

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



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



Beograd • Belgrade • 2022.
IMGGI • IMGGE

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

Predgovor

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

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

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

„I šta ćemo sad?“

Sonja Pavlović

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dr Gordana Nikčević, naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Molekularni profil timoma

Jelena Perić

Laboratorija za molekularnu biomedicinu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu, Beograd
Kontakt: jelena.kostic@imgge.bg.ac.rs

Apstrakt

Timomi, timusni karcinomi (TC) i timusni neuroendokrini kanceri su najčešće neoplazije lokalizovane u timusu i pripadaju retkim formama tumora. Timomi su indolentne forme tumora, a klasifikovani su u A, AB, B1, B2, B3 kategorije. Novije genetičke studije timoma pokazale su da je jedan od dominantnih markera ove bolesti, gen *GTF2I* sa najčešćim 'drajver' varijantama Chr7 c.1211T>A, p. Leu404His i c.1271T>A, p. Leu424His. Pored *GTF2I*, u patogenezu timoma su uključeni *EGFR*, *TP53*, kao i Ras signalni putevi. Molekularna pozadina timoma još uvek nije dovoljno istražena, međutim sa sve većim napretkom novih tehnologija, poput sekvenciranja nove generacije (eng. NGS) došlo se do novih informacija koje ukazuju na uzrok, detektuju nove molekularne markere, a samim tim omogućuju uspešnije terapijske pristupe ovoj patologiji.

Ključne reči: timomi, sekvenciranje nove generacije, varijante

Molecular profile of thymoma

Jelena Perić

Laboratory for molecular biomedicine, Institute for molecular genetics and genetic engineering,
University in Belgrade, Belgrade

Correspondence: jelena.kostic@imgge.bg.ac.rs

Abstract

Thymoma, thymic carcinoma (TC), and thymic neuroendocrine carcinoma are rare thymic epithelial tumors (TETs) and the most frequent thymus-specific neoplasia. Thymomas are indolent or the less aggressive forms of TETs classified into the following subgroups A, AB, B1, B2, and B3. The most recent studies suggest thymoma specific gene *GTF2I*, with Chr7 c.1211T> A, p. Leu404His and c.1271T>A, p. Leu424His, is considered driver variants for this disease. Additionally, in thymoma pathogenesis are included *EGFR*, *TP53* and Ras signaling pathways. The molecular background of thymoma is still obscure, but the advance of new technologies such as next-generation sequencing (eng. NGS) brings new information related to the molecular milieu of thymoma and other cancers. New information help to explore the cause of the disease, detection of new molecular markers, and better therapy approaches for thymoma.

Keywords: Thymoma, next-generation sequencing, variants

Uvod

Klinički parametri i dijagnostički pristupi kod timoma

Epitelni tumori timusa su timomi, timusni karcinomi i timusni neuroendokrini karcinomi koji su lokalizovani u timusu (1). Postoji značajna raznolikost u genetičkim i kliničkim svojstvima kada su u pitanju različiti tipovi epitelnih tumora timusa. Timomi su najmanje agresivni i prema WHO (World Health Organization) klasifikaciji su podeljeni na A, AB, B1, B2 i B3 subkategorije. Prema Masaoka-Koga kliničkim stadijumima podeljeni su na I, IIa, IIb, III, IVa, IVb subtipove. Timomi spadaju u retke bolesti sa godišnjom incidencom 0.15 na 100.000 ljudi (2, 3). Acocirani su često sa autoimunim oboljenjima poput miastenije gravis (MG). Predstavljaju histološki vrlo heterogenu grupu bolesti. Karakteriše ih dobra prognoza ishoda bolesti kod pacijenta. Kao i kod drugih tumora, mnogo faktora doprinosi timomagenezi, od kojih su mnogi još uvek nepoznanica koju treba rasvetliti, kako na nivou spoljašnjih faktora, tako i na nivou molekularno-genetičkih uzroka (4). Pored toga, status timoma i njegova progresija ne mogu se predvideti radiološkim metodama, to je moguće nakon hirurških zahvata i daljih histoloških analiza. Zbog toga su podaci o relevantnim molekularnim markerima značajni, kako bi se primenio odgovarajući terapijski pristup pacijentu.

U lečenju timoma potreban je multidisciplinarni pristup koji je rezultat bliske saradnje bolesnika i njegove porodice, kliničara, radiologa, bronhologa/hirurga, patologa, molekularnog biologa/genetičara. Predušlov uspešnog lečenja su procedure u pravovremenom detektovanju bolesti, što je, sa imperativom personalizovanog pristupa i izbora dijagnostičkih postupaka: anamneza i klinički pregled, krvna slika sa retikulocitima, LDH, beta HCG, alfa fetoprotein.

Testovi za detekciju autoimunih poremećaja prema kliničkom nalazu i ustanovljenom prisustvu paraneoplastičkih sindroma (npr. prisustvo antitela na acetilholinske receptore kod mijastenije gravis) su: serumski imunoglobulini (kvantitativno), imunoprecipitacija za detekciju monoklonalnih Ig, elektroforeza proteina, imunohistohemijski (IHH) i biološki markeri i invazivne procedure (biopsije, operacija).

Radiološka dijagnostika

Radiografije grudnog koša omogućuju dobru procenu verovatne vrste lezije, istovremeno služe i kao dobra smernica za izbor dopunskih dijagnostičkih postupaka.

Radiografijom grudnog koša timomi se uočavaju kao inkapsulirane mase, dobro ograničene od okolnog tkiva, grubo sferičnog izgleda i manje ili više lobulirani. Uobičajeno, oni su lokalizovani anteriorno, unilaterano, blizu aortnog luka. Krivolinijske, periferne kalcifikacije ukazuju na benignu formu. Pretežno amorfne kalcifikacije mogu da se pojave u obe forme, invazivnoj i neinvazivnoj (5).

Kompjuterizovana tomografija grudnog koša (CT toraksa) i nuklearna magnetna rezonanca (NMR).

Kompjuterizovanom tomografijom grudnog koša (CT), timom se najčešće uočava kao multilobularna formacija koja proizilazi iz jednog ili oba lobusa timusa, na taj način onemogućavajući vizuelizaciju uobičajene forme timusa. Odlikuje se homogenošću ili nehomogenošću usled prisustva kalcifikacija u timoma ili zbog prisustva nekrotičnog tkiva ili cističnih promena. *Zerhouni et al.* su objasnili značaj CT-a u evaluaciji širenja invazivnih timoma, što se loše vizuelizuje stanardnim radiografijama grudnog koša (5). Takođe je sugerisano da je svim pacijentima sa invazivnim timomima koji angažuju dijafragmu potrebno uraditi CT gornjeg dela abdomena, da bi se imao jasan uvid u subdijafragmalno širenje bolesti (6). Nuklearnom ma-

gnetnom rezonancom (NMR) timomi se prezentuju kao hipodenzne ili hiperdenzne promene kao posledica formiranja cističnih, nekrotičnih ili hemoragičnih zona, kao potencijalno formiranje fibroznih septa unutar tumora. Kada je u pitanju utvrđivanje invazivnosti bolesti, MRI je informativnija u odnosu na CT pregled, i bolje prikazuje odnos tumora sa vaskularnim strukturama i limfnim žlezdama, što je od važnosti radi planiranja operativnog pristupa pacijenata. *Sakai et al.* su konstatovali da prisustvo nehomogene, lobulirane strukture ukazuje na invazivnu formu timoma (7, 8).

Date metode nemaju mogućnost histološkog prikaza, a samim tim i histološke dijagnoze. CT pruža dobru prostornu rezoluciju i pouzdana je u razlikovanju tumora medijastinuma od susednih patoloških promena pluća i pleure, i prikazuje raširenost neoplastičkog procesa. Detektuje i dilatacije velikih krvnih sudova, cistične oblasti i oblasti kalcifikacija u medijastinumu. MRI je senzitivna u dijagnostici patološki izmenjenih krvnih sudova i kompleksnih odnosa tumora sa medijastinalnim organima (6).

Tumorski markeri

Tumorski markeri su najčešće složeni makromolekuli ili, uopšteno rečeno, biološki parametri tumora. Metoda njihovog određivanja može biti korisna u izabranim slučajevima:

1. Predstavljaju potvrdu više za dijagnozu tumora
2. Ukazuju na efekat terapije
3. Ukazuju na pojavu recidiva tumora

Podeljeni su na sledeće grupe: produkti tumora (beta-humani horiogonadotropin- hCG-beta), citogenetske promene i molekularni markeri (onkogeni, tumor-supresorski geni).

Tumorski markeri su najčešće hormoni, enzimi, intracelularni proteini ili antigeni ćelijske membrane koji se otkrivaju i mere u serumu, plazmi, urinu ili drugim telesnim tečnostima. U serumu i urinu se imunološkim metodama otkrivaju beta – hCG, alfa – fetoprotein (AFP), kateholamini i njihovi raspadni produkti, i paratiroidni hormoni. Feohromicitomi i neki neurogeni tumori su udruženi sa povećanim nivoima urinarnih kateholamina, homovanilične kiseline, ili vanil - mandelične kiseline. Tkivni tumorski markeri su tkivni antigeni (proteini i hormoni). Za germinativne tumore medijastinuma se vezuje pojava AFP, placentalne alkalne fosfataze, hCG-beta, serumske LDH, neuron specifične enolaze (NSE) i teratokarcinomskog mucinu sličnog antigena (TRA-1-60). CD30 je dijagnostički marker za Hodgkinovu bolest, anaplastični limfom, embrionalni karcinom. Za timusne karcinoide i druge neuroendokrine tumore medijastinuma karakteristični su adeno-kortikotropni hormoni, hromogranin, citokeratin, sinaptofizin, bombesin, neuronspecifična enolaza (7, 8).

Molekularno-biološki aspekti timoma

Sa napretkom novih tehnologija poput sekvenciranja nove generacije (eng. NGS), doslo je do značajnog rasvetljavanja molekularne osnove timoma koja je dugo bila nepoznanica. Ipak, još mali broj radova na temu molekularnog profila ove retke bolesti sugerise na potrebu za daljim studijama. U studijama su korišćene različite tehnike sekvenciranja nove generacije poput sekvenciranja kompletnog genoma (eng. Whole genome sequencing-WGS), sekvenciranja kompletnog egzoma (eng. Whole exome sequencing-WES) i targetovanog sekvenciranja (eng. TS) koje se koristi za sekvenciranje ciljanog regiona jednog ili više gena, gde su najčešće u pitanju tzv. „hot-spot“ regioni u genomu (9, 10). Prednost sekvenciranja kompletnog genoma je to što se sekvencira ceo tumorski genom ili genom uopšte, dok su sekvenciranja egzoma i targetovano sekvenciranje ograničeni na egzome i sekvence koje su selektovane odgovarajućim odabirom regiona od in-

teresa za istraživanje ili dijagnostiku. Međutim, dubina čitanja koja se postiže sekvenciranjem kompletnog genoma je znatno niža (aproksimativno 30X) u odnosu na targetovano sekvenciranje koje, u zavisnosti od odabranog panela gena koji se sekvencira, može biti i preko 1000X, tako da se dobija uvid u somatske varijante karakteristične za tumorske subklonove, a nema ni potrebe za proverom pročitanih varijanti metodom Sangerovog sekvenciranja (11). Pored dubine čitanja, nedostaci sekvenciranja kompletnog genoma su ekonomski aspekti, kao i kompleksnost analiza dobijenih podataka. Targetovano sekvenciranje se koristi u istraživanjima gde je moguće odabrati komercijalno dostupni panel ili dizajnirati novi u zavisnosti od toga koji se geni analiziraju. Međutim, vrlo često se ovaj metodološki pristup koristi u dijagnostičke svrhe (12-14).

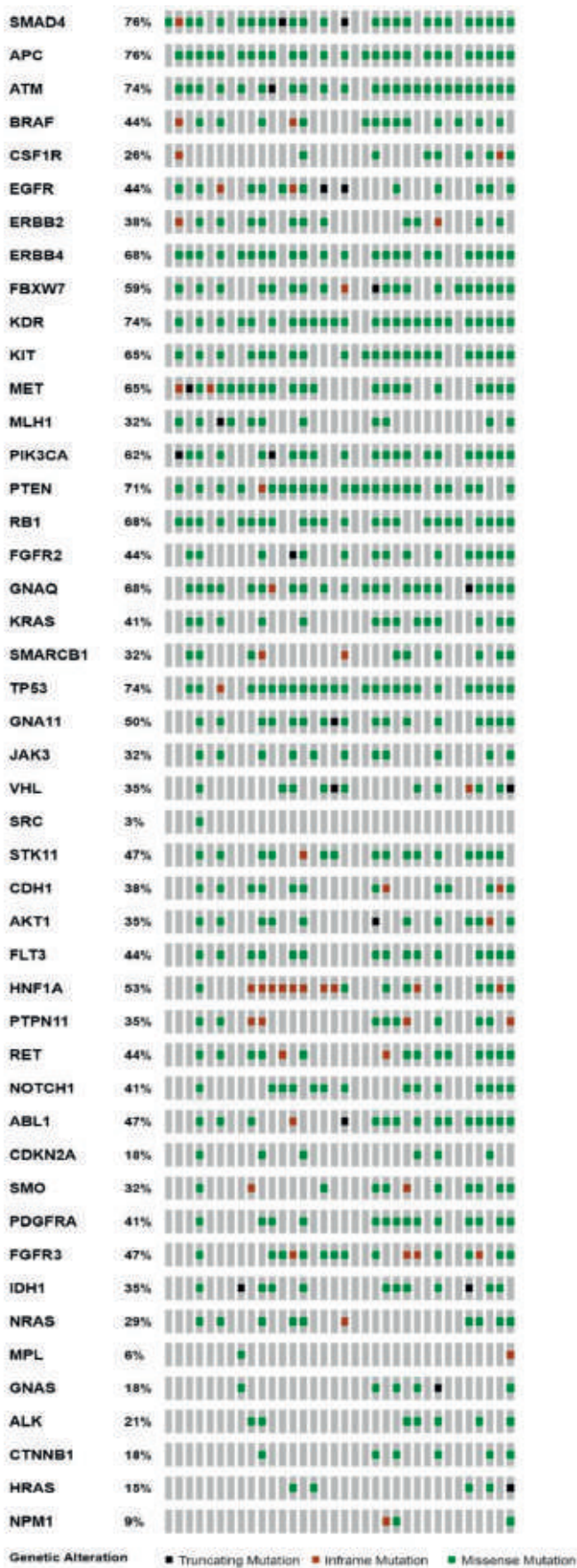
Targetovani paneli i sekvenciranje kompletnog genoma

Panelima koji pripadaju targetovanom sekvenciranju sprovedeno je nekoliko studija, gde su obično analizirani amplikoni gena koji su 'hot-spot' mesta u genima koji su najčešće mutirani u solidnim kancerima (15, 16). Jedan od često korišćenih amplikon panela je TruSeq Cancer Panel (TSACP) koji obuhvata 48 tumorski specifičnih gena sa 212 amplikona: *ABL1*, *AKT1*, *ALK*, *APC*, *ATM*, *BRAF*, *CDH1*, *CDKN2A*, *CSF1R*, *CTNNB1*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB4*, *FBXW7*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FLT3*, *GNA11*, *GNAQ*, *GNAS*, *HNF1A*, *HRAS*, *IDH1*, *JAK2*, *JAK3*, *KDR*, *KIT*, *KRAS*, *MET*, *MLH1*, *MLP*, *NOTCH1*, *NPM1*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *PTEN*, *PTPN11*, *RB1*, *RET*, *SMAD4*, *SMARCB1*, *SMO*, *SRC*, *STK11*, *TP53* i *VHL*. TSACP platforma omogućuje detekciju mutacija koje su zastupljene sa frekvencijom manjom od 5%, što je veoma značajno kada se imaju u vidu retke varijante i tumorska heterogenost (17). U jednoj od studija gde je korišćeno TS identifikovano je 168 rekurentnih varijanti (ponavljajuće varijante), koje su bile prisutne kod najmanje dva uzorka u analiziranoj kohorti pacijenata, od kojih je 25 varijanti uvelo stop kodon-nonsense varijante, 9 varijanti je menjalo okvir čitanja-frameshift, a 134 su bile substitucione varijante-missense. Varijante koje potencijalno mogu izazvati promene u strukturi i funkciji proteina detektovane su u *SMAD4*, *APC*, *ATM*, *PTEN*, *KDR* i *TP53* genima i bile su prisutne kod više od 70% analiziranih uzoraka. Distribucija tipova somatskih mutacija u 48 gena povezanih sa kancerom u ovoj grupi pacijenata predstavljena je u OncoPrint-u (Slika 1) (18). Potencijalno patogene varijante, čija je patogenost proveravana SIFT (19) i Poly-Phen-2 (20) softverskim algoritmima, prikazane su na Slici 2.

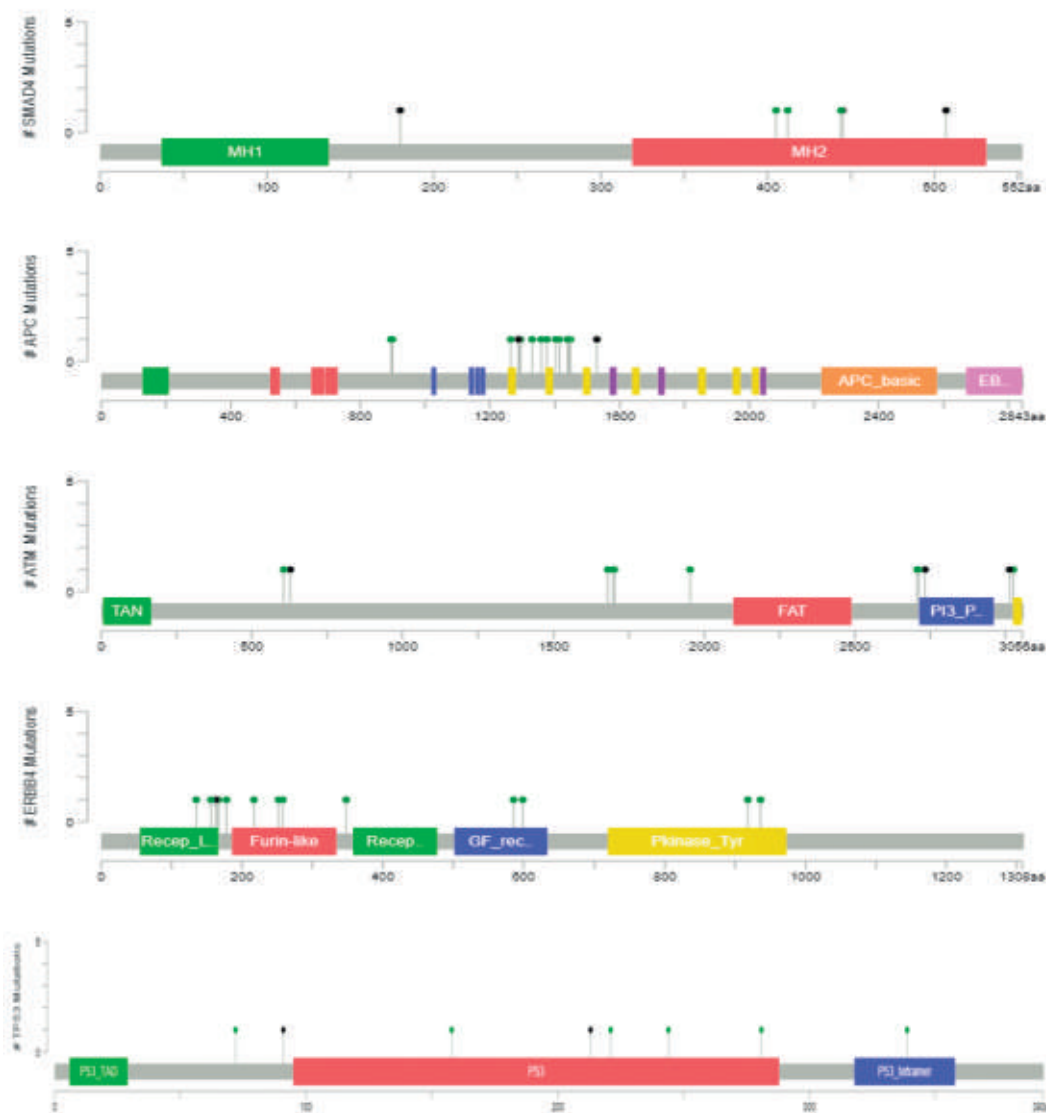
Jedna od studija u kojoj je primenjeno targetovano sekvenciranje (50 gena), korišćenjem Ion Ampli-Seq Cancer Hotspot Panel-a, detektovane su varijante u *HRAS* genu i to jedino u A1 subtipu timoma, dok su u B3 subtipu detektovane varijante u *SMARCB1* i *STK11* genima. Ostale varijante sa panela identifikovane su kod TC. FISH metodom u B3 subtipu timoma pokazana je delecija u *CDKN2A* genu (15).

Prva sveobuhvatna studija koja je urađena na timomima metodom kompletnog sekvenciranja genoma koristila je Complete Genomics platformu. Analizirana je 55-to godišnja pacijentkinja koja je bolovala od IVa subtipa timoma. Na molekularnom nivou identifikovane su pojedinačne nukleotidne varijante (eng.SNV) i 2 male insercije/delecije (eng.InDel) koje dovode do promene na 'splajsing' mestima, kao i do promena na nivou proteina. Na hromozomima 1q, 5,7 i X detektovane su aberacije uzrokovane povećanim brojem ponovaka (eng. CNV), dok je smanjen broj ponovaka identifikovan na 3p, 6, 11q42.2 i q13. Dodatna translokacija t(11;X) je identifikovana metodom sekvenciranja kompletnog genoma uz dodatnu potvrdu Sangerovim sekvenciranjem (21).

Takođe, jedno od prvih istraživanja urađeno je metodom sekvenciranja kompletnog egzoma i sekvenciranja kompletnog genoma na jednom pacijentu sa B3 subtipom timoma i normalnim kariotipom. Pronađene su varijante u *DNMT3A* (p.G728D) i *ASXL1* (p.E657fs) genima koji su poznati tumor-supresorski geni u hematološkim malignitetima (22, 23).



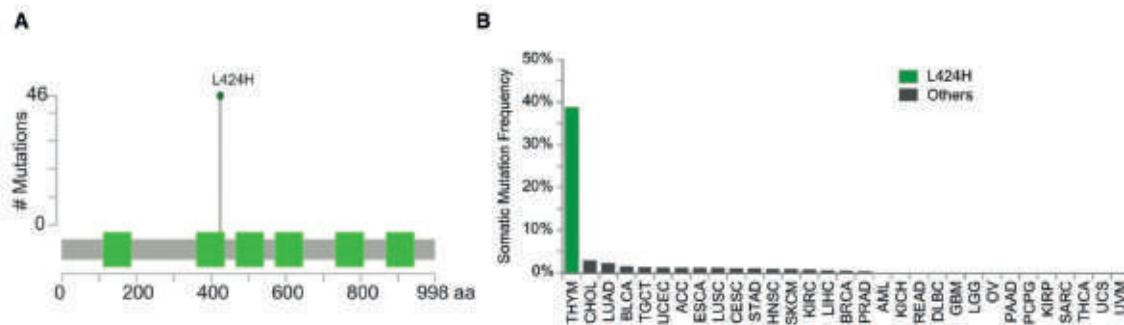
Slika 1. OncoPrint prikazuje procenat pacijenata koji poseduju jednu od varijanti tipa nonsense (N), frameshift (F), missense (M) u jednom od 48 onkogena ili tumor- supresorskih gena kod 35 pacijenata u srpskoj populaciji. Tip mutacije je prikazan bojom, označenom u legendi, pojedinačni geni prikazani su u redovima, a uzorci tumora pacijenata u kolonama (16).



Slika 2. Lollipop grafikon sa varijantama koje se ponavljaju (eng. recurrent variants) u genima sa najvećim brojem nonsense (N), frameshift (F), missense (M) varijantama (16).

Timoma-specifiĉni onkogeni

Sveobuhvatnim analizama većeg broja istraŹivanja došlo se do zakljuĉka da je *GTF2I* gen timoma-specifiĉni onkogen, ĉije se varijante retko detektuju u drugim tumorima. Prisutan je u svim subtipovima timoma A, AB, B1, B2, B3, a po nekim autorima predominantno u A i AB formi (24). *GTF2I* (General Transcription Factor Ili) kodira fosfoprotein koji se vezuje za inicijacioni element (Inr) i Inbox elementim u promotorima, regulišući na taj naĉin transkripciju. *GTF2I* je ukljuĉen u procese ćelijskog ciklusa, diferencijacije, apoptoze, u odgovoru na DNK oštećenja. Deo je Wnt i SHH signalnih puteva koji regulišu neuralne procese, zatim ATM signalnog puta, regulišući stabilnost genoma, kao i kaskade B ćelijskog receptora (genecards.org). Najĉeće mutacije koje su prisutne kod timoma i koje dovode do geneze ove retke bolesti su *GTF2I* Chr7 c.1211T > A i p. Leu404His i c.1271T>A, p. Leu424His (Slika 3.), oznaĉene kao vodeće ili 'drajver' mutacije (25).



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

Pored *GTF2I* gena, ključnu ulogu u patologiji timoma imaju varijante u *HRAS*, *NRAS* i *TP53* genima i Chr16q loss (24). *HRAS*, *NRAS* i *TP53* imaju znatno manje rekurentnih varijanti, ali se zajedno sa *GTF2I* smatraju ključnim u nastanku bolesti. *HRAS* i *NRAS* pripadaju Ras signalnom putu. Velika većina varijanti u *HRAS* pripada „gain-of-function“ varijantama (kodon 12, 13, 117), a jedna od poznatih varijanti je G13V koja se nalazi i u drugim tumorima (26). Skorija studija Jovanović *et al.* takođe ukazuje na prisustvo rekurentnih mutacija u *HRAS* genu (27). *NRAS* varijante takođe pripadaju „gain-of-function“ varijantama i najčešće se javljaju u 61 kodonu.

Većina patogenih varijanti kod *TP53*, pripadaju klasi „gain-of-function“ varijantama. *TP53* gen je ključni tumor-supresorski gen koji učestvuje u regulaciji najvažnijih procesa poput ćelijskog ciklusa, apoptoze, senescencije, regulacije i reparacije DNK oštećenja (28). U skorijim istraživanjima detektovane su stop kodon varijante R213* and V91*, kao i četiri patogene missense varijante, D281N, G244S, R158C, E221K (16, 24, 29).

Prema podacima iz TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) baze iz 2021. godine, kod 27 pacijenata u kineskoj populaciji, najmutiraniji geni su *NF1* i *ATM* sa frekvencom od 11%. *GTF2I* mutacija je predominantno karakteristična za A, AB subtipove, dok je na nivou genske ekspresije *PD-L1* predominantno eksprimiran u B2 i B3 subtipu bolesti (30). U istraživanju koje su sproveli Liu *et al.* koristeći širok spektar bioinformatičkih metoda, analizirani su rezultati mutacionog statusa, metilacionog statusu i iRNK sekvenciranja. Kao izvor podataka korišćena je TCGA baza podataka. Geni koji su se izdvojili kao važni za timome, asocirani su uglavnom za imunski odgovor. Neki od njih su *LIPE*, *MYH6*, *ACTG2*, *KLF4*, *SULT4A1* i *TF* (31).

Timomi i miastenia gravis (MS)

Timomi su često asocirani sa raznim paraneoplastičnim sindromima (PNS) i to u 50-70% slučajeva. Najčešće su asocirani sa miastenijom gravis (MG), koja predstavlja bolest kod koje je narušena funkcionalnost neuromotorne ploče (32). Odlikuje se slabošću i umorom, koji su posledica antitela na acetil-holinergičke receptore (AChR), koja direktno atakuju neuromuskularnu vezu (33). Timomi asocirani sa MG (TAMG) karakteristični su uglavnom za B subtipove, ređe za A i AB, a odsutni su kod TC. Inače, geni koji su uključeni u imunost i indukciju tolerancije nisu različito eksprimirani, kod različitih subtipova timoma, uključujući

gene na T ćelijama, proteaze koje igraju ulogu u njihovoj selekciji, apoptotske gene, koreceptore, kaskadne molekule i gene glavnog kompleksa histokompatibilnosti klase I i klase II (eng. MHC). Primećeno je povećanje nivoa TLR3 - Toll-like receptora (34), i smanjenje proteinaze R i dvolančanih RNK (dsRNA) helikaza u pacijenata sa timomima asociranim sa MG. Pored toga, povećana je ekspresija CDNK2A, koji je marker HPV infekcije. Ono što je najupečatljivije je izrazito povećana ekspresija anti-interferon tipa I (IFN-I) antitela u timoma-MG asociranim patologijama (35, 36).

Autoimunost predstavlja jedno od osnovnih obeležja TAMG i prema podacima, ona je prisutna u blizu 30% od ukupnog broja slučajeva. Prema podacima TCGA baze, timomi su jedini tumori koji se proučavaju u kontekstu povezanosti sa autoimunošću. Prisustvo aneuploidija je tipičan nalaz za tumor-asociran sa autoimunošću, kao i blago povećana ekspresija autoantitela na titin, AchT i rianodin receptore - RYR1, RYR2 (37, 38).

Zaključak

Na osnovu svega navedenog, timomi su retki tumori sa relativno malim brojem studija na molekularnom nivou, čiji se broj povećava sa razvojem novih 'multi-omics' metodologija. U poslednjih par godina došlo se do mnogih novih saznanja u ovoj oblasti i otkrivanja novih molekularnih markera. Samim tim, omogućuje se bolje poznavanje molekularne pozadine ove bolesti i uspešniji personalizovani pristup kliničara kada je u pitanju izbor tretmana obolelih od ove bolesti.

Zahvalnica

Ovaj rad je podržan od strane projekta Ministarstva nauke, prosvete i tehnološkog razvoja Republike Srbije (br. III 41004), i projekta EC EU-FP7-REGPOT-316088, 2013-2016.

Literatura

1. Cowen D, Richaud P, Mornex F, Bachelot T, Jung GM, Mirabel X, et al. Thymoma: results of a multicentric retrospective series of 149 non-metastatic irradiated patients and review of the literature. FNCLCC trialists. Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer. *Radiother Oncol.* 1995;34(1):9-16.
2. Engels EA, Pfeiffer RM. Malignant thymoma in the United States: demographic patterns in incidence and associations with subsequent malignancies. *Int J Cancer.* 2003;105(4):546-51.
3. Tomaszek S, Wigle DA, Keshavjee S, Fischer S. Thymomas: review of current clinical practice. *Ann Thorac Surg.* 2009;87(6):1973-80.
4. Yu L, Ke J, Du X, Yu Z, Gao D. Genetic characterization of thymoma. *Sci Rep.* 2019;9(1):2369.
5. Zerhouni EA, Scott WW, Jr., Baker RR, Wharam MD, Siegelman SS. Invasive thymomas: diagnosis and evaluation by computed tomography. *J Comput Assist Tomogr.* 1982;6(1):92-100.
6. Samardzic N. Kliničke manifestacije timoma. 2018.
7. Sakai F, Sone S, Kiyono K, Kawai T, Maruyama A, Ueda H, et al. MR imaging of thymoma: radiologic-pathologic correlation. *AJR Am J Roentgenol.* 1992;158(4):751-6.
8. Strange CD, Ahuja J, Shroff GS, Truong MT, Marom EM. Imaging Evaluation of Thymoma and Thymic Carcinoma. *Front Oncol.* 2021;11:810419.
9. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol.* 2018;122(1):e59.
10. Hirsch B, Endris V, Lassmann S, Weichert W, Pfarr N, Schirmacher P, et al. Multicenter validation of cancer gene panel-based next-generation sequencing for translational research and molecular diagnostics. *Virchows Arch.* 2018;472(4):557-65.
11. Xu H, DiCarlo J, Satya RV, Peng Q, Wang Y. Comparison of somatic mutation calling methods in amplicon and whole exome sequence data. *BMC Genomics.* 2014;15:244.
12. Duncavage EJ, Abel HJ, Szankasi P, Kelley TW, Pfeifer JD. Targeted next generation sequencing of clinically significant gene mutations and translocations in leukemia. *Mod Pathol.* 2012;25(6):795-804.
13. Simen BB, Yin L, Goswami CP, Davis KO, Bajaj R, Gong JZ, et al. Validation of a next-generation-sequencing cancer panel for use in the clinical laboratory. *Arch Pathol Lab Med.* 2015;139(4):508-17.
14. Sie D, Snijders PJ, Meijer GA, Doeleman MW, van Moorsel MI, van Essen HF, et al. Performance of amplicon-based next generation DNA sequencing for diagnostic gene mutation profiling in oncopathology. *Cell Oncol (Dordr).* 2014;37(5):353-61.
15. Enkner F, Pichlhofer B, Zaharie AT, Kronic M, Holper TM, Janik S, et al. Molecular Profiling of Thymoma and Thymic Carcinoma: Genetic Differences and Potential Novel Therapeutic Targets. *Pathol Oncol Res.* 2017;23(3):551-64.
16. Peric J, Samardic N, Trifunovic Škodric V, Tošić N, Stojsić J, Pavlović S, Jovanović D. Genomic profiling of thymoma using a targeted high-throughput approach. *Arch Med Sci.* 2020.
17. Stockley TL, Oza AM, Berman HK, Leighl NB, Knox JJ, Shepherd FA, et al. Molecular profiling of advanced solid tumors and patient outcomes with genotype-matched clinical trials: the Princess Margaret IMPACT/COMPACT trial. *Genome Med.* 2016;8(1):109.
18. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013;6(269):pl1.
19. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3812-4.
20. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.* 2013;Chapter 7:Unit7 20.
21. Petrini I, Rajan A, Pham T, Voeller D, Davis S, Gao J, et al. Whole genome and transcriptome sequencing of a B3 thymoma. *PLoS One.* 2013;8(4):e60572.
22. Belani R, Oliveira G, Erikson GA, Ra S, Schechter MS, Lee JK, et al. ASXL1 and DNMT3A mutation in a cytogenetically normal B3 thymoma. *Oncogenesis.* 2014;3:e111.
23. Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, et al. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(3):177-83.

24. Radovich M, Pickering CR, Felau I, Ha G, Zhang H, Jo H, et al. The Integrated Genomic Landscape of Thymic Epithelial Tumors. *Cancer Cell*. 2018;33(2):244-58 e10.
25. Higuchi R, Goto T, Hirotsu Y, Yokoyama Y, Nakagomi T, Otake S, et al. Primary Driver Mutations in GTF2I Specific to the Development of Thymomas. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8).
26. Chau NG, Kim ES, Wistuba I. The multidisciplinary approach to thymoma: combining molecular and clinical approaches. *J Thorac Oncol*. 2010;5(10 Suppl 4):S313-7.
27. Jovanovic D, Markovic J, Ceriman V, Peric J, Pavlovic S, Soldatovic I. Correlation of genomic alterations and PD-L1 expression in thymoma. *J Thorac Dis*. 2020;12(12):7561-70.
28. Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, Lahav G. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(4):199-210.
29. Chen K, Che J, Zhang X, Jin R, Xiang J, Han D, et al. Next-generation sequencing in thymic epithelial tumors uncovered novel genomic aberration sites and strong correlation between TMB and MSH6 single nucleotide variations. *Cancer Lett*. 2020;476:75-86.
30. Liang N, Liu L, Huang C, Liu H, Guo C, Li J, et al. Transcriptomic and Mutational Analysis Discovering Distinct Molecular Characteristics Among Chinese Thymic Epithelial Tumor Patients. *Front Oncol*. 2021;11:647512.
31. Liu D, Zhang P, Zhao J, Yang L, Wang W. Identification of Molecular Characteristics and New Prognostic Targets for Thymoma by Multiomics Analysis. *Biomed Res Int*. 2021;2021:5587441.
32. Xi J, Wang L, Yan C, Song J, Song Y, Chen J, et al. The Cancer Genome Atlas dataset-based analysis of aberrantly expressed genes by GeneAnalytics in thymoma associated myasthenia gravis: focusing on T cells. *J Thorac Dis*. 2019;11(6):2315-23.
33. Kumar R. Myasthenia gravis and thymic neoplasms: A brief review. *World J Clin Cases*. 2015;3(12):980-3.
34. Chang R, Duan S, Li S, Zhang P. Viral infection in thymoma and thymic tumors with autoimmune diseases. *Thorac Cancer*. 2021;12(22):2971-80.
35. Cufi P, Soussan P, Truffault F, Fetouchi R, Robinet M, Fadel E, et al. Thymoma-associated myasthenia gravis: On the search for a pathogen signature. *J Autoimmun*. 2014;52:29-35.
36. Cufi P, Dragin N, Ruhlmann N, Weiss JM, Fadel E, Serraf A, et al. Central role of interferon-beta in thymic events leading to myasthenia gravis. *J Autoimmun*. 2014;52:44-52.
37. Gilhus NE, Skeie GO, Romi F, Lazaridis K, Zisimopoulou P, Tzartos S. Myasthenia gravis - autoantibody characteristics and their implications for therapy. *Nat Rev Neurol*. 2016;12(5):259-68.
38. Girard N, Shen R, Guo T, Zakowski MF, Heguy A, Riely GJ, et al. Comprehensive genomic analysis reveals clinically relevant molecular distinctions between thymic carcinomas and thymomas. *Clin Cancer Res*. 2009;15(22):6790-9.



IMPRESUM

Trendovi u molekularnoj biologiji, 2022.

Izdavač

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

Urednik

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

Uređivački odbor

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

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

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

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

Recenzenti

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

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

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

Dizajn i izrada korica

Ivan Strahinić

Štampa

Curent Print, Beograd

Periodičnost izlaženja publikacije

Godišnje

Tiraž

100 primeraka

Autori

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

CIP - Каталогизacija u publikaciji
Narodna biblioteka Srbije, Beograd

577.2

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

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