

# Mismatch repair geni u glioblastomu

---

Košpić, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:453314>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija

Karla Košpić, 6515/BT

**MISMATCH REPAIR GENI U  
GLIOBLASTOMU**

Završni rad

Modul: Biologija 2

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

Zagreb, 2016.

# DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

## MISMATCH REPAIR GENI U GLIOBLASTOMU

Karla Košpić, 6515/BT

**Sažetak:** Cilj ovog rada je dati osvrt na dosadašnja saznanja o ulozi mismatch repair gena (MMR) u jednom od najsmrtonosnijih tumora mozga - multiformnom glioblastomu (GBM). Do sada je poznato kako manjak aktivnosti MMR gena može uzrokovati nastanak tumora, te da je mikrosatelitna nestabilnost u većini slučajeva vezana uz mutacije na MMR genima, no nije otkrivena kod svih tumora. Nadalje, u vezu su stavljeni utjecaji ekspresije *MGMT* gena i gubitka MMR gena na pojavu recidiva GBM-a kao i na pojavu rezistencije na temozolomid. Naposljetku, dobiven je uvid u nova istraživanja o mogućim primjenama MMR gena u liječenju glioblastoma, a uključuju koncepte sintetičke letalnosti i primjene genske terapije.

**Ključne riječi :** Glioblastom, mismatch repair geni, temozolomid, *MGMT* gen

**Rad sadrži :** 31 stranica, 9 slika, 51 literaturni navod, 0 priloga

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u:** Knjižnica PBF-a, Kačićeva 23, Zagreb

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

**Rad predan:** kolovoz, 2016.

# DOCUMENTATION CARD

Final work

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

## MISMATCH REPAIR GENES IN GLIOBLASTOMA

Karla Košpić, 6515/ BT

**Abstract:** The aim of this work was to give a review of on record findings of the role of mismatch repair genes (MMR) in the most lethal tumor known - the glioblastoma multiforme (GBM). It is known that the MMR deficiency can cause tumor growth and that it is partly related to the occurrence of the microsatellite instability, but the same phenomenon is not discovered in all tumor samples. Furthermore, the role of *MGMT* expression as well as MMR deficiency has been investigated in order to find out the mechanisms of GBM recurrence and also development of temozolomide resistance. Ultimately, we have got an insight of possible MMR applications in treating GBM, which includes the concept of synthetic lethality and also application of gene therapy.

**Keywords:** Glioblastoma, mismatch repair genes, temozolomide, *MGMT* gene

**Thesis contains:** 31 pages, 9 figures, 51 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

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

**Thesis delivered:** August, 2016.

## SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
2. MULTIFORMNI GLIOBLASTOM (GBM).....	2
2.1. Općenito o tumorima .....	2
2.2. Opće značajke glioblastoma i klinička slika .....	2
3. MISMATCH REPAIR GENI (MMR).....	3
3.1. Geni uključeni u popravak oštećene DNA .....	4
3.2. Otkriće i uloga mismatch repair gena.....	4
3.3. Mehanizmi nastanka krivo sparenih baza.....	5
3.4. Mutatorski fenotip i mikrosatelitna nestabilnost .....	7
3.5. MMR geni i HNPCC sindrom .....	7
3.5.1. Povezanost HNPCC sindroma s razvitkom tumora .....	8
4. MISMATCH REPAIR GENI U GLIOBLASTOMU.....	9
4.1. Atlas genoma ljudskog karcinoma .....	9
4.1.1. Genetske značajke glioblastoma .....	10
4.2. Mikrosatelitna nestabilnost (MSI) u glioblastomu .....	10
4.3. Utjecaj metilacije <i>MGMT</i> promotora na liječenje GBM-a.....	11
4.3.1. Promotor gena <i>MGMT</i> .....	12
4.3.2. Metilacija <i>MGMT</i> u glioblastomu .....	12
4.3.3. Veza između metilacije promotora <i>MGMT</i> i mismatch repair gena	12

4.4.	Gubitak heterozigotnosti pojedinih kromosoma GBM .....	14
4.4.1.	Pojam heterozigotnosti .....	14
4.4.2.	Utjecaj gubitka heterozigotnosti na razvoj karcinoma.....	15
4.4.3.	Najčešće genske alteracije povezane s LOH-om u GBM-u.....	15
4.5.	Poveznica između promotora <i>MGMT</i> , mismatch repair gena i pojave recidiva GBM.....	16
4.5.1.	Povratak tumora nakon završetka terapije- recidivi glioblastoma ...	16
4.5.2.	usporedba utjecaja metilacije promotora <i>MGMT</i> na primarni GBM i recidive.....	17
4.6.	Gubitak mismatch proteina MSH6 u humanom glioblastomu.....	18
4.6.1.	Gubitak <i>MSH6</i> u recidivima GBM-a .....	19
4.6.2.	Metilacija <i>MGMT</i> promotora i mutacije na <i>MSH6</i> .....	19
4.6.3.	Signalni putevi popravka.....	20
5.	ULOGA MISMATCH REPAIR GENA U PRONALASKU NOVIH NAČINA LIJEČENJA TUMORA.....	20
5.1.	Način djelovanja temozolomida .....	20
5.1.1.	Uloga homologne rekombinacije u razvitku rezistencije na temozolomid.....	21
5.2.	Utjecaj radioterapije na MMR gene .....	22
5.3.	Povezanost mutacija MMR gena i sintetičke letalnosti.....	23
5.4.	Uloga MMR gena u genskoj terapiji .....	23
6.	ZAKLJUČAK .....	24
7.	REFERENCE.....	3

## 1. UVOD

U odrasloj populaciji multiformni glioblastom je jedan od najsmrtonosnijih tumora i predstavlja gotovo polovicu svih primarnih tumora mozga. Desetljeća pokušaja razvijanja efikasne terapije nisu dali željene rezultate i dosadašnja dostignuća uspjela su samo neznatno produžiti životni vijek oboljelih. Predviđeni životni vijek oboljelih koji primaju odgovarajuću terapiju jest između 12 i 15 mjeseci, dok oni koji ne tretiraju tumor umiru unutar 3 mjeseca. Terapija protiv glioblastoma uključuje kombinacija kirurške resekcije što većeg dijela tumora, popraćenu radioterapijom te kemoterapijom s temozolomidom (TMZ). Iako se inicijalnom terapijom može gotovo potpuno izlječiti tumor, još uvijek nije u potpunosti jasno zašto u svim poznatim slučajevima nastupa pojava recidiva i koji molekularni mehanizmi stoje iza te pojave. Stoga je u svrhu otkrivanja genskih abnormalnosti koje dovode do nastanka tumora, godine 2008. započet je projekt „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA) kojemu je cilj bio mapirati genome preko 100 poznatih vrsta tumora, među kojima je prvi mapiran genom bio upravo genom glioblastoma. Međutim desetak godina prije toga već je pronađena poveznica između mutacija na mismatch repair genima i nastanka Lynch-ovog sindroma- genskog poremećaja koji prethodi nastanku različitih tumora, uključujući i glioblastom. Nadalje, nekolicina nezavisnih studija identificirala je metilaciju promotora *MGMT* gena kao biomarker koji dosta pouzdano može predviditi dugotrajno preživljavanje bez progresije (PFS) i ukupnu mogućnost preživljenja glioblastoma nakon terapije TMZ-om. Supresija promotora gena O<sup>6</sup>-metilgvanin-DNA metiltransferaze povezana je s poboljšanom reakcijom glioblastoma na tretman temozolomidom. Međutim, zašto dolazi do pojave recidiva, te koji su molekularni mehanizmi rezistencije na terapiju, još uvijek nije u potpunosti jasno. Pretpostavka je da je terapija temozolomidom selektivna za nemetilirane *MGMT* tumorske stanice što omogućuje rezistentnim staničnim klonovima ponovan nekontroliran rast i u konačnici povratak tumora

## 2. MULTIFORMNI GLIOBLASTOM (GBM)

### 2.1. Općenito o tumorima

Tumor je naziv koji obuhvaća skupinu oboljenja koju karakterizira nastanak mase izmjenjenih stanica koje pokazuju nekontroliran i progresivan rast.

U zdravom organizmu ljudske stanice rastu i dijele se ovisno o potrebama organizma, a kad ostare, odnosno ukoliko dođe do oštećenja stanica, one umiru i nove stanice uzimaju njihovo mjesto. Međutim, tumorske stanice imaju sposobnost preživljavanja i u slučajevima teških oštećenja pa i starenja a istovremeno rastu nove stanice iako organizam ne prepoznaje potrebu za istima.

Razlikujemo dvije glavne skupine tumora - benigni (dobročudni) tumori, koji ne prodiru u okolno zdravo tkivo i ne metastaziraju na druge organe, te maligni (zloćudni) tumori koji imaju mogućnost širenja i napadanja okolnog zdravog tkiva te stvaranja metastaza.

Tumori su genska oboljenja, odnosno uzrokuju promjene na samim genima koji kontroliraju rast, diobu te funkcije stanica. Alteracije genoma koje mogu pokrenuti rast i razvoj malignih stanica tumora mogu biti: promjene sekvence DNA, aberacije broja kopija, preraspodjela kromosoma, te modifikacije metilacije DNA.<sup>2</sup>

Genske promjene koje mogu prethoditi razvoju tumora mogu biti nasljedne, odnosno prenositi se s direktnog krvnog srodnika. Također, mogu biti posljedica pogrešaka nastalih prilikom diobe stanica ili zbog oštećenja na DNA nastalih pod utjecajem vanjskih faktora (agresivnih kemikalija, zračenja poput UV ili X zraka...).

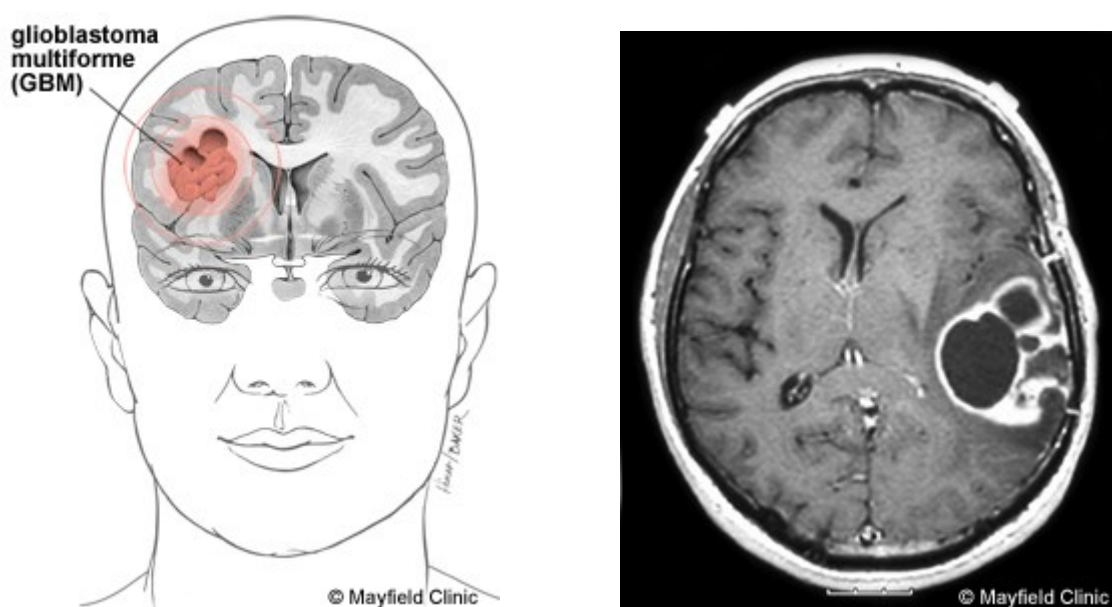
Svaki tumor je individua poput osobe koja ga nosi, posjeduje unikatnu kombinaciju genskih promjena, pa tako i unutar istog tumora različite stanice mogu sadržavati različite promjene. Stoga, iako postoje već propisane terapije za većinu poznatih vrsta tumora, one se moraju još dodatno prilagoditi svakom pojedinačnom pacijentu u svrhu postizanja boljih rezultata liječenja.<sup>1</sup>

### 2.2. Opće značajke glioblastoma i klinička slika



Glioblastoma multiforme (GBM), glioblastom ili astroцитom IV stupnja, najučestaliji je i najsmrtonosniji tumor mozga i u rjeđim slučajevima leđne moždine.<sup>2</sup> To je brzorastući tumor čije stanice započinju svoj rast i diobu unutar nakupina glija stanica zvjezdastog oblika-astrocита. Pogađa ponajviše ljude starije životne dobi (iznad 50 godina) i to osobito muškarce.<sup>3</sup> Za sada nije pronađen način kojim se GBM može potpuno ukloniti, odnosno izliječiti, te je predviđeni životni vijek oboljelih koji primaju terapiju temozolomidom i radioterapiju srednje vrijeme preživljenja je oko 14.6 mjeseci; dok samo oko 30% oboljelih poživi do 2 godine. Međutim studija iz 2009. objavila je kako gotovo 10% oboljelih preživi čak 5 godina ili nešto više. Kao dosad najučinkovitiji tretman protiv GBM-a, koristi se kombinacija kirurške resekcije što većeg dijela tumora, popraćena radioterapijom te kemoterapijom s temozolomidom.<sup>5</sup>

Mnoge studije su potvrdile da postoje primarni i sekundarni glioblastom koji imaju različite genetičke puteve nastanka. Za primarni GBM tipično je pojačanje aktivnosti EGFR receptora, mutacija PTEN gena i gubitak cijelog kromosoma 10, dok se uz sekundarni GBM vežu mutacije TP53 i gubitak kromosoma 19q.<sup>6</sup>



Slika 1. Ilustracija i snimak magnetske rezonance glioblastoma tjemenožnog režnja.<sup>7</sup>

### 3. MISMATCH REPAIR GENI (MMR)

[Type text]

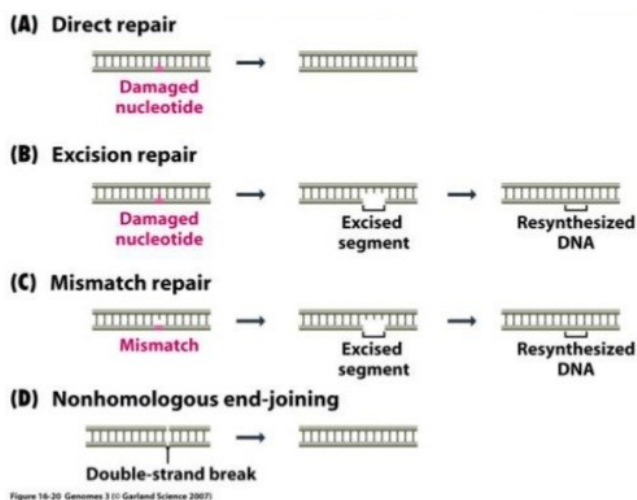
### 3.1. Geni uključeni u popravak oštećene DNA

Genske promjene koje mogu dovesti do nastanka tumora mogu zahvatiti jednu od tri velike skupine gena: proto-onkogeni, geni supresori tumora i geni za popravak oštećene DNA. Promjene na ovim genima često nazivaju “pokretačima tumora“.<sup>9</sup>

Stanična DNA je podložna promjenama, odnosno oštećenjima koja se mogu javiti uslijed djelovanja vanjskih čimbenika poput ionizirajućeg ili ultraljubičastog zračenja te djelovanja kemijskih agensa, ili može doći do unutarnjih oštećenja tijekom same replikacije DNA (oksidativna oštećenja DNA i spontani gubitak baza.)

Ljudski genom, kao i genomi ostalih organizama, posjeduje informacije koje mu pomažu u očuvanju genske cjelovitosti i vijabilnosti. Ukoliko dođe do oštećenja, stanica u svrhu samoočuvanja aktivira razne molekulske mehanizme popravka kao što su: reverzija oštećenja, bazni i nukleotidni ekscizijski popravak, rekombinantni popravak i popravak krivo sparenih baza. Popravak oštećene DNA može stanicu potpuno vratiti u prvobitno stanje ali može doći i do pogrešaka uslijed popravka u smislu tolerancije i zaobilaženja oštećenja, što rezultira izmjenom u redosljedju baza DNA i mogućim nastankom mutacija.<sup>10</sup> Stanica koja je nakupila dostatnu količinu oštećenja ili ako više efektivno ne popravlja štetu nastalu na njenoj DNA može ući u jedan od tri procesa:

- biološko starenje stanice ili ireverzibilno stanje spavanja
- programiranu staničnu smrt - apoptozu
- nekontroliranu diobu stanica koja vodi do nastanka tumora.<sup>11</sup>



Slika 2. Vrste popravka oštećene DNA.

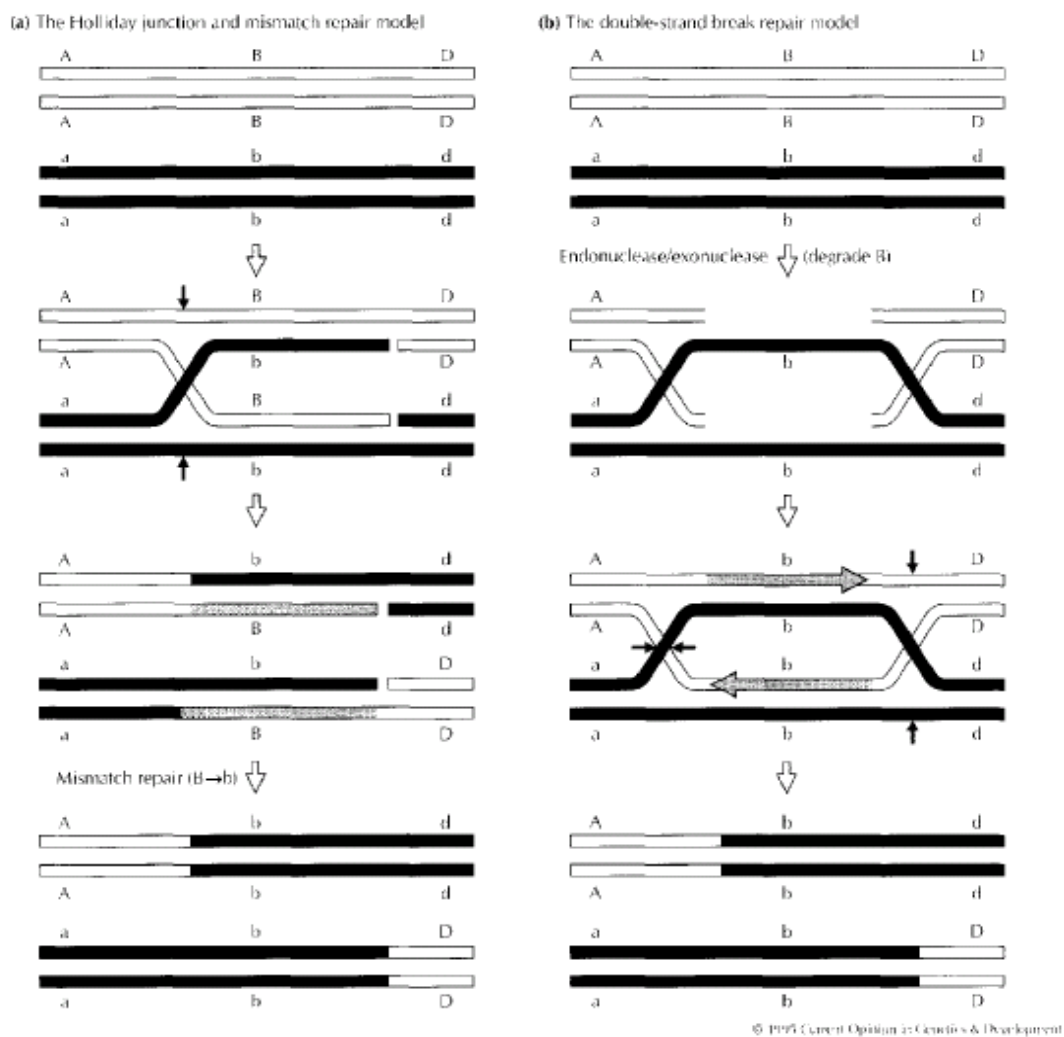
### 3.2. Otkriće i uloga mismatch repair gena

Prvi spomen MMR gena datira iz 70-th godina prošlog stoljeća, a radi se o genima *hexA* i *hexB* iz bakterije *Streptococcus pneumoniae*. Prva istraživanja o MMR genima provedena na *E. coli* otkrila su da je popravak krivo sparene baze karakteriziran odsutnošću metiliranog adenina na d(GATC) mjestu novosintetiziranog DNA lanca. Stoga, funkcija hemimetiliranog d(GATC) lanca (roditeljskog lanca) u popravku krivo sparene baze jest da osigura lom na nemetiliranom lancu (lancu kćeri) koji služi kao signal za početak popravka.<sup>12</sup> Geni odgovorni za popravak krivo sparenih baza u *E. coli* su homo-oligomeri *mutS* i *mutL*. MutS prepoznaje grešku u sparivanju i šalje signal o položaju pogreške na lancu DNA; zatim *mutL* gen započinje proces popravka.<sup>13</sup>

Signal koji usmjeruje ispravak replikacijskih pogrešaka kod eukariota još uvijek nije jasno definiran, međutim poznato je da lom na jednom lancu DNA dovoljan pokretač mehanizma popravka. Kod sisavaca, homologni *mutS* djeluju kao heterodimer, pri čemu su analozi genu *mutSa* eukariotski kompleks *MSH2-MSH6*, dok su analozi *mutSb* kompleks *MSH2-MSH3*.<sup>14</sup> U gotovo 90% slučajeva, MMR gen *MSH2* nalazi se u obliku kompleksa *MSH2-MSH6* i njegova funkcija je prepoznati krivo sparivanje baza uslijed delecije ili insercije, kada se događa da su jedan ili dva nukleotida ostala nesparena; ali isto tako može prepoznati delecije i insercije većeg broja baza.<sup>15</sup> Kompleks *MSH2-MSH3* odgovoran je za prepoznavanje i popravak insercija i delecija 2 do 8 nukleotida. *MSH3* gen je uključen u velik broj somatskih mutacija u tumorima i njegova inaktivacija može povećati mogućnost pojave mutacija u ostalim mismatch repair genima. Eukariotske stanice posjeduju tri kompleksa koji su analozi genu *mutL* iz *E. coli*: *MLH1-PMS2* –analog *mutLa*, *MLH1-PMS1* – analog *mutLb* i *MLH1-MLH3*- analog *mutLy*. *MutLa* je najaktivniji od ovih kompleksa i obavlja popravke koje *mutS* kompleks prepoznaje. Uloga *mutLb* kompleksa u mismatch repair popravku u humanoj DNA još uvijek nije razjašnjena. Naposljetku, smanjena ekspresija pojedinih mismatch repair proteina može se razmatrati kao posljedica kumulativnih pogrešaka tokom popravka.<sup>16</sup>

### 3.3. Mehanizmi nastanka krivo sparenih baza

Prepoznavanje i popravak nepravilno sparenih nukleotida složen je proces kojim se stanica bori za preživljenje i očuvanje svojih funkcija. Do krivog sparivanja baza može doći zbog nepravilne insercije ili delecije baza, zbog grešaka prilikom replikacije DNA ili prilikom formiranja heterodupleksne DNA koja je intermedijer u procesu genske rekombinacije. Za razliku od nukleotidnog/baznog ekscizijskog popravka, kod kojeg stanica prepoznaje kemijski modificirane nukleotide/baze; kod “mismatch“ popravka, stanica prepoznaje normalne nukleotide koji ili nisu uopće spareni s odgovarajućim nukleotidom ili su spareni s nekomplementarnim nukleotidom.<sup>17</sup>



Slika 3. Holiday-ev model rekombinacije (a); popravak pomoću dvolančanog loma (b).<sup>18</sup>

Teoretske analize genske konverzije dovele su 1964. godine do postavljanja uvriježenog Holliday-evog modela genske rekombinacije, prema kojem DNA heterodupleks sadrži dva uparena DNA lanca od kojih svaki potječe iz dva različita roditeljska kromosoma. Takva heterodupleksna DNA derivirana iz genetski različitih kromosoma mutanta i divljeg tipa DNA, sadržava nepravilno sparene nukleotide. Popravak krivo sparenih baza ili nemogućnost popravka istih, smatra se glavnim uzrokom genske konverzije i post-mejotičkih segregacija genskih markera.<sup>18</sup>

Važnost popravka nesparenih i krivo sparenih baza je izrazito naglašena nakon što je otkriveno da postoji veza između tumora (bilo nasljednih ili sporadičnih) i nedostataka unutar ljudskih mehanizama popravka krivo sparenih baza.

Ekstrakti pripremljeni iz nekih tumorskih staničnih linija i staničnih linija otpornih na alkilirajuće agense pokazali su nedostatke aktivnosti vezanih uz popravak krivo sparenih baza ili pak nemogućnost popravka krivo sparenih baza *in vitro*.<sup>11</sup>

### 3.4. Mutatorski fenotip i mikrosatelitna nestabilnost

U *S.cerevisiae* mutacije gena *rash2*, *mlh1* i *pros 1, 2, 3* i *6* dovode do stvaranja mutatorskog fenotipa koji nastaje kao posljedica pogrešaka u sparivanju baza, dok mutacije gena *msh2*, *mlh1* i *pmsl* uzrokuju mikrosatelitnu nestabilnost. Sličan mutatorski fenotip i mikrosatelitna nestabilnost otkriveni su u ljudskim tumorskim stanicama, a uzrokuju ih mutacije gena *hMSH2* ili *hMLH1*. Geni *mutS* i *mutL* iz *E.coli* kodiraju za proteine koji imaju ulogu u post-replikacijskom popravku. S obzirom da između tih gena i gena *MSH*, *MLH* i *PMS* pronađenih u eukariotima postoji određena sličnost, vjeruje se kako i oni imaju istu ulogu u organizmu eukariota.<sup>18,19</sup> Ljudske tumorske stanice kojima su aktivnosti gena *hMSH2* i *hMLH1* defektne, pokazuju uopćen porast spontanih mutacija, fenotip pozitivne replikacijske pogreške (RER<sup>+</sup>), te otpornost na alkilirajuće agense. Ljudski *MSH3* gen djeluje kao ORF (open reading frame) u blizini gena koji kodira za dihidrofolat reduktazu, ali još nije razjašnjeno ima li ulogu u popravku krivo sparenih baza. Navedeni fenotipi ukazuju na dosljednost s fenotipima nađenim u bakterijama i *S.cerevisiae* za koje je poznato da su uzrokovani mutacijama koje onemogućuju popravak krivo sparenih baza, što ukazuje na to da geni *hMSH2* i *hMLH1* imaju ulogu u popravku krivo sparenih baza.<sup>20,21,22</sup>

### 3.5. MMR geni i HNPCC sindrom

Istraživanja su pokazala da su nasljedne mutacije MMR gena jedan od glavnih uzroka Lynch-ovog sindroma (LS), odnosno, hereditarnog nepolipoznog kolorektalnog karcinoma (HNPCC). Radi se o karcinomskom sindromu, odnosno o genskom poremećaju u kojem nasljedne genske mutacije jednog ili više gena označavaju predispozicije za razvoj karcinoma s velikim rizikom od nastanka karcinoma prvenstveno debelog crijeva, ali i drugih vrsta karcinoma kao što su karcinomi jajnika, želudca, tankog crijeva te karcinomi mozga.<sup>18</sup> Studije o genetskim vezama identificirale su dva lokusa gena za koje se smatraju uzročnicima 90% svih HNPCC. Jedan lokus je isprva mapiran na kromosomu 2p15-16, a kasnije pri većim rezolucijama mapiran na kromosomu 2p21 i vjeruje se da je odgovoran za 60% slučajeva HNPCC-a, dok se drugi lokus nalazi na kromosomu 3p21 i povezuje se s 30% slučajeva.<sup>18</sup> Do danas su otkrivena barem sedam MMR gena čije mutacije mogu dovesti do HNPCC, te preko 1500 različitih varijanti istih. Godine 1993. kloniran je prvi MMR gen povezan s Lynch sindromom - gen *MSH2*, a nešto kasnije otkriveno je i ostalih šest MMR gena. Iz praktičnih i financijskih razloga, prije same genotipizacije svakog pojedinačnog karcinoma, potrebno je testirati DNA karcinoma na mikrosatelitnu nestabilnost i/ili napraviti imunohistokemijsku procjenu tumorskih sekcija kako bi pronašli MMR proteine. Svrha takve provjere je kako bi se utvrdila dosljednost mikrosatelitne nestabilnosti kao značajke nositelja tumora, pa je tako utvrđeno kako mikrosatelitna nestabilnost nije prisutna u svim tumorima.<sup>23</sup>

Family number/ mutation	Genetic status	Age at diagnosis/gender	Histology of nervous-system tumour
1/ <i>MLH1</i> exon 16	Mutation carrier	49/M	Glioblastoma multiforme grade 4
11/ <i>MLH1</i> exon 16	50% risk	49/F	Glioblastoma multiforme grade 4
11/ <i>MLH1</i> exon 16	50% risk	53/M	Anaplastic astrocytoma grade 3
11/ <i>MLH1</i> exon 16	50% risk	64/M	Undefined brain tumour
13/ <i>MLH1</i> exon 6	25% risk	59/F	Meningioma grade 1
24/ <i>MLH1</i> exon 16	Mutation carrier	57/F	Acoustic neurinoma
39/ <i>MLH1</i> exon 12	25% risk	1/M	Neuroblastoma (mediastinum)
50/ <i>MLH1</i> exon 16	Obligate mutation carrier	65/M	Anaplastic astrocytoma grade 3
50/ <i>MLH1</i> exon 16	50% risk	41/F	Glioblastoma multiforme grade 4
59/ <i>MLH1</i> exon 16	Mutation carrier	42/M	Anaplastic astrocytoma grade 3
78/ <i>MLH1</i> exon 16	50% risk	51/F	Glioblastoma multiforme grade 4
83/ <i>MLH1</i> exon 17	25% risk	40/M	Meningioma fibroblastic grade 1
83/ <i>MLH1</i> exon 17	50% risk	60/F	Meningioma meningo-epithelial and fibroblastic grade 1
90/ <i>MLH1</i> exon 6	25% risk	54/M	Undefined brain tumour

Slika 4. Histologija, dob u kojoj je utvrđena dijagnoza i spol pacijenata oboljelih od karcinoma centralnog živčanog sustava.<sup>24</sup>

### 3.5.1. Povezanost HNPCC sindroma s razvitkom tumora

Godine 1999. provedena je studija u kojoj se ispitala veza između nositelja mutacija u MMR genima i rizika za oboljenje od Lynch-ovog sindroma (LS), te se utvrdila učestalost pojava karcinoma kod oboljelih od LS. U studiji je sudjelovalo 1763 ispitanika, objedinjenih u 50 genskih HNPCC obitelji, te svrstanih u 4 grupe s obzirom na genetske predispozicije: oni koji nose mutaciju na nekom od MMR gena, oni koji ne nose mutaciju ili pojedinci sa 50% i 25% šanse da nose mutaciju u svom genomu. Učestalost pojave karcinoma kod ispitanika zatim je uspoređena s učestalošću pojave karcinoma u cijeloj Finskoj populaciji. Najmanje sedam tipova karcinoma povezano je s HNPCC sindromom, a to su tumori endometrija, jajnika, želudca, žučnog sustava, mjehura, uro-epitelski i tumori središnjeg živčanog sustava. Standardizirani omjer učestalosti pojave karcinoma (SIR) povećavao se proporcionalno sa povećanjem vjerojatnosti da je pojedinac nositelj mutacije na nekom od MMR gena. S obzirom da je za popravak oštećene DNA potrebna interakcija niza različitih genskih produkata, predispozicija za nastanak raka rađa se ukoliko mutacija nekog od MMR gena ugasi njegovu funkciju. Iz tog proizlazi da tumorski spektar može varirati u odnosu na specifičan gen, odnosno mutaciju iz koje je nastao. Većina karcinoma povezana s HNPCC-om su iste ili gotovo iste histologije sa specifičnim značajkama koje ukazuju na osnovnu uzroke nastanka individualnih slučajeva. Pa je tako kod tumora jajnika i tumora mozga pronađeno nekoliko histološki različitih vrsta. Pod tumore središnjeg živčanog sustava spada 12 vrsta tumora mozga, različitih stupnjeva malignosti i dva tumora živčanog tkiva (neuroblastoma i akustični neurinoma).<sup>24</sup>

Rezultati istraživanja prikazani na slici 4, pokazuju kako 14 pacijenata od ukupno 50 HNPCC obitelji boluje od tumora mozga, od čega četvero za koje je utvrđeno da su nositelji mutacije boluju od glioblastoma, a kod pacijenata s 50% šanse da su nositelji mutacije je potvrđeno da postoji predispozicija za nastanak glioblastoma ili drugih histološki različitih tipova tumora mozga, a koja je očigledno u vezi s mutacijom nekog od MMR gena. Pojavu HNPCC sindroma, popraćenog razvojem karcinoma uglavnom uzrokuju mutacije MMR gena na spolnim stanicama, dok su iste mutacije kao mogući uzrok pronađene i kod somatskih stanica. S druge strane, istraživanja pokazuju pozitivan trend nastanka karcinoma mozga koji su potekli iz HNPCC sindroma, a utvrđeno je kako većina pokazuju mikrosatelitnu nestabilnost i mutacije mismatch repair gena spolnih stanica.<sup>25</sup>

## 4. MISMATCH REPAIR GENI U GLIOBLASTOMU

### 4.1. Atlas genoma ljudskog karcinoma

Uobičajeni defekti nađeni u stanicama humanih karcinoma, kao što su kromosomske aberacije, supstituirane nukleotide i epigenetske modifikacije, smatraju se pokretačima malignih transformacija. Atlas genoma ljudskog karcinoma ili u izvornom imenu - The Cancer Genome Atlas (TCGA), projekt je pokrenut 2008. godine s ciljem mapiranja genoma preko 100 vrsta poznatih karcinoma, kako bi se identificirale genske abnormalnosti koje dovode do nastanka istih.<sup>1, 26</sup> TCGA projekt radi procjenu vrijednosti multidimenzionalnih analiza molekularnih karakteristika ljudskog karcinoma u velikom mjerilu, te omogućuje brz pristup podacima istraživačkoj zajednici.<sup>26</sup> U pilot projektu analiziran je 20661 gen koji kodira za proteine iz 22 uzorka humanog glioblastoma. Također, duž čitavog genoma GBM-a provedena je analiza aberacija broja kopija, te homozigotne delecije, upotrebom oligonukleotidnih mikročipova visoke gustoće. Naposljetku, istraženi su ekspresijski profili istih uzoraka upotrebom SAGE-a (serial analysis of gene expression), te tehnike sekvencioniranja nove generacije.<sup>26</sup>

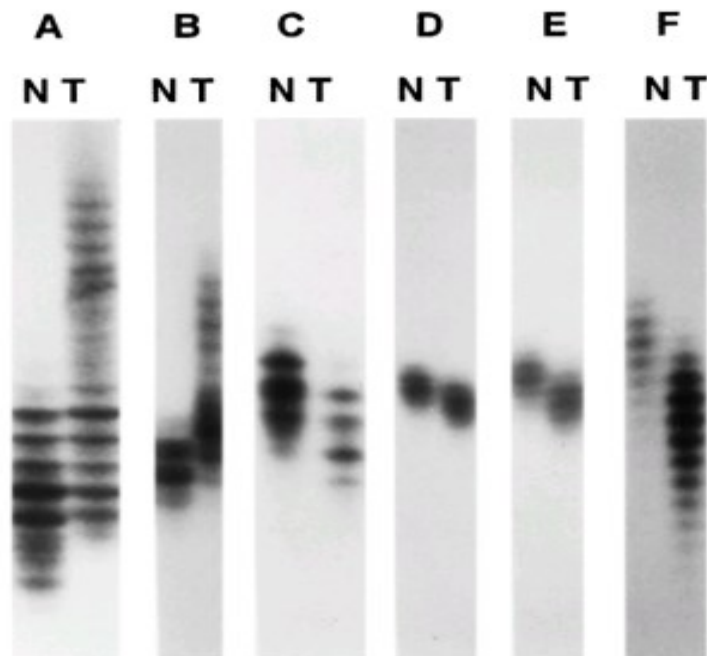
#### 4.1.1. Genske značajke glioblastoma

Prvi ispitivani karcinom TCGA projekta bio je glioblastom, najučestaliji tumor mozga kod odraslih. Primarni glioblastoma nosi 90% slučajeva ove bolesti i specifičnost vezana uz njega jest da izrasta “*de novo*“, odnosno ne nadovezuje se na niže stupnjeve bolesti i u početnoj fazi ne pokazuje nikakve simptome oboljenja.<sup>27</sup> Zbog toga je očigledno jedini način pronalaska uzroka nastanka tumora, a zatim i pristupa liječenju bilo “zavirivanje“ u genom ove zloćudne bolesti. Dvadesetak godina molekularnih studija otkrile su važne značajke humanih glioblastomima: a) aktivacijom mutiranog receptora gena za tirozin kinazu dolazi do poremećaja regulacije signalnih puteva za lučenje faktora rasta, b) aktivira se fosfatidilinozitol-3-OH kinaza (PI3K) metabolički put i c) dolazi do inaktivacije metaboličkih puteva proteina p53 i supresora retinoblastoma.<sup>27</sup> Nadalje, profiliranje genoma glioblastoma dovelo je do saznanja o heterogenosti genoma tumora i podjeljenosti tumora na molekularnoj razini na podjedinice koje zahtjevaju različite pristupe liječenja.<sup>28</sup>

#### 4.2. Mikrosatelitna nestabilnost (MSI) u glioblastomu



Mikrosatelitna nestabilnost karakterizirana je ekspanzijom i kontrakcijom kratkih ponavljajućih sekvenci tijekom DNA replikacije i prisutna je u velikoj većini tumora iz porodice hereditarnog nepolipoznog karcinomskog sindroma.<sup>29</sup> MSI je značajan slučaj kod velikog broja sporadičnih malignosti. Studija provedena 1998. godine s 22 pacijenta s dijagnosticiranim gliomima visokog stupnja, od kojih je 17 pacijenata bolovalo od glioblastoma ispitala je povezanost MMR gena s pojavom mikrosatelitne nestabilnosti.<sup>30</sup> Usporedno su u PCR reakcijama umnažani uzorci tumorskog i normalnog tkiva, a kao početnice se koristilo 5 mikrosatelitnih lokusa. MSI je definirana po prisutnost dodatnih vrpce iz uzorka tumora u odnosu na vrpce uzorka normalnog tkiva (slika 5). Rezultati su pokazali prisutnost MSI kod četiri od 22 ispitanika (18%), od čega je troje bolovalo od glioblastoma. Sva četiri slučaja pokazala su MSI visoke razine a zahvaćenošću preko 75% lokusa gena. Kod sva četiri pacijenta s MSI gliomima visokog stupnja, pokazali su mutacije u MMR genima spolnih stanica; od čega su tri mutacije bile na genu *hMSH2* i jedna na genu *hMLH1*. Tri mutacije rezultirale su krnjom produkcijom proteina.<sup>30</sup>



Slika 5.

Prikaz rezultata elektroforeze

uzorka - (N) normalnog tkiva i (T) tumorskog tkiva na poliakrilamidnom gelu.<sup>30</sup>

#### 4.3. Utjecaj metilacije *MGMT* promotora na liječenje GBM-a

#### 4.3.1. Promotor gena *MGMT*

Jedna od prvih i najvažnijih epigenetskih modifikacija proučavanih u ljudima je metilacija DNA; što označava kovalentnu adiciju metilne grupe preferencijalno na 5'-kraj citozinskog ili gvaninskog nukleotida. Ovi CpG dinukleotidi teže grupiranju u takozvane CpG otočiće koji su smješteni unutar promotorskih regija više od polovice svih ljudskih gena.<sup>31</sup> *MGMT* gen kodira za enzim O6-metil-gvanin-DNA-metiltransferazu koja ima ključnu ulogu u očuvanju genske stabilnosti, s obzirom da popravljajući mutagene lezije O6-metilgvanina nazad u gvanin, te sprječava pogreške u sparivanju baza tijekom replikacije i transkripcije DNA.<sup>32</sup> Zbog potencijalnih kliničkih implikacija, posebno je važna veza između metilacije *MGMT* promotora i hipermutatorskog fenotipa uzrokovanog nedostatkom aktivnosti popravka krivo sparenih baza (mismatch repair). Metilacija promotora gena *MGMT* može odigrati značajnu ulogu u karcinogenezi. Kod pacijenata kojima je dijagnosticiran glioblastom, metilacija promotora *MGMT* rezultira suprimiranom ekspresijom tog gena, što za posljedicu ima znatno poboljšanu reakciju tumorskih stanica na terapiju alkilirajućim agensom TMZ-om, čime se može znatno produžiti životni vijek oboljelih.<sup>33</sup>

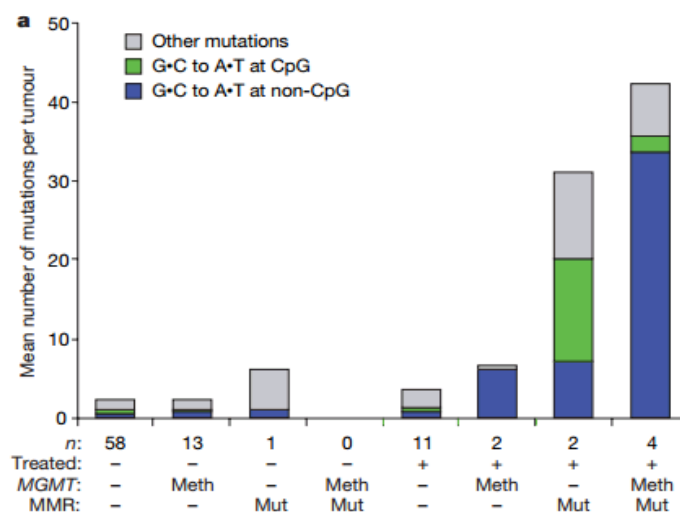
#### 4.3.2. Metilacija *MGMT* u glioblastomu

Metilacija promotora gena *MGMT* u glioblastomu svojevrsni je biomarker koji može služiti u odabiru režima liječenja. *MGMT* gen je lociran na kromosomu 10q26 i kodira za enzim koji odstranjuje alkilne grupe sa O6 pozicije gvanina. O6-alkilirani gvanin može uzrokovati pucanje dvostrukog lanca DNA i krivo sparivanje baza što u konačnici vodi u staničnu smrt. Međutim jednako kako enzim *MGMT* čuva zdrave stanice od abnormalnosti, isto tako čuva i tumorske stanice od letalnih učinaka kemoterapije alkilirajućim agensima kao što je TMZ. Međutim, utjecaj ekspresije *MGMT* u glioblastomu još uvijek se ne može staviti u korelaciju s razinom preživljavanja pod kemoterapijom.<sup>34</sup>

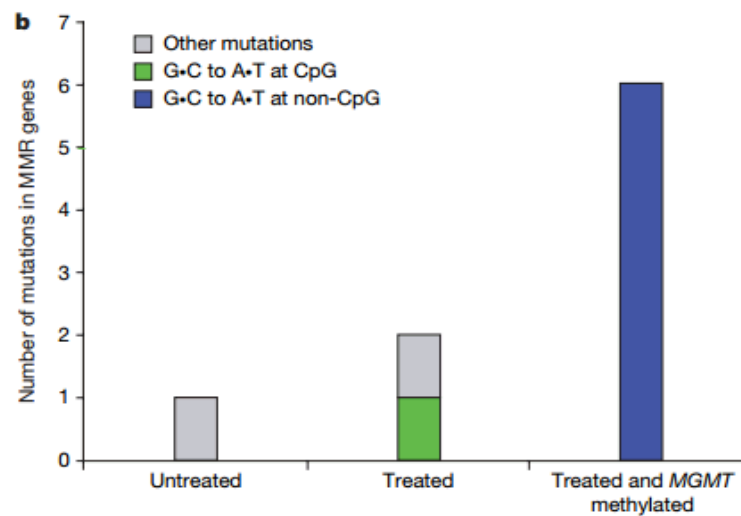
#### 4.3.3. Veza između metilacije promotora *MGMT* i mismatch repair gena

Metilirani promotor *MGMT* gena, pronađen je kod preko 35% malignih glioma visokog stupnja (WHO stupnja III i IV), te u preko 80% glioma II stupnja. Studija provedena 2008. godine, ispitala je utjecaj metilacije CpG nukleotida unutar promotora 2305 gena koji su stavljani u usporedbu s DNA zdravog mozga.<sup>31</sup> Među 91 sekvencioniranim slučajem, kod 19 uzoraka otkriveno je da sadrže metilirani *MGMT* promotor. Kada su uz to postavljeni podaci o somatskim mutacijama, uočena je veza između hipermutatorskog fenotipa i metilacije *MGMT* u glioblastomima podvrgnutim terapiji.<sup>26</sup> Metilacija *MGMT* povezana je s smislenim pomakom u supstituciji nukleotida tretiranih GBM. Od 13 tretiranih uzoraka kod kojih nije uočena metilacija *MGMT*, 29% somatskih mutacija bile su izmjena GNC baze u ANT unutar CpG dinukleotida, dok su 23% svih mutacija bile izmjena GNC tripleta u ANT u ne-CpG dinukleotidima.<sup>26</sup>

Taj obrazac je dosljedan neuspjehu popravka alkiliranih gvanin rezidua koji su uzrokovani terapijom TMZ-om; drugim riječima, metilacija *MGMT* pomaknula je spektar mutacija tretiranih uzoraka s prevagom izmjene GNC u ANT baza u ne-CpG mjestima. Nadalje, mutacijski spektar MMR gena očigledno se odražava na metilacijski status *MGMT* gena pa tako i značajke liječenja. Unutar 6 metiliranih *MGMT*, pronađeno je svih 7 dosad poznatih mismatch repair gena i sve su se odnosile na zamjenu tripleta GNC s ANT na ne-CpG mjestima, dok nijedna mutacija u ne-metiliranim, tretiranim tumorima nije imala ove karakteristike. Stoga, ovi podaci pokazuju kako nedostaci MMR gena i metilacija *MGMT* zajedno djeluju na obrasce i frekventnost točkastih mutacija somatskih stanica tumora, što je potencijalno od velike važnosti za budućnost liječenja glioblastoma.<sup>26</sup>



Slika 6. Uzorci somatskih mutacija, metilirani *MGMT* promotor i mutacije u tretiranim glioblastomima.<sup>26</sup>



Slika 7. Prikaz različitih vrsta mutacija kod tretiranog i netretiranog GBM-a, te tretiranog GBM-a kod kojeg je promotor *MGMT* metiliran.<sup>26</sup>

Prikaz rezultata istraživanja (slike 6 i 7): Srednji broj validiranih somatskih nukleotidnih supstitucija po tumoru za ključne grupe uzoraka nanesen je na os y i obilježava visinu stupaca histograma. Uzorci su grupirani na x osi na temelju statusa tretiranosti bolesti, metiliranosti promotora *MGMT* i genskom statusu MMR gena (minus označava da nema mutiranih gena; *Mut* označava da su jedan ili više MMR gena mutirani. Broj ispod svakog stupca označava broj uzoraka u grupi. Obojanost stupca pokazuje tip nukleotidne supstitucije: plavo su promjena G u A u ne-CpG mjestima; zelenom su označene promjene G u A u CpG mjestima i sivom su označene ostale mutacije.<sup>26</sup>

#### 4.4. Gubitak heterozigotnosti pojedinih kromosoma GBM

##### 4.4.1. Pojam heterozigotnosti

Polimorfizam jednog nukleotida, odnosno single nucleotide polymorphism (SNP) je zamjena mjesta jednog nukleotida drugim na točno određenom mjestu na genomu. Ljudske stanice su diploidi, što znači da sadrže dvije kopije genoma - po jednu od svakog roditelja. Kada kopije genoma, derivirane od svakog roditelja imaju različite baze na tom istom mjestu u genomu - na polimorfnoj regiji SNP, za tu regiju na genomu kaže se da je heterozigotna. Kromosomi koji nose gene od oba roditelja u normalnim slučajevima stoje

u paru što omogućava pojavu heterozigotnosti. Međutim, može se dogoditi da se jedna roditeljska kopija u regiji SNP zagubi. Tada dolazi do pojave koja se naziva gubitkom heterozigotnosti - LOH (eng. loss of heterozygosity).<sup>35</sup>

#### 4.4.2. Utjecaj gubitka heterozigotnosti na razvoj karcinoma

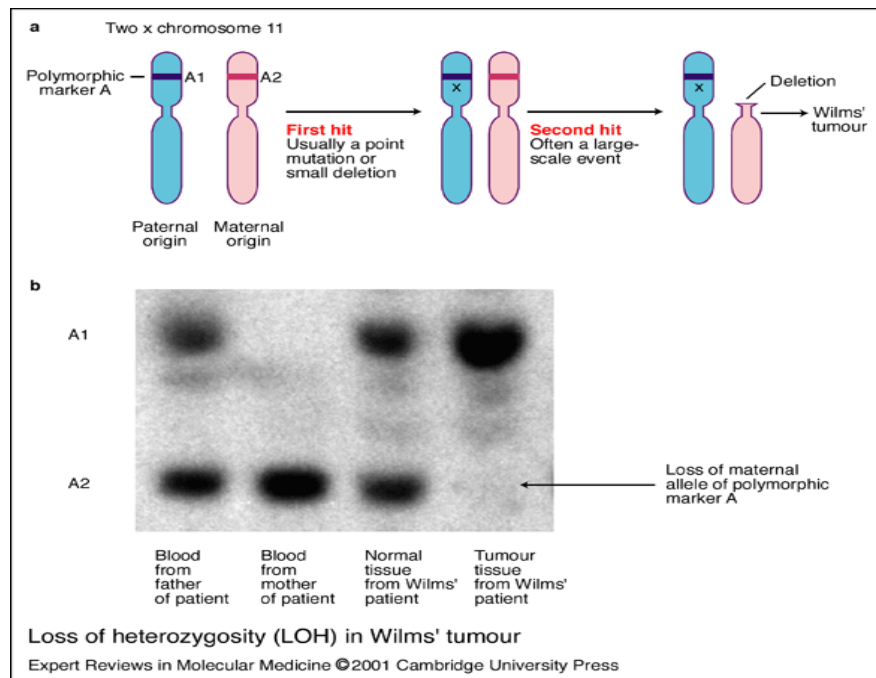
Geni supresori tumora (TSG) mogu biti inaktivirani različitim mehanizmima, uključujući hipermetilaciju i gubitak heterozigotnosti.<sup>35</sup> Kod nasljednih autosomalnih karcinomskih poremećaja, jedan alel može biti normalan a drugi abnormalan (mutiran). Ako u takvom slučaju dođe do gubitka normalnog alela, gen gubi svoju normalnu funkciju. Ukoliko se radi o genu supresoru tumora, gubitak normalnog alela može označiti početak malignog rasta stanica, drugim riječima gubitak alela supresora tumora može dovesti do razvoja tumora. (National Cancer Institute) Vjeruje se zapravo da je normalan alel dominantan, te da tek gubitak istoga otkriva mutaciju TSG na preostalom alelu, što upućuje na recesivnost TSG.<sup>36</sup> Aneuploidija je sveprisutna značajka epitelnih karcinoma kao i eksperimentalno promjenjenih stanica. Vjeruje se da kromosomske promjene mogu dovesti do malignih transformacija stanica zbog sljedećih razloga: prvo, ukoliko se TSG nalaze u regijama kromosoma koji su podložni gubitku alela, te ukoliko je prvi alel mutacijom inaktiviran ili utišan, može doći do nekontroliranog rasta stanica.<sup>35</sup> Drugo, promjene broja kromosoma mogu dovesti do promjene obrasca ekspresije gena, tako da ih precizno navode do optimalnog rasta stanice abnormalnoj mikrookolini unutar neoplazme. Promjene u broju kromosoma pokreće kromosomska nestabilnost koja je sveprisutna u životnom ciklusu tumorskih stanica.<sup>35</sup>

#### 4.4.3. Najčešće genske alteracije povezane s LOH-om u GBM-u

Studija iz 2009. godine donijela je zaključke o kromosomima koji su najčešće pogođeni alteracijama gena u smislu delecije pojedinih alela kod glioblastoma. Najučestalija genska alteracija koja se pojavljuje u čak do 80% slučajeva primarnog glioblastoma je LOH na kromosomu 10; najčešće popraćena gubitkom čitavog alela (10p i 10q). Najmanje 3 lokusa su često deletirana na kromosomu 10, što ukazuje na prisutnost nekoliko gena supresora tumora na tom kromosomu.<sup>34</sup> Pojava LOH-a na kromosomu 10q dosta je učestala kod sekundarnih

glioblastoma (čak do 70%), dok je LOH na 10q25 povezana s progresivnim rastom i transformacijom anaplastičnog astrocitoma niskog stupnja u visoki stupanj anaplastičnog glioblastoma.<sup>37</sup>

Kod 12% primarnih i čak 38% sekundarnih glioblastoma detektiran je LOH na kromosomu 13q, najčešće uključujući lokus *RBI*. Kromosomska regija 9p23-24 koja kodira za gen *PTPRD* često je deletirana u GBM. Gen *PTPRD* kodira za receptor protein-tirozin-fosfatazu koja ima funkciju supresora tumora, a koja je kod oko 6% tumora mutirana a kod čak 37% inaktivirana metilacijom.<sup>38</sup> LOH 22q je učestala alteracija u sekundarnim GBM (oko 80% slučajeva). Delecija male regije (957 kb) na kromosomu 22 uključuje područje gena koji kodira za inhibitor metaloproteinaze 3.<sup>42</sup>



Slika 8. Gubitak heterozigotnosti a) shematski prikaz; b) slika DNA na gelu nakon elektroforeze

#### 4.5. Poveznica između promotora *MGMT*, mismatch repair gena i pojave recidiva GBM

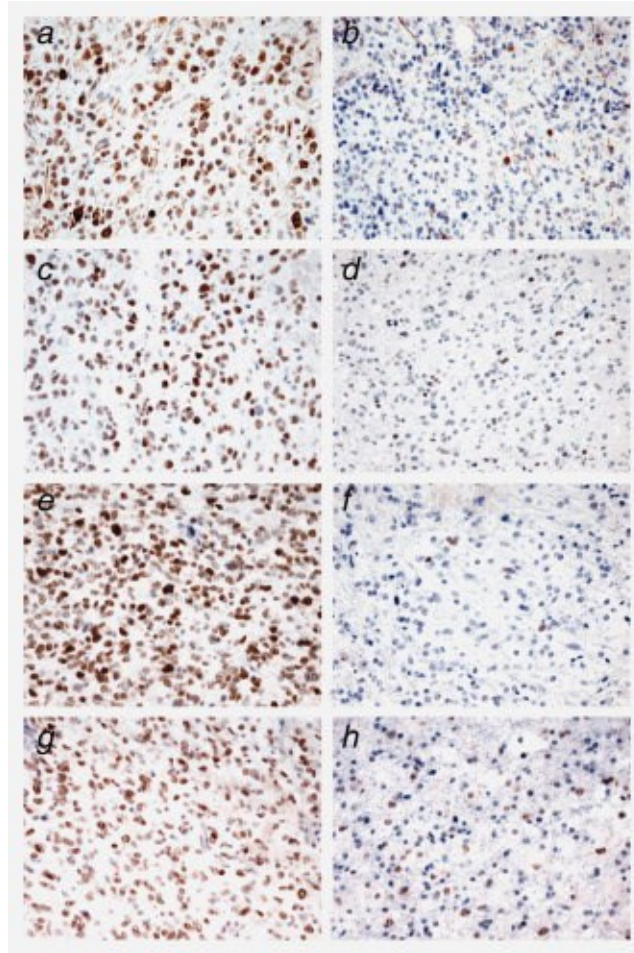
##### 4.5.1. Povratak tumora nakon završetka terapije - recidivi glioblastoma

Supresija promotora gena O<sup>6</sup>-metilguanin-DNA metiltransferaze povezana je s poboljšanom reakcijom glioblastoma na tretman temozolomidom (TMZ). Nekolicina nezavisnih studija identificirala je metilaciju promotora *MGMT* gena kao biomarker koji dosta pouzdano može predviditi dugotrajno preživljavanje bez progresije (PFS) i ukupnu mogućnost preživljenja glioblastoma nakon terapije TMZ-om. Usprkos tome, zapravo svi slučajevi GBM pokazuju pojavu recidiva nakon završetka početne terapije; čak i oni s najboljim prognozama i nakon potpune resekcije tumora. Zašto dolazi do pojave recidiva, te koji su molekularni mehanizmi rezistencije na terapiju, još uvijek nije u potpunosti jasno. Pretpostavka je da je terapija TMZ-om selektivna za nemetilirane *MGMT* tumorske stanice što omogućuje rezistentnim staničnim klonovima ponovan nekontroliran rast i u konačnici povratak tumora.<sup>39</sup>

Moguće promjene metiliranosti promotora *MGMT* kod povratka tumora mogle bi biti značajne za postavljanje učinkovite terapije recidiva glioblastoma. Prijašnje studije pokazale su da se kao posljedica liječenja recidiva glioblastoma TMZ-om, javljaju alteracije DNA mismatch repair gena. Nadalje, imunohistokemijske pretrage pokazale su značajno niže razine ekspresije gena *MSH2*, *MSH6* i *PM2* u recidivima tumora, iz čega slijedi da su reducirana ekspresija MMR proteina i nepromjenjen status metilacije *MGMT* promotora glavne značajke pojave recidiva GBM.<sup>40</sup>

#### 4.5.2. Usporedba utjecaja metilacije promotora *MGMT* na primarni GBM i recidive

Studija objavljena 2011. godine uključivala je 80 pacijenata s histološkom potvrdom *de novo* glioblastoma koji su nakon terapije pokazali pojavu recidiva. Uzorci su uzeti iz tkiva primarnog tumora i recidiva u svrhu usporedbe krajnjih rezultata. MSP analiza pokazala je prisutnosti metiliranog *MGMT* promotora kod 31 od 80 pacijenata oboljelih od primarnog GBM-a, uključujući troje pacijenata s nešto nižim stupnjem metilacije tumora. Kod 49 pacijenata nije utvrđena metilacija ranije navedenog promotora. Kod povratnih tumora, slika je bila gotovo neznatno drugačija - kod 26 od 80 pacijenata pronađen je metilirani promotor *MGMT*, a kod 54 pacijenta nije bilo traga metilaciji. Usporedbom podataka dobivenih o primarnim i s druge strane povratnim tumorima, potvrđeno je da kod gotovo 90 % pacijenata nije došlo do promjene statusa metilacije, a samo je sedam pacijenata pokazalo gubitak ili redukciju metilacije.<sup>40</sup>



Slika 9. Primjeri imunohistokemije ekspresije MMR proteina u glioblastomima i recidivima (a, b) *MLH*; (c, d) *MSH2*; (e, f) *MSH6*; (g, h) *PMS*. Prikazani su primjeri pacijenata s reduciranom ekspresijom MMR proteina u recidivima (b, d, f, h) u usporedbi s onima u primarnim tumorima (a, c, e, g).<sup>40</sup>

#### 4.6. Gubitak mismatch proteina *MSH6* u humanom glioblastomu

Glioblastom, najučestaliji primarni tumor mozga, prototipična je ljudska neoplazija: akumuliraju mutacije onkogena (npr. *EGFR*) i tumor supresor gena (npr. *PTEN*), daju odgovor na terapiju X-zrakama (XRT) i alkilirajućim kemoterapeutskim agensom TMZ-om, ali u konačnici bez obzira na terapiju vode ka fatalnom ishodu.<sup>41</sup> Mutacije gena *MSH6* uzrokuju djelomičan ili potpun gubitak aktivnosti odgovarajućeg proteina, što za posljedicu ima redukciju njegovih sposobnosti popravka pogrešaka u DNA. Gubitak funkcije *MSH6* rezultira



pojavom nestabilnosti na krajevima mononukleotida. Također, inaktivacija tog istog gena dovodi do tolerancije stanice na citotoksične doze alkilirajućih agensa i rast u takvim uvjetima *in vitro*. Međutim, kada se tolerantne stanice dovedu u kontakt s stanicama divljeg tipa koji sadrže gen *MSH6*, dolazi do resenzitiranja tih stanica na alkilirajuće agense, što jasno ukazuje na direktnu ulogu gena *MSH6* u efektu kemorezistencije.<sup>42,43</sup> Do sada je analiziran status mutacija i ekspresije *MSH6* gena u uzorcima glioblastoma prije tretmana i poslije i uspoređen je s obrascem statusa ekspresije *MGMT*-a.

#### 4.6.1. Gubitak *MSH6* u recidivima GBM-a

Studija iz 2007. objavila je prisutnost gena *MSH6* u 54 uzorka glioblastoma, od čega su 14 bili uzorci recidiva, a 40 su uzorci primarnog tumora prije tretmana. Ekspresija gena *MSH6* uočena je u svim uzorcima primarnog tumora, ali je izgubljena kod preko 40% uzoraka recidiva. što ukazuje na činjenicu da gubitak ekspresije *MSH6* pridonosi pojavi recidiva nakon terapije TMZ-om.<sup>41</sup> Popratna studija potvrdila je prisutnost mutacija na *MSH6* kod glioblastoma nakon terapije, ali ne i kod uzoraka tumora prije terapije.<sup>43</sup> Zanimljivo je da unatoč mutacijama na *MSH6* genu i ostalim mismatch repair genima, recidivi glioblastoma ne pokazuju visoke razine mikrosatelitne nestabilnosti.<sup>40</sup> Gubitak *MSH6* prisutan je kod recidiva kojima je prethodio tretman zračenjem u kombinaciji s TMZ-om i povezan je s progresijom tumora, što odražava i rezistenciju na alkilirajuće agense u *in vitro* ispitivanju. Nadalje, *MSH6* je prvenstveno uzet u nepristranim genskim testiranjima rezistencije na kemoterapiju.<sup>43</sup>

#### 4.6.2. Metilacija *MGMT* promotora i mutacije na *MSH6*

Sveukupna frekvencija pojave alteracija na *MSH6* u glioblastomima je još uvijek nepoznata i u velikom broju prijašnjih istraživanja nisu pronađene mutacije tog gena kod odraslih pacijenata sa sporadičnim glioblastomom, međutim homozigotne mutacije tog gena spolnih stanica pronađene su u izoliranim slučajevima kod djece s dijagnosticiranim GBM-om.

Mutacije na *MSH6* nisu pronađene u uzorcima DNA tumora prije tretmana zračenjem i kemoterapije, niti u uzorcima neliječenih pacijenata, što ukazuje na to da su spomenute mutacije zapravo vjerojatno posljedica same terapije. Stoga, pronalazak mutacija na *MSH6* genu kod

recidiva je svojevrsni dokaz da odgovor tumora na terapiju TMZ-om može biti unaprijed predviđena određivanjem statusa metiliranosti *MGMT* gena.<sup>41</sup> Čini se da rezistencija na alkilirajuće agense *in vitro*, potječe ili od ekspresije *MGMT* ili od manjka aktivnosti MMR gena te da manjak aktivnosti MMR gena predstavlja alternativni put kada stanice tumora pokazuju niske razine ekspresije *MGMT*.<sup>44,45</sup> Međutim, analize recidiva su pokazale da se gubitak *MSH6* pojavljuje neovisno o statusu metilacije *MGMT* kod netretiranih tumora, tj. da gubitak *MSH6* nije mjerilo statusa metiliranosti *MGMT* promotora. Postoji mogućnost da i drugi MMR geni kao npr. *MSH2* ili *MLH1* imaju sličnu ulogu u tumoru kao *MSH6*, međutim mikrosatelitna nestabilnost tipična za *MSH2* i *MLH1* smanjenih aktivnosti, rijetko je pronađena u jedinkama pred-tretiranog i post-tretiranog glioblastoma.<sup>44</sup>

#### 4.6.3. Signalni putevi popravka

Kriva sparivanja O<sup>6</sup>-metilguanin-timina specifično su vezana uz heterodimer *mutSa*, kompleks *MSH2:MSH6* te se smatra da aktiviraju ATR/Chk1S-G2 put. Posttranslacijske promjene u subcelularnoj lokalizaciji heterodimera, očituju se u odgovoru na genotoksične agense, šaljući signale za popravak kontrolnoj točki. Za ovaj signalni put vjeruje se da posreduje tumoricidalnim efektima kemoterapije alkilirajućim agensima. Međutim, signalni putevi mismatch repair gena su još uvijek područje koje se istražuje te je tako vjerojatno da postoje i drugi mehanizmi popravka i popratni signalni putevi.<sup>46</sup>

## 5. ULOGA MISMATCH REPAIR GENA U PRONALASKU NOVIH NAČINA LIJEČENJA TUMORA

### 5.1. Način djelovanja TMZ-a

Sadašnja terapija protiv GBM-a uključuje kiruršku resekciju koju slijede terapija zračenje i kemoterapija s TMZ-om kao najaktivnijim agensom u borbi protiv ovog tumora. Kod slučajeva koji pokazuju rezistenciju na TMZ ne preostaje mnogo alternativnih pristupa liječenja, s obzirom da je jako malo poznatih agensa učinkovitih protiv ove bolesti. Stoga je bilo izrazito

važno otkriti mehanizme rezistencije kako bi se razvile strategije resenzitiviranja tumorskih stanica na GBM.<sup>47</sup>

Temozolomid je alkilirajući agens koji metilira N<sup>7</sup> mjesto na gvaninu, O<sup>3</sup> mjesto adenina i O<sup>6</sup> mjesto gvanina.<sup>48</sup> Citotoksična svojstva TMZ-a većinom potječu od O<sup>6</sup>-metil-gvanina. Ukoliko se metilna skupina ne skine s gvanina pomoću MGMT proteina, dolazi do krivog sparivanja baza prilikom replikacije DNA, pri čemu se O<sup>6</sup>-meG sparuje s timinom. Anomaliju sparivanja prepoznaju MMR geni, te kodiraju za proteine koji vrše eksciziju novo-sintetiziranih lanaca, ostavljajući roditeljski lanac s O<sup>6</sup>-meG lezijom netaknutim.<sup>49</sup> O<sup>6</sup>-meG se zatim može ponovno spariti s timinom, te slijedi niz ponavljajućih ciklusa intervencije MMR proteina i ponavljajućeg pojavljivanja praznina na jednom lancu DNA. Kada se prilikom replikacije, replikacijske rašlje susretnu s prazninama na jednom lancu DNA nastaju dvolančani lomovi (DSBs).<sup>49</sup> Takvi dvolančani lomovi mogu se popraviti samo homolognom rekombinacijom (HR). Kada bi se takvi lomovi popravljali drugim mehanizmom ili se uopće nebi popravili, bili bi ekstremno toksični za stanicu. Iako su TMZ-om inducirani dvolančani lomovi izrazito toksični za stanicu, efikasnost ovog agensa je u vrlo mnogo slučajeva ograničena bilo nasljeđenim ili stečenim mehanizmima.<sup>50</sup>

#### 5.1.1. Uloga homologne rekombinacije u razvitku rezistencije na temozolomid

Do sada je bilo govora o učincima *MGMT* promotra i gubitka funkcije MMR gena kao jedinim represorima aktivnosti TMZ-a na tumorske stanice. Međutim novija istraživanja pokazuju kako se ovi fenomeni ne pojavljuju u svim tumorima koji pokazuju rezistenciju na terapiju TMZ-om. Pretpostavka je da oko polovice GBM-a pokazuju ekspresiju gena *MGMT*, a samo dio pokazuje nedostatak MMR gena, što upućuje na to da mora postojati bar još jedan mehanizam rezistencije. Jedno od najnovijih istraživanja iz ovog područja pokazalo je upravo tako. Studija objavljena u lipnju 2016. godine izvjestila je da produžen tretman TMZ-om GBM tumora koji pokazuju manjak ekspresije *MGMT* rezultira rezistencijom na tretman zbog ubrzanog popravka TMZ-om induciranih dvolančanih lomova. Nadalje, pokazali su kako do rezistencije može doći zbog povećane HR i da prigušenja HR mogu resenzitivirati tumorske stanice na terapiju.<sup>48</sup> U svrhu istraživanja uspostavili su *in vivo* model pojave recidiva u miševima koji je omogućio praćenje pojave rezistencije na terapiju i usporedbu među primarnim tumorima i recidivima, dajući bolji uvid u promjene koje nastaju uslijed same

terapije te na promjene mikrookoliša tumora. Upotrebom ovog modela otkrivena je uloga homologne rekombinacije dvolančanih lomova induciranih djelovanjem TMZ-a na stanice tumora. Ovo otkriće je važno jer opisuje mehanizam rezistencije na TMZ u tumorima koji ne pokazuju mehanizme ekspresije *MGMT* i gubitak MMR proteina.<sup>47</sup>

Činjenica da HR ima ulogu u razvitku rezistencije na terapiju može imati važne kliničke implikacije. Prvo, ukazuje na to da upotreba TMZ kao jedinog agensa kod tretmana recidiva može rezultirati nedovoljno dobrim terapijskim odgovorom. Ovo je sukladno fazi II kliničkog testiranja u kojima su recidivi izloženi re-tretmanu TMZ-om pokazali minimalan odgovor na terapiju. Nadalje, analizom TCGA baza podataka, pronađen je podatak da su svi recidivi glioblastoma tretirani TMZ-om pokazali velike razine ekspresije HR-gena kao što je *RAD51*. Inhibitori navedenog gena su trenutno u izradi i mogli imati velik učinak na tretiranje TMZ-rezistentnih tumora. U međuvremenu, s obzirom da je otkrivena veza između CDK signalnog puta i aktivacije HR, a inhibitori CDK signalnog puta su već u kliničkim ispitivanjima, ubrzo bi mogli biti iskorišteni u kliničkom liječenju za potrebe kemoresenzitiviranja. Međutim, bitno je naglasiti kako ova terapija ima mogućnosti korištenja i kod primarnih tumora dokle god je TMZ u mogućnosti izazivati lomove u dvolančanoj DNA tumora. Ovaj pristup, osim što je izrazito toksičan za sve tumorske stanice, također ciljano djeluje na rijetke TMZ-rezistentne klonove koji se mogu pojaviti u primarnom tumoru. U konačnici, pronalazak novog mehanizma rezistencije na TMZ podiže šanse za poboljšanje terapijskog učinka TMZ na glioblastom.<sup>47</sup>

## 5.2. Utjecaj radioterapije na MMR gene

Terapija glioblastoma uključuje kiruršku resekciju, radioterapiju i kemoterapiju. Do sada je bilo govora o učincima kemoterapeutika TMZ-a na stanice tumora te ulozi MMR gena u razvitku rezistencije na isti. Međutim, do danas još uvijek nije poznata uloga MMR gena u očuvanju stanične vijabilnosti za vrijeme terapije radiozračenjem.<sup>49</sup> Tumorske stanice u kojima nedostaju MMR geni pokazali su izrazit senzibilitet na visoke doze radiozračenja dok su kod niskih doza radiozračenja pokazale veću otpornost od drugih stanica. Ovakva tolerancija stanica na niske doze zračenja može biti posljedica akumulacije DNA

lezija kao što su nakupine oksidativnih DNA lezija (OCDLs) ili O<sup>6</sup>-metilgvanin lezije. Također, smatra se da HR popravak zajedno s MMR putevima regulacije staničnih ciklusa mogu biti uzrok osjetljivosti tumorskih stanica na radiozračenje. Međutim, potrebno je provesti daljnje studije o utjecaju radioterapije na tumorske stanice koje pokazuju nedostatak ekspresije MMR gena.<sup>50</sup>

### 5.3. Povezanost mutacija MMR gena i sintetičke letalnosti

Najnovija istraživanja na području genomike, proteomike i transkriptomike dali su velik doprinos razmjevanju molekularne biologije stanica karcinoma. Kako bi se poboljšala efikasnost lijekova, počeli su se koristiti individualniji pristupi liječenju koji se temelje na prikupljanju informacija o molekularnim i staničnim defektima pojedinih pacijenata što spada pod koncept “personalizirane medicine“. Kao nova strategija u terapiji protiv tumora vezana uz koncept individualnog liječenja, uveden je koncept sintetičke letalnosti koji ciljano djeluje na tumor supresorske gene. Kod ovog modela, gubitak ili utišavanje jednog gena je povezano sa staničnom vijabilnosti, dok kombinacija mutacija dva ili više gena uzrokuju staničnu smrt. Kada je jedan od ta dva gena tumor supresorski kao npr. MMR gen i na njemu je prisutna mutacija, drugi gen predstavlja novu terapeutsku metu za selektivno uništenje stanica s nedostatkom MMR gena.<sup>50</sup>

Model sintetičke letalnosti prvi put je 1922. godine opisao Calvin Bridges primjetivši da kombinacija dviju mutacija u genomu vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) uzrokuju smrt.<sup>51</sup> Kasnije, tokom procesa pupanja kvasca pronađene su interakcije sintetičke letalnosti sa gubitkom MMR gena i DNA polimeraze. Nadalje, studije su pokazale kako utišavanje aktivnosti DNA polimeraza POLB ili POLG djeluje letalno u kombinaciji s gubitkom gena *MSH2* ili *MLH1* u humanim stanicama karcinoma. Nastali fenotip je posljedica akumulacije nuklearne oksidativne štete na DNA uslijed utišavanja aktivnosti POLB u stanicama koje ne pokazuju ekspresiju *MSH2* gena, dok akumulacija mitohondrijske oksidativne štete uslijed utišavanja POLG u stanicama koji ne posjeduju *MLH1* gen rezultira smanjenom staničnom vijabilnosti.<sup>50</sup>

### 5.4. Uloga MMR gena u genskoj terapiji

Kao jedna od posljedica nedostataka ekspresije MMR gena je akumulacija sekundarnih mutacija, koja može imati velik utjecaj na odgovor stanica na terapiju i predstavlja nove mogućnosti za personaliranu terapiju. Neki od gena koji pokazuju sekundarne mutacije su i sudionici metaboličkog puta popravka dvolančanih lomova (geni *MRE11*, *ATR* I *RAD50* i tumor-supresorski gen *PTEN*). Gubitak ovih gena izaziva efekt sintetičke letalnosti kada je u kombinaciji s inhibicijom enzima koji sudjeluje u ekscizijskom popravku baza-Poly ADP riboza-polimerazom. Stoga je moguće detaljnije ispitati učinke ovih sekundarnih mutacija pomoću tretmana inhibitorom PARP.<sup>49</sup>

Najnovija istraživanja pokušavaju pronaći primjenu MMR gena u genskoj terapiji tumora koji pokazuju nedostatak ovih gena. U jednoj studiji koristila se mikrosatelitna nestabilnost (MSI), koja nastaje kao posljedica manjka aktivnosti MMR gena, na način da je mikrosatelitnu DNA izvan okvira čitanja insertirana unutar kodirajuće regije *VP22FCUI* suicidalnog gena.<sup>50</sup> Veliki dio MSI stanica koje su nosile suicidalni gen revertirale su okvir čitanja te je došlo do ponovne ekspresije odgovarajućeg proteina u cjelosti. Naposljetku, tretiranje ovih stanica s 5-fluorocitozin induciralo je citotoksičnost zbog kombinacije suicidalnog gena i navedenog agensa. Ovi novi pristupi liječenju uz pomoć genske terapije mogu omogućiti selektivnu i moćnu terapiju u liječenju tumora s nedostatkom aktivnosti MMR gena.<sup>50</sup>

## 6. Zaključak

Mismatch repair geni ne samo da igraju ulogu u nastanku tumora kada im je aktivnosti smanjena, već njihovo razumijevanje može imati veliku ulogu u terapijskim indikacijama liječenja tumora. Do sada su najbolje rezultate u liječenju glioblastoma dale imunoterapija i terapija matičnim stanicama, međutim sve više primjenu pronalazi i genska terapija. Sadašnja terapija protiv glioblastoma uključuje kiruršku resekciju koju slijede terapija zračenjem i kemoterapija s TMZ-om kao najaktivnijim agensom u borbi protiv ovog tumora. Međutim, s obzirom na kompleksnost ovog tumora i njegovu gensku pozadinu, najefikasniji pristup pokazale su primjene personalizirane terapije, gledajući svaki tumor kao individu. Velik korak

u razumijevanju mehanizma rezistencije na TMZ je otkriće promotora *MGMT*. Kod pacijenata kojima je dijagnosticiran glioblastom, metilacija promotora *MGMT* rezultira suprimiranom ekspresijom tog gena, što za posljedicu ima znatno poboljšanu reakciju tumorskih stanica na terapiju alkilirajućim agensom TMZ-om, čime se može znatno produžiti životni vijek oboljelih. Međutim, pretpostavka je da je terapija TMZ-om selektivna za nemetilirane *MGMT* tumorske stanice što omogućuje rezistentnim staničnim klonovima ponovan nekontroliran rast i u konačnici povratak tumora. Do sada je bilo govora o učincima *MGMT* promotora i gubitka funkcije mismatch repair gena kao jedinih represorima aktivnosti TMZ-a na tumorske stanice. Međutim najnovija istraživanja pokazuju kako se ovi fenomeni ne pojavljuju u svim tumorima koji pokazuju rezistenciju na terapiju TMZ-om. Pretpostavka je da oko polovice GBM-a pokazuju ekspresiju gena *MGMT* a samo dio pokazuje gubitak MMR gena, što upućuje na to da mora postojati bar još jedan mehanizam rezistencije. Taj mehanizam je ubrzana homologna rekombinacija (HR) dvolančanih lomova nastalih prilikom terapije TMZ-om. Analogno tome, prigušenja HR mogu resenzitivirati tumorske stanice na terapiju. Nadalje, jedan od novijih opisanih modela s mogućnošću primjene u liječenju tumora je koncept sintetičke letalnosti koji kaže da kombinacijom mutacija na jednom mismatch repair genu i utišavanja aktivnosti DNA polimeraze POLB ili POLG dolazi do smrti tumorskih stanica.

Iako još uvijek nije pronađen način kako potpuno izliječiti multififormni glioblastom, te uloga mismatch repair gena u liječenju nije u potpunosti jasna, čini se kako istraživanja te poveznice idu u pozitivnom smjeru. Dosadašnja saznanja o ulozi MMR gena u glioblastomu otkrila su moguće načine nastanka tumora, međutim pitanje koje se nameće jest- mogu li se ta znanja primjeniti u liječenju tumora ili još bitnije, prevenciji istog?

## 7. REFERENCE:

1. National Cancer Institute, <http://www.cancer.gov/about-cancer>; pristupljeno 26. srpnja 2016.
2. Louis D.N. et al., *The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*; Acta Neuropathol. ; 2007; 114; 97-109.
3. National Brain Tumor Society; *Tumor types: understanding brain tumors*; <http://braintumor.org/>; pristupljeno 27. srpnja 2016.

4. American Brain Tumor Association; <http://www.abta.org/> ; pristupljeno 27.kolovoza 2016.
5. Stupp R. et al. ***Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma***; N. Engl. J. Med.; March 10, 2005; 352; 987-996.
6. Ohgaki H., Kleihues P. ***The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma***; Clin Cancer Res.; .2013 Feb 15; 19(4):764-772.
7. <http://www.mayfieldclinic.com/PE-Glioma.htm> (slike tumora); pristupljeno 07. kolovoza 2016.
8. Williams Parsons D, Jones S. et al. ***An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme***; Science.; 2008 Sep 26; 321 (5897) : 1807-1812.
9. National Cancer Institute; <http://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> ; pristupljeno 01.kolovoza 2016.
10. Wood R.D. et al. ***Human DNA Repair Genes***; Science; (2001); 291, 1284-1289.
11. Browner, WS; Kahn, AJ; Ziv, E; Reiner, AP; Oshima, J; Cawthon, RM; Hsueh, WC; Cummings, SR. ***"The genetics of human longevity"***. Am J Med.; (2004); 117 ; 851-860.
12. Kenji F. ***DNA Mismatch Repair in Eukaryotes and Bacteria***; J Nucleic Acids, June 2010.; ID 260512.
13. da Silva F.C.C,Valentin M.D. et al. ***Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review***; Sao Paulo Med. J. ; Jan. 2009; 127(1):46-51.
14. Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL. ***DNA mismatch repair: functions and mechanisms***. Chem Rev. 2006; 106(2): 302-323.
15. Jiricny J. ***Mediating mismatch repair***. Nat Genet. 2000; 24(1): 6-8.
16. Loukola A, Vilkki S, Singh J, Launonen V, Aaltonen LA. ***Germline and somatic mutation analysis of MLH3 in MSI-positive colorectal cancer***. Am J Pathol. 2000; 157(2): 347-352.
17. Brown T.A. (2002) Genomes, 2nd edition; Oxford, Chapter 14: ***Mutation, Repair and Recombination***.



18. Fishel R., Kolodner R.D. ***Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer;*** Curr Opin Genet Dev. June 1995.; 5 (3): 382–395.
19. White JH, Lusnak K, Fogel S. ***Mismatch-specific post-meiotic segregation frequency in yeast suggests a heteroduplex recombination intermediate.*** Nature 1985, 315: 350-352.
20. Parsons R, Li GM, Longley MJ, Fang WH, Papadopoulos N, Jen J, De la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B, Modrich P. ***Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER<sup>+</sup> tumor cells.*** Cell 1993, December 17; 75(6): 1227-1236.
21. Umar A, Boyer JC, Thomas DC, Nguyen DC, Risinger JI, Boyd J, Ionov Y, Perucho M, Kunkel TA. ***Defective mismatch repair in extracts of colorectal and endometrial cancer cell lines exhibiting microsatellite instability.*** J Biol Chem 1994, 269: 14367-14370.
22. Bhattacharyya NP, Skandatis A, Ganesh A, Groden J, Meuth M: ***Mutator phenotype in human colorectal carcinoma cell lines.*** Proc Natl Acad Sci USA 1994, 91: 6319-6323.
23. Woods O.M., Wiliams P., Careen A., Edwards L., Bartlett S., McLaughlin J.R., Younghusband H.B. ***A New Variant Database for Mismatch Repair Genes Associated With Lynch Syndrome;*** HUMAN MUTATION, 2007; 28(7): 669-673.
24. Aarnio M., Sankila R. et al. ***Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes;*** Int J Cancer. 1999 Apr 12; 81(2):214-218.
25. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush AJ, Berk T, Cohen Z, Tetu B, Burger PC, Wood PA, Taqi F, Booker SV, Petersden GM, Offerhaus GJA, Tersmette AC, Giardiello FM, Vogelstein B, Kinzler KW. ***The molecular basis of Turcot's syndrome.*** N Engl J Med 1995; 332: 839-847.
26. McLendon R., Friedman A. ***Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways;*** The Cancer Genome Atlas; 23 October 2008; 455(7216): 1061-1068.
27. Ohgaki H., Kleihaus P. ***Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas;*** Cancer Science; December 2009.; 100(12): 2235–2241.
28. Fumari F.B., Cloughesy T. et al. ***Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma;*** Nature Reviews Cancer. 2015; 15: 302-310 .

29. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Petersen GM, Kinzler KW, Vogelstein B, de la Chapell A. *Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer*. Science 1993; 260: 812- 816.
30. Leung S.Y., Chan L.T.; et al. *Microsatellite Instability and Mutation of DNA Mismatch Repair Genes in Gliomas*; Am. J. Pathol. October 1998; 153(4): 1181-1188.
31. Thon N., Kreth S., Kreth F.W. *Personalized treatment strategies in glioblastoma: MGMT promoter methylation status*; Onco Targets Ther. Sep 27. 2013.; 6: 1363-1372.
32. Shiraishi A, Sakumi K, Sekiguchi M. "*Increased susceptibility to chemotherapeutic alkylating agents of mice deficient in DNA repair methyltransferase*". Carcinogenesis. October, 2000; 21(10): 1879-1883.
33. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. "*MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*". N. Engl J Med ; 2005; 352 (10): 997-1003.
34. Pegg AE. *Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases*. Mutat Res. 2000; 462(2-3): 83-100.
35. Thiagalingam S, Laken S, Wilson J.K.V, Markowitz S.D, Kinzler K.W, Vogelstein B, Lengauer C. *Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancer*; PNAS, 2001; 98 (5): 2698-2702.
36. von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Wiestler OD, Seizinger R. *Evidence for a tumor suppressor gene on chromosome 19q associated with human astrocytomas, oligodendrogliomas and mixed gliomas*. Cancer Res 1992; 52: 4277-4279.
37. Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. *Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas*. Lab Invest 2000; 80: 65-72.
38. Lazcoz P, Munoz J. et al. *Loss of heterozygosity and microsatellite instability on chromosome arm 10q in neuroblastoma*; Cancer Genet Cytogenet. 2007 Apr 1; 174(1): 1-8.
39. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W, Hegi ME. *MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine?* Nat Rev Neurol 2010; 6: 39-51.

40. Jorg Felsberg Thon Niklas et al. *Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas*; Int J Cancer. 2011 Aug 1; 129(3): 659-670.
41. Cahill D.P, Levine K.K, et al. *Loss of the Mismatch Repair Protein MSH6 in Human Glioblastomas is Associated with Tumor Progression during Temozolomide treatment*; Clinical Cancer Research 2007; 13: 2038-2045.
42. Umar A, Koi M, Risinger JI, et al. *Correction of hypermutability, N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine resistance, and defective DNA mismatch repair by introducing chromosome 2 into human tumor cells with mutations in MSH2 and MSH6*; Cancer Res. 1997 Sep 15; 57(18): 3949-3955.
43. Yip S, Miao J, Cahill DP, Iafrate AJ, Aldape K, Nutt CL, Louis DN. *MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance*. Clin Cancer Res 2009; 15: 4622-4629.
44. Bearzatto A, Szadkowski M, Macpherson P, Jiricny J, Karran P.; *Epigenetic regulation of the MGMT and hMSH6 DNA repair genes in cells resistant to methylating agents*. Cancer Res. 2000 Jun 15; 60(12): 3262-3270.
45. Liu LL, Markowitz S, Gerson SL. *Mismatch repair mutations override alkyltransferase in conferring resistance to temozolomide but not to 1,3-bis(2-chloroethyl)nitrosourea*. Cancer Res. 1996 Dec 1; 56(23): 5375-5379.
46. Yoshioka K, Yoshioka Y, Hsieh P. *ATR kinase activation mediated by MutSa and MutLa in response to cytotoxic O(6)-methylguanine adducts*. Mol Cell. 2006 May 19; 22(4): 501-510.
47. Gil del Alcazar C.R, Todorova P.K, Habib A.A, et al. *Augmented HR Repair Mediates Acquired-temozolomide Resistance in Glioblastoma*. Mol Cancer Res. 2016 Jun 29. 14(8).
48. Friedman HS, Kerby T, Calvert H. *Temozolomide and Treatment of Malignant Glioma*. Clinical Cancer Research. 2000; 6: 2585-2597.
49. Patel AG, Sarkaria JN, Kaufmann SH. *Nonhomologous end joining drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108: 3406-3411.
50. Begum R, Martin S.A. *Targeting Mismatch Repair defects: A novel strategy for personalized cancer treatment*; Elsevier, 2016, February ; 38: 135-139.
51. Nijman S.M.B. *Synthetic lethality: General principles, utility and detection using genetic screens in human cells*; FEBS Lett. 2011 Jan 3; 585(1): 1-6.

