*, *CPS1*, *PROS1* i *INPP5A* – markeri progresije AA u sekundarne GBM
  - *PDE4D* – značajan za progresiju oba podtipa GBM.

4. Identifikovani geni učestvuju u prenosu signala, regulišući nivo sekundarnih glasnika cAMP i InsP<sub>3</sub>, i u regulaciji ćelijske adhezije, izuzetno važnim procesima za nastanak i progresiju kancera.
5. Promene u *PDE4D* genu su značajno češće prisutne u uzorcima sa „wild type” *p53* i *p16* genima. Imajući u vidu da višestruke promene istog signalnog puta ne povećavaju selektivnu prednost ćelija tumora, zaključujemo da *PDE4D* dovodi do inaktivacije ovih tumor supresora posredstvom cAMP-a. Ovako je dodatno potvrđen značaj *p53* i *p16* tumor supresora za nastanak i progresiju glioma, jer su pored direktnih mehanizama u tumorskim ćelijama aktivirani i indirektni mehanizmi njihove inaktivacije.
6. Najučestalija promena u našem setu uzoraka je inaktivacija *PTEN* tumor supresora (66,7%), zatim *p16* tumor supresora (60%), aktivacija *EGFR* onkogen (54%), dok je *p53* inaktiviran samo u 40% uzoraka.
7. Promene *p53* gena su karakteristične za anaplastične astrocitome, *PTEN* i *EGFR* su markeri primarnih glioblastoma, dok je inaktivacija *p16* prisutna u oba podtipa GBM, tako da se može reći da je karakteristika i jednih i drugih.
8. Identifikovali smo 4 nove mutacije u *p53* genu koje nikada ranije nisu uočene u gliomima, pri čemu je najfrekventnija mutacija kodona 144 u egzonu 5 ovog gena.
9. Iako ne postoji statistički značajno prisustvo ko-alteracija *p53*, *PTEN*, *p16* i *EGFR* gena, podatak da su kod 69% pacijenata detektovane dve ili više promena, potvrđuje značaj višestrukih promena u progresiji glioblastoma.

10. Od svih analiziranih parametara, jedino histološki podtip i promene u *LHFPL3* genu imaju statistički značajan uticaj na preživljavanje pacijenata, pri čemu je niži gradus pozitivan, a promene *LHFPL3* gena negativan prognostički faktor. Stepenn genomske nestabilnosti ne utiče na stopu preživljavanja pacijenata, što se može objasniti *de novo* mehanizmom nastanka primarnih GBM, kao i izraženom genomskom nestabilnošću, za razliku od viših gradusa ostalih tipova tumora. Pored toga, pacijenti kod kojih su detektovane promene p53 gena žive duže, za razliku od promena *PTEN*, *EGFR*, *SGCG*, *PROS1*, *ITB1* i *HTR4*, koje su negativni prognostički markeri. Promene *p16*, *PDE4D* i *INPP5A* gena nemaju uticaj na stopu preživljavanja pacijenata.

Iz svega navedenog se konačno može reći da je za maligne gliome viših gradusa karakteristično prisustvo brojnih promena u genomu, kao i složene međusobne interakcije promenjenih gena. Visok stepen genomske nestabilnosti, koji predstavlja jedan od osnovnih markera ovog tipa tumora, direktno dovodi do povećanja intra- i inter-tumorske heterogenosti, otežavajući kako dijagnostičke, tako i terapijske pristupe ovom oboljenju.



## 7 LITERATURA

Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455:1061-8.

Agarwal P, Mohammad Lutful Kabir F, DeInnocentes P, Curtis Bird R (2012). Tumor Suppressor Gene p16/INK4A/CDKN2A and Its Role in Cell Cycle Exit, Differentiation, and Determination of Cell Fate, Tumor Suppressor Genes, Dr. Yue Cheng (Ed.), ISBN: 978-953-307-879-3, InTech.

Ahn YH, Jung JM, Hong SH. 8-Chloro-cyclic AMP-induced growth inhibition and apoptosis is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase activation in HL60 cells. *Cancer Res*. 2005;65:4896-901.

Akhavan D, Cloughesy TF, Mischel PS. mTOR signaling in glioblastoma: lessons learned from bench to bedside. *Neuro Oncol*. 2010;12:882-9.

Anderson HA, Maylock CA, Williams JA, Paweletz CP, Shu H, Shacter E. Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Immunol*. 2003;4:87-91.

Arco A, Favalaro A, Gioffre M, Santoro G, Speciale F, Vermiglio G, i saradnici Sarcoglycans in the normal and pathological breast tissue of humans: an immunohistochemical and molecular study. *Cells Tissues Organs*. 2012;195:550-62.

Armitage P, Doll R. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br J Cancer*. 1954;8:1-12.

Armstrong T, Packham G, Murphy LB, Bateman AC, Conti JA, Fine DR, i saradnici Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:7427-37.

Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, i saradnici Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*. 1989;244:217-21.

Bandyopadhyay D, Mandal M, Adam L, Mendelsohn J, Kumar R. Physical interaction between epidermal growth factor receptor and DNA-dependent protein kinase in mammalian cells. *J Biol Chem*. 1998;273:1568-73.

Baselga J, Hammond LA. HER-targeted tyrosine-kinase inhibitors. *Oncology*. 2002;63 Suppl 1:6-16.

Batchelor TT, Betensky RA, Esposito JM, Pham LD, Dorfman MV, Piscatelli N, i saradnici Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10:228-33.

Bayani J, Selvarajah S, Maire G, Vukovic B, Al-Romaih K, Zielenska M, i saradnici Genomic mechanisms and measurement of structural and numerical instability in cancer cells. *Semin Cancer Biol.* 2007;17:5-18.

Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res.* 1998;72:141-96.

Bazarov AV, Van Sluis M, Hines WC, Bassett E, Beliveau A, Campeau E, i saradnici p16(INK4a) -mediated suppression of telomerase in normal and malignant human breast cells. *Aging Cell.* 2010;9:736-46.

Bielas JH, Loeb KR, Rubin BP, True LD, Loeb LA. Human cancers express a mutator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:18238-42.

Bielas JH, Loeb LA. Quantification of random genomic mutations. *Nat Methods.* 2005;2:285-90.

Biernat W, Huang H, Yokoo H, Kleihues P, Ohgaki H. Predominant expression of mutant EGFR (EGFRvIII) is rare in primary glioblastomas. *Brain Pathol.* 2004;14:131-6.

Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol.* 1997;94:303-9.

Bogler O, Huang HJ, Kleihues P, Cavenee WK. The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia.* 1995;15:308-27.

Bondy ML, Wrensch MR. Epidemiology of primary malignant brain tumours. *Baillieres Clin Neurol.* 1996;5:251-70.

Breivik J. The evolutionary origin of genetic instability in cancer development. *Semin Cancer Biol.* 2005;15:51-60.

Breivik J, Gaudernack G. Genomic instability, DNA methylation, and natural selection in colorectal carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 1999;9:245-54.

Brenner C, Duggan D. *Oncogenomics : molecular approaches to cancer.* Hoboken, N.J. ; [Chichester]: Wiley-Liss; 2004.

Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol.* 1999;9:M57-60.

Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, i saradnici Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature.* 1998;392:300-3.

Cardona DM, Zhang X, Liu C. Loss of carbamoyl phosphate synthetase I in small-intestinal adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2009;132:877-82.

Carr AM. Cell cycle. Piecing together the p53 puzzle. *Science.* 2000;287:1765-6.

Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, i saradnici Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest.* 2008;118:3065-74.

Carter S, Vousden KH. Modifications of p53: competing for the lysines. *Curr Opin Genet Dev.* 2009;19:18-24.

Cartier D, Jegou S, Parmentier F, Lihrmann I, Louiset E, Kuhn JM, i saradnici Expression profile of serotonin4 (5-HT4) receptors in adrenocortical aldosterone-producing adenomas. *Eur J Endocrinol.* 2005;153:939-47.

Casartelli G, Dorcaratto A, Ravetti JL, Sola S, Vitali A, Merlo DF, i saradnici Survival of high grade glioma patients depends on their age at diagnosis. *Cancer Biol Ther.* 2009;8:1719-21.

Chebel A, Chien WW, Gerland LM, Mekki Y, Bertrand Y, Ffrench P, i saradnici Does p16ink4a expression increase with the number of cell doublings in normal and malignant lymphocytes? *Leuk Res.* 2007;31:1649-58.

Ceresa B (2011). Endocytic Trafficking of the Epidermal Growth Factor Receptor in Transformed Cells, *Breast Cancer - Carcinogenesis, Cell Growth and Signalling Pathways*, Prof. Mehmet Gunduz (Ed.), ISBN:978-953-307-714-7, InTech

Chintala SK, Fueyo J, Gomez-Manzano C, Venkaiah B, Bjerkvig R, Yung WK, i saradnici Adenovirus-mediated p16/CDKN2 gene transfer suppresses glioma invasion in vitro. *Oncogene.* 1997;15:2049-57.

Chung JH, Ostrowski MC, Romigh T, Minaguchi T, Waite KA, Eng C. The ERK1/2 pathway modulates nuclear PTEN-mediated cell cycle arrest by cyclin D1 transcriptional regulation. *Hum Mol Genet.* 2006;15:2553-9.

Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:505-16.

Cobb B (1997) Optimization of RAPD fingerprinting. In: Micheli MR, Bova R (ed) *Fingerprinting Methods Based on Arbitrarily Primed PCR*, Springer Lab Manual, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg

Conti M, Richter W, Mehats C, Livera G, Park JY, Jin C. Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *J Biol Chem.* 2003;278:5493-6.

Counts JL, Goodman JI. Hypomethylation of DNA: a possible epigenetic mechanism involved in tumor promotion. *Prog Clin Biol Res.* 1995;391:81-101.

- Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*. 2008;358:502-11.
- Dahia PL. PTEN, a unique tumor suppressor gene. *Endocr Relat Cancer*. 2000;7:115-29.
- Dahlback B. The tale of protein S and C4b-binding protein, a story of affection. *Thromb Haemost*. 2007;98:90-6.
- Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 2008;358:502-511.
- Dahlback HS, Brandal P, Meling TR, Gorunova L, Scheie D, Heim S. Genomic aberrations in 80 cases of primary glioblastoma multiforme: Pathogenetic heterogeneity and putative cytogenetic pathways. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009;48:908-24.
- Das P, Puri T, Jha P, Pathak P, Joshi N, Suri V, i saradnici A clinicopathological and molecular analysis of glioblastoma multiforme with long-term survival. *J Clin Neurosci*. 2011;18:66-70.
- Di Cristofano A, Kotsi P, Peng YF, Cordon-Cardo C, Elkon KB, Pandolfi PP. Impaired Fas response and autoimmunity in Pten<sup>+/-</sup> mice. *Science*. 1999;285:2122-5.
- Diaz LA, Jr. The current clinical value of genomic instability. *Semin Cancer Biol*. 2005;15:67-71.
- Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol*. 2012;14 Suppl 5:v1-49.
- Draviam VM, Xie S, Sorger PK. Chromosome segregation and genomic stability. *Curr Opin Genet Dev*. 2004;14:120-5.
- Edwards LA, Woolard K, Son MJ, Li A, Lee J, Ene C, i saradnici Effect of brain- and tumor-derived connective tissue growth factor on glioma invasion. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103:1162-78.
- Efird J (2011). *Epidemiology of Glioma, Glioma - Exploring Its Biology and Practical Relevance*, Dr. Anirban Ghosh (Ed.), ISBN: 978-953-307-379-8, InTech.
- Evangelou K, Bramis J, Peros I, Zacharatos P, Dasiou-Plakida D, Kalogeropoulos N, i saradnici Electron microscopy evidence that cytoplasmic localization of the p16(INK4A) "nuclear" cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) in tumor cells is specific and not an artifact. A study in non-small cell lung carcinomas. *Biotech Histochem*. 2004;79:5-10.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61:759-67.
- Feilotter HE, Nagai MA, Boag AH, Eng C, Mulligan LM. Analysis of PTEN and the 10q23 region in primary prostate carcinomas. *Oncogene*. 1998;16:1743-8.
- Fenech M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discov Today*. 2002;7:1128-37.
- Fevre-Montange M, Champier J, Durand A, Wierinckx A, Honnorat J, Guyotat J, i saradnici Microarray gene expression profiling in meningiomas: differential expression according to grade or histopathological subtype. *Int J Oncol*. 2009;35:1395-407.

Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, i saradnici The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*. 1993;75:1027-38.

Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P, i saradnici Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest*. 2000;80:65-72.

Fults D, Pedone C. Deletion mapping of the long arm of chromosome 10 in glioblastoma multiforme. *Genes Chromosomes Cancer*. 1993;7:173-7.

Furman MA, Shulman K. Cyclic AMP and adenyl cyclase in brain tumors. *J Neurosurg*. 1977;46:477-83.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, i saradnici Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*. 2007;21:2683-710.

Fuster JJ, Sanz-Gonzalez SM, Moll UM, Andres V. Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. *Trends Mol Med*. 2007;13:192-9.

Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, i saradnici A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:177-83.

Gagelin C, Pierre M, Toru-Delbauffe D. Inhibition of G1 cyclin expression and G1 cyclin-dependent protein kinases by cAMP in an astrocytic cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;205:923-9.

Gagos S, Irminger-Finger I. Chromosome instability in neoplasia: chaotic roots to continuous growth. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37:1014-33.

Galipeau PC, Prevo LJ, Sanchez CA, Longton GM, Reid BJ. Clonal expansion and loss of heterozygosity at chromosomes 9p and 17p in premalignant esophageal (Barrett's) tissue. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91:2087-95.

Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2002;4:70-6.

Gasic GP, Arenas CP, Gasic TB, Gasic GJ. Coagulation factors X, Xa, and protein S as potent mitogens of cultured aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:2317-20.

Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*. 1999;285:1028-32.

Gil A, Andres-Pons A, Fernandez E, Valiente M, Torres J, Cervera J, i saradnici Nuclear localization of PTEN by a Ran-dependent mechanism enhances apoptosis: Involvement of an N-terminal nuclear localization domain and multiple nuclear exclusion motifs. *Mol Biol Cell*. 2006;17:4002-13.

Ginn-Pease ME, Eng C. Increased nuclear phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 is associated with G0-G1 in MCF-7 cells. *Cancer Res.* 2003;63:282-6.  
Gladson CL, Prayson RA, Liu WM. The pathobiology of glioma tumors. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:33-50.

Goldhoff P, Warrington NM, Limbrick DD, Jr., Hope A, Woerner BM, Jackson E, i saradnici Targeted inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase-4 promotes brain tumor regression. *Clin Cancer Res.* 2008;14:7717-25.

Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Kyroudi A, Veslemes M, i saradnici Alterations of the p16-pRb pathway and the chromosome locus 9p21-22 in non-small-cell lung carcinomas: relationship with p53 and MDM2 protein expression. *Am J Pathol.* 1998;153:1749-65.

Grzesiak JJ, Ho JC, Moossa AR, Bouvet M. The integrin-extracellular matrix axis in pancreatic cancer. *Pancreas.* 2007;35:293-301.

Grzesiak JJ, Tran Cao HS, Burton DW, Kaushal S, Vargas F, Clopton P, i saradnici Knockdown of the beta(1) integrin subunit reduces primary tumor growth and inhibits pancreatic cancer metastasis. *Int J Cancer.* 2011;129:2905-15.

Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5:816-26.

Gururaj A, Böglér O, Latha K (2011). Nuclear Signaling of EGFR and EGFRvIII in Glioblastoma, *Molecular Targets of CNS Tumors*, Dr. Miklos Garami (Ed.), ISBN: 978-953-307-736-9, InTech

Haas K, Staller P, Geisen C, Bartek J, Eilers M, Moroy T. Mutual requirement of CDK4 and Myc in malignant transformation: evidence for cyclin D1/CDK4 and p16INK4A as upstream regulators of Myc. *Oncogene.* 1997;15:179-92.

Haddad MM, Xu W, Schwahn DJ, Liao F, Medrano EE. Activation of a cAMP pathway and induction of melanogenesis correlate with association of p16(INK4) and p27(KIP1) to CDKs, loss of E2F-binding activity, and premature senescence of human melanocytes. *Exp Cell Res.* 1999;253:561-72.

Hahn M, Wieland I, Koufaki ON, Gorgens H, Sobottka SB, Schackert G, i saradnici Genetic alterations of the tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in human brain metastases. *Clin Cancer Res.* 1999;5:2431-7.

Hamroun D, Kato S, Ishioka C, Claustres M, Beroud C, Soussi T. The UMD TP53 database and website: update and revisions. *Hum Mutat.* 2006;27:14-20.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646-74.

Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, Habib AA. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia*. 2010;12:675-84.

Hayashi Y, Iwato M, Arakawa Y, Fujisawa H, Thoma Y, Hasegawa M, i saradnici Homozygous deletion of INK4a/ARF genes and overexpression of bcl-2 in relation with poor prognosis in immunocompetent patients with primary central nervous system lymphoma of the diffuse large B-cell type. *J Neurooncol*. 2001;55:51-8.

Hayashi Y, Ueki K, Waha A, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A. Association of EGFR gene amplification and CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion in glioblastoma multiforme. *Brain Pathol*. 1997;7:871-5.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, i saradnici MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352:997-1003.

Hernando E, Nahle Z, Juan G, Diaz-Rodriguez E, Alaminos M, Hemann M, i saradnici Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature*. 2004;430:797-802.

Hirsch FR, Varella-Garcia M, Cappuzzo F. Predictive value of EGFR and HER2 overexpression in advanced non-small-cell lung cancer. *Oncogene*. 2009;28 Suppl 1:S32-7.

Hosokawa K, Aharoni D, Dantes A, Shaulian E, Schere-Levy C, Atzmon R, i saradnici Modulation of Mdm2 expression and p53-induced apoptosis in immortalized human ovarian granulosa cells. *Endocrinology*. 1998;139:4688-700.

Houillier C, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, Laigle-Donadey F, Criniere E, Mokhtari K, i saradnici Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. *Cancer*. 2006;106:2218-23.

Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;71:533-54.

Huang PH, Xu AM, White FM. Oncogenic EGFR signaling networks in glioma. *Sci Signal*. 2009;2:re6.

Huang S, Maher VM, McCormick JJ. Extracellular Ca<sup>2+</sup> stimulates the activation of mitogen-activated protein kinase and cell growth in human fibroblasts. *Biochem J*. 1995;310 ( Pt 3):881-5.

Huang Y, Chang Y (2011). Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Phosphorylation, Signaling and Trafficking in Prostate Cancer, *Prostate Cancer - From Bench to Bedside*, Dr. Philippe E. Spiess (Ed.), ISBN: 978-953-307-331-6, InTech.

Huo L, Wang YN, Xia W, Hsu SC, Lai CC, Li LY, i saradnici RNA helicase A is a DNA-binding partner for EGFR-mediated transcriptional activation in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:16125-30.

Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21:177-84.

Ino Y, Silver JS, Blazejewski L, Nishikawa R, Matsutani M, von Deimling A, i saradnici Common regions of deletion on chromosome 22q12.3-q13.1 and 22q13.2 in human astrocytomas appear related to malignancy grade. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999;58:881-5.

Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, i saradnici Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol.* 1999;9:469-79.

Jallepalli PV, Lengauer C. Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat Rev Cancer.* 2001;1:109-17.

Janes SM, Watt FM. New roles for integrins in squamous-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:175-83.

Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res.* 2003;284:31-53.

Kanu OO, Hughes B, Di C, Lin N, Fu J, Bigner DD, i saradnici Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin Med Oncol.* 2009;3:39-52.

Karlbom AE, James CD, Boethius J, Cavenee WK, Collins VP, Nordenskjold M, i saradnici Loss of heterozygosity in malignant gliomas involves at least three distinct regions on chromosome 10. *Hum Genet.* 1993;92:169-74.

Kelly PJ. Gliomas: Survival, origin and early detection. *Surg Neurol Int.* 2010;1:96.

Kim WY, Sharpless NE. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell.* 2006;127:265-75.

Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature.* 1997;386:761, 3.

Kita D, Yonekawa Y, Weller M, Ohgaki H. PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol.* 2007;113:295-302.

Kleihues P, Sobin LH. World Health Organization classification of tumors. *Cancer.* 2000;88:2887.

Knobbe CB, Merlo A, Reifenberger G. Pten signaling in gliomas. *Neuro Oncol.* 2002;4:196-211.

Knudsen ES, Wang JY. Targeting the RB-pathway in cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2010;16:1094-9.

Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68:820-3.



Koh J, Enders GH, Dynlacht BD, Harlow E. Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature*. 1995;375:506-10.

Kronenwett U, Ploner A, Zetterberg A, Bergh J, Hall P, Auer G, i saradnici Genomic instability and prognosis in breast carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15:1630-5.

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358:15-6.

Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, i saradnici Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell*. 1993;75:1215-25.

Lee JO, Yang H, Georgescu MM, Di Cristofano A, Maehama T, Shi Y, i saradnici Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell*. 1999;99:323-34.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*. 1997;386:623-7.

Leung SY, Yuen ST, Chan TL, Chan AS, Ho JW, Kwan K, i saradnici Chromosomal instability and p53 inactivation are required for genesis of glioblastoma but not for colorectal cancer in patients with germline mismatch repair gene mutation. *Oncogene*. 2000;19:4079-83.

Levine AJ, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ*. 2006;13:1027-36.

Lin H, Bondy ML, Langford LA, Hess KR, Delclos GL, Wu X, i saradnici Allelic deletion analyses of MDM2/PTEN and DMBT1 loci in gliomas: relationship to prognostic significance. *Clin Cancer Res*. 1998;4:2447-54.

Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, i saradnici Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol*. 2001;3:802-8.

Liu D, Guo H, Griffin JH, Fernandez JA, Zlokovic BV. Protein S confers neuronal protection during ischemic/hypoxic injury in mice. *Circulation*. 2003;107:1791-6.

Liu FK. [Effect of hypocaloric nutritional support on protein metabolism in patients with gastric cancer after radical gastrectomy]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 1989;27:409-12, 45.

Liu H, Dong H, Robertson K, Liu C. DNA methylation suppresses expression of the urea cycle enzyme carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1) in human hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol*. 2011;178:652-61.

Liu W, Zhou Y, Reske SN, Shen C. PTEN mutation: many birds with one stone in tumorigenesis. *Anticancer Res*. 2008;28:3613-9.

Lo HW, Hung MC. Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *Br J Cancer*. 2006;94:184-8.

- Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* 1991;51:3075-9.
- Loeb LA. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* 2001;61:3230-9.
- Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:776-81.
- Lois AF, Cooper LT, Geng Y, Nobori T, Carson D. Expression of the p16 and p15 cyclin-dependent kinase inhibitors in lymphocyte activation and neuronal differentiation. *Cancer Res.* 1995;55:4010-3.
- Louis DN. The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1994;53:11-21.
- Louis DN. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:97-117.
- Louis DN, Holland EC, Cairncross JG. Glioma classification: a molecular reappraisal. *Am J Pathol.* 2001;159:779-86.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, i saradnici The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114:97-109.
- Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 2000;21:485-95.
- Maass N, Hojo T, Zhang M, Sager R, Jonat W, Nagasaki K. Maspin--a novel protease inhibitor with tumor-suppressing activity in breast cancer. *Acta Oncol.* 2000;39:931-4.
- Majerus PW. Inositols do it all. *Genes Dev.* 1996;10:1051-3.
- Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Jr., Nelson CE, Kim DH, i saradnici Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science.* 1990;250:1233-8.
- Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007;129:1261-74.
- Marin MC, Jost CA, Brooks LA, Irwin MS, O'Nions J, Tidy JA, i saradnici A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat Genet.* 2000;25:47-54.
- Markovic J, Stojsic J, Zunic S, Ruzdijic S, Tanic N. Genomic instability in patients with non-small cell lung cancer assessed by the arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Cancer Invest.* 2008;26:262-8.
- Martinez R, Schackert HK, Appelt H, Plaschke J, Baretton G, Schackert G. Low-level microsatellite instability phenotype in sporadic glioblastoma multiforme. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005;131:87-93.
- Matheu A, Maraver A, Collado M, Garcia-Cao I, Canamero M, Borrás C, i saradnici Anti-aging activity of the Ink4/Arf locus. *Aging Cell.* 2009;8:152-61.

Maxwell GL, Risinger JI, Gumbs C, Shaw H, Bentley RC, Barrett JC, i saradnici Mutation of the PTEN tumor suppressor gene in endometrial hyperplasias. *Cancer Res.* 1998;58:2500-3.

McClelland M, Welsh J (1994) DNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *PCR Methods Appl* S59-S65

McClintock JL, Ceresa BP. Transforming growth factor- $\alpha$  enhances corneal epithelial cell migration by promoting EGFR recycling. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:3455-61.

McDermott KM, Zhang J, Holst CR, Kozakiewicz BK, Singla V, Tlsty TD. p16(INK4a) prevents centrosome dysfunction and genomic instability in primary cells. *PLoS Biol.* 2006;4:e51.

Mead LJ, Gillespie MT, Hung JY, Rane US, Rayeroux KC, Irving LB, i saradnici Frequent loss of heterozygosity in early non-small cell lung cancers at chromosome 9p21 proximal to the CDKN2a gene. *Int J Cancer.* 1997;71:213-7.

Meek DW. Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene.* 1999;18:7666-75.

Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, i saradnici Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med.* 2005;353:2012-24.

Mengubas K, Jabbar SA, Nye KE, Wilkes S, Hoffbrand AV, Wickremasinghe RG. Inactivation of calcium ion-regulating inositol polyphosphate second messengers is impaired in subpopulations of human leukemia cells. *Leukemia.* 1994;8:1718-25.

Milinkovic V, Bankovic J, Rakic M, Milosevic N, Stankovic T, Jokovic M, i saradnici Genomic instability and p53 alterations in patients with malignant glioma. *Exp Mol Pathol.* 2012;93:200-6.

Millau JF, Bastien N, Drouin R. P53 transcriptional activities: a general overview and some thoughts. *Mutat Res.* 2009;681:118-33.

Mitchell CA, Gurung R, Kong AM, Dyson JM, Tan A, Ooms LM. Inositol polyphosphate 5-phosphatases: lipid phosphatases with flair. *IUBMB Life.* 2002;53:25-36.

Mitchell S, Ellingson C, Coyne T, Hall L, Neill M, Christian N, i saradnici Genetic variation in the urea cycle: a model resource for investigating key candidate genes for common diseases. *Hum Mutat.* 2009;30:56-60.

Morris SM. A role for p53 in the frequency and mechanism of mutation. *Mutat Res.* 2002;511:45-62.

Nagaishi M, Kim YH, Mittelbronn M, Giangaspero F, Paulus W, Brokinkel B, i saradnici Amplification of the STOML3, FREM2, and LHFP genes is associated with mesenchymal differentiation in gliosarcoma. *Am J Pathol.* 2012;180:1816-23.

Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, Asker C, Wiman K, Yonekawa Y, i saradnici p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol.* 2001;11:159-68.

Navarro JM, Jorcano JL. The use of arbitrarily primed polymerase chain reaction in cancer research. *Electrophoresis.* 1999;20:283-90.

Newcomb EW, Cohen H, Lee SR, Bhalla SK, Bloom J, Hayes RL, i saradnici Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. *Brain Pathol.* 1998;8:655-67.

Nicholas MK, Lukas RV, Jafri NF, Faoro L, Salgia R. Epidermal growth factor receptor - mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. *Clin Cancer Res.* 2006;12:7261-70.

Nishizaki T, Harada K, Kubota H, Furuya T, Suzuki M, Sasaki K. Chromosome instability in malignant astrocytic tumors detected by fluorescence in situ hybridization. *J Neurooncol.* 2002;56:159-65.

Noda M, Higashida H, Aoki S, Wada K. Multiple signal transduction pathways mediated by 5-HT receptors. *Mol Neurobiol.* 2004;29:31-9.

Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976;194:23-8.

Nyati MK, Morgan MA, Feng FY, Lawrence TS. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:876-85.

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, i saradnici Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004;64:6892-9.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007;170:1445-53.

Okami K, Wu L, Riggins G, Cairns P, Goggins M, Evron E, i saradnici Analysis of PTEN/MMAC1 alterations in aerodigestive tract tumors. *Cancer Res.* 1998;58:509-11.

Oliveira AM, Ross JS, Fletcher JA. Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers. *Am J Clin Pathol.* 2005;124 Suppl:S16-28.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:2766-70.

Ozawa E, Mizuno Y, Hagiwara Y, Sasaoka T, Yoshida M. Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. *Muscle Nerve.* 2005;32:563-76.

Pai VP, Marshall AM, Hernandez LL, Buckley AR, Horseman ND. Altered serotonin physiology in human breast cancers favors paradoxical growth and cell survival. *Breast Cancer Res.* 2009;11:R81.

Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, i saradnici An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008;321:1807-12.

Peinado MA, Malkhosyan S, Velazquez A, Perucho M. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:10065-9.

Petit MM, Schoenmakers EF, Huysmans C, Geurts JM, Mandahl N, Van de Ven WJ. LHFP, a novel translocation partner gene of HMGIC in a lipoma, is a member of a new family of LHFP-like genes. *Genomics*. 1999;57:438-41.

Peto R, Roe FJ, Lee PN, Levy L, Clack J. Cancer and ageing in mice and men. *Br J Cancer*. 1975;32:411-26.

Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*. 1993;72:962-70.

Planchon SM, Waite KA, Eng C. The nuclear affairs of PTEN. *J Cell Sci*. 2008;121:249-53.

Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol*. 1999;187:112-26.

Puc J, Keniry M, Li HS, Pandita TK, Choudhury AD, Memeo L, i saradnici Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. *Cancer Cell*. 2005;7:193-204.

Rajagopalan H, Jallepalli PV, Rago C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, i saradnici Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature*. 2004;428:77-81.

Rasheed BK, Stenzel TT, McLendon RE, Parsons R, Friedman AH, Friedman HS, i saradnici PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. *Cancer Res*. 1997;57:4187-90.

Reid BJ, Prevo LJ, Galipeau PC, Sanchez CA, Longton G, Levine DS, i saradnici Predictors of progression in Barrett's esophagus II: baseline 17p (p53) loss of heterozygosity identifies a patient subset at increased risk for neoplastic progression. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:2839-48.

Reifenberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res*. 1993;53:2736-9.

Rodemann HP, Dittmann K, Toulany M. Radiation-induced EGFR-signaling and control of DNA-damage repair. *Int J Radiat Biol*. 2007;83:781-91.

Romagosa C, Simonetti S, Lopez-Vicente L, Mazo A, Leonart ME, Castellvi J, i saradnici p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*. 2011;30:2087-97.

Rozan LM, El-Deiry WS. p53 downstream target genes and tumor suppression: a classical view in evolution. *Cell Death Differ.* 2007;14:3-9.

Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell.* 2008;133:403-14.

Sano T, Lin H, Chen X, Langford LA, Koul D, Bondy ML, i saradnici Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis. *Cancer Res.* 1999;59:1820-4.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Second ed. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1989.

Saraon P, Musrap N, Cretu D, Karagiannis GS, Batruch I, Smith C, i saradnici Proteomic profiling of androgen-independent prostate cancer cell lines reveals a role for protein S during the development of high grade and castration-resistant prostate cancer. *J Biol Chem.* 2012;287:34019-31.

Schrock E, Blume C, Meffert MC, du Manoir S, Bersch W, Kiessling M, i saradnici Recurrent gain of chromosome arm 7q in low-grade astrocytic tumors studied by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 1996;15:199-205.

Sekulic A, Kim SY, Hostetter G, Savage S, Einspahr JG, Prasad A, i saradnici Loss of inositol polyphosphate 5-phosphatase is an early event in development of cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Prev Res (Phila).* 2010;3:1277-83.

Sengupta R, Sun T, Warrington NM, Rubin JB. Treating brain tumors with PDE4 inhibitors. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32:337-44.

Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature.* 1993;366:704-7.

Shen WH, Balajee AS, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi PP, i saradnici Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell.* 2007;128:157-70.

Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 1995;9:1149-63.

Siddiqui EJ, Thompson CS, Mikhailidis DP, Mumtaz FH. The role of serotonin in tumour growth (review). *Oncol Rep.* 2005;14:1593-7.

Simmons ML, Lamborn KR, Takahashi M, Chen P, Israel MA, Berger MS, i saradnici Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res.* 2001;61:1122-8.

Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, i saradnici PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:1246-56.

Smith JS, Wang XY, Qian J, Hosek SM, Scheithauer BW, Jenkins RB, i saradnici Amplification of the platelet-derived growth factor receptor-A (PDGFRA) gene occurs in oligodendrogliomas with grade IV anaplastic features. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000;59:495-503.

Snuderl M, Fazlollahi L, Le LP, Nitta M, Zhelyazkova BH, Davidson CJ, i saradnici Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer Cell.* 2011;20:810-7.

Soussi T. Focus on the p53 gene and cancer: advances in TP53 mutation research. *Hum Mutat.* 2003;21:173-5.

Soussi T, Beroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 2001;1:233-40.

Speed CJ, Little PJ, Hayman JA, Mitchell CA. Underexpression of the 43 kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase is associated with cellular transformation. *EMBO J.* 1996;15:4852-61.

Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, i saradnici Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell.* 1998;95:29-39.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, i saradnici Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:987-96.

Taguchi G, Wu Y. Introduction to off-line quality control. Japan Quality Control Organization. Nagoya, Japan. 1980.

Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science.* 1998;280:1614-7.

Tomlinson I, Sasieni P, Bodmer W. How many mutations in a cancer? *Am J Pathol.* 2002;160:755-8.

Tomlinson IP, Novelli MR, Bodmer WF. The mutation rate and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:14800-3.

Tunici P, Bissola L, Lualdi E, Pollo B, Cajola L, Broggi G, i saradnici Genetic alterations and in vivo tumorigenicity of neurospheres derived from an adult glioblastoma. *Mol Cancer.* 2004;3:25.

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, i saradnici Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96:261-8.

- Valent P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, Copland M, Melo JV, i saradnici Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:767-75.
- Valk K, Voorder T, Kolde R, Reintam MA, Petzold C, Vilo J, i saradnici Gene expression profiles of non-small cell lung cancer: survival prediction and new biomarkers. *Oncology*. 2010;79:283-92.
- Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin*. 2010;60:166-93.
- Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J*. 2000;346 Pt 3:561-76.
- Venkatesan RN, Bielas JH, Loeb LA. Generation of mutator mutants during carcinogenesis. *DNA Repair (Amst)*. 2006;5:294-302.
- Vogelstein B, Kinzler KW. Achilles' heel of cancer? *Nature*. 2001;412:865-6.
- Vogelstein B, Kinzler KW. *The genetic basis of human cancer*. Second edition. McGraw, Hill: New York, 2002.
- Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 2004;10:789-99.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;408:307-10.
- Wager M, Menei P, Guilhot J, Levillain P, Michalak S, Bataille B, i saradnici Prognostic molecular markers with no impact on decision-making: the paradox of gliomas based on a prospective study. *Br J Cancer*. 2008;98:1830-8.
- Wahl GM, Linke SP, Paulson TG, Huang LC. Maintaining genetic stability through TP53 mediated checkpoint control. *Cancer Surv*. 1997;29:183-219.
- Wang SC, Nakajima Y, Yu YL, Xia W, Chen CT, Yang CC, i saradnici Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nat Cell Biol*. 2006;8:1359-68.
- Watanabe N, Okochi E, Hirayama Y, Shimada Y, Yanagihara K, Yoshida MC, i saradnici Single nucleotide instability without microsatellite instability in rat mammary carcinomas. *Cancer Res*. 2001;61:2632-40.
- Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995;81:323-30.
- Weinberg RA. *The biology of cancer*. Garland Science, Taylor & Francis Group, 2007.
- Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31:637-43.



Weng LP, Brown JL, Eng C. PTEN coordinates G(1) arrest by down-regulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model. *Hum Mol Genet.* 2001;10:599-604.

Xiao A, Wu H, Pandolfi PP, Louis DN, Van Dyke T. Astrocyte inactivation of the pRb pathway predisposes mice to malignant astrocytoma development that is accelerated by PTEN mutation. *Cancer Cell.* 2002;1:157-68.

Yamada KM, Araki M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci.* 2001;114:2375-82.

Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer.* 2001;37 Suppl 4:S3-8.

Yin Y, Shen WH. PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene.* 2008;27:5443-53.

Zhang Z, Stiegler AL, Boggon TJ, Kobayashi S, Halmos B. EGFR-mutated lung cancer: a paradigm of molecular oncology. *Oncotarget.* 2010;1:497-514.

Yu JC, Shen CY. Two-hit Hypothesis of Tumor Suppressor Gene and Revisions *J Med Sci* 2002;22:13-18.

Zingg JM, Jones PA. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1997;18:869-82.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Vedrana Milinković je rođena 23.10.1979. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala 1998. godine, a završila 2007. godine na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija, smer Genetičko inženjerstvo i biotehnologija, sa prosečnom ocenom 9,4 tokom studiranja i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Dobitnik je nagrade fondacije Goran Ljubijankić za najbolji diplomski rad iz oblasti molekularne biologije odbranjen u 2007. godini. Doktorske studije je upisala 2007. godine na Biološkom fakultetu, smer Molekularna biologija. Od 2006. godine je volontirala, a od 2008. godine je zaposlena na Odeljenju za neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” Univerziteta u Beogradu.

Naučno-istraživački rad Vedrane Milinković realizovan je kroz projekte finansirane od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. U periodu 2006-2010. godine učestvovala je u realizaciji projekta „Identifikacija specifičnih gena za terapiju kancera" (projekat 143009, Ministarstvo nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije), pod rukovodstvom dr Sabere Ruždijić. U okviru ovog projekta započet je rad na izradi doktorske disertacije pod mentorstvom dr Nikole Tanića i dr Gordane Matić. Od 2011. godine Vedrana Milinković je zaposlena kao istraživač saradnik na projektu „Identifikacija molekularnih markera za predikciju progresije tumora, odgovora na terapiju i ishoda bolesti” (projekat III41031, Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije) pod rukovodstvom dr Nikole Tanića. Na ovom projektu je nastavljena realizacija istraživačkog zadatka koji se odnosi na izradu njene doktorske teze. Koautor je 4 rada u vodećim međunarodnim časopisima, kao i brojnih domaćih i međunarodnih kongresnih saopštenja.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Ведрана Милинковић \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ ИО070008 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Детекција и карактеризација геномске нестабилности тумора мозга глијалног порекла**

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

Потпис докторанда

У Београду, 19.04.2013.



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Ведрана Милинковић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ ИО070008 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Молекуларна биологија \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_Детекција и карактеризација геномске нестабилности тумора  
мозга глијалног порекла \_\_\_\_\_

Ментор \_\_\_\_\_ др Никола Танић и др Гордана Матић \_\_\_\_\_

Потписани/а \_\_\_\_\_ Ведрана Милинковић \_\_\_\_\_

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 19.04.2013.



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

---

**Детекција и карактеризација геномске нестабилности тумора мозга глијалног порекла**

---

која је моје ауторско дело.

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

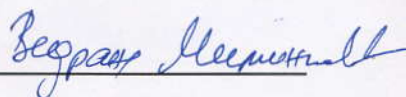
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 19.04.2013.





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

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

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

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

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

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