

Patogeneza nedostatne homologne rekombinacije u solidnim tumorima

Šabarić, Viktor

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:548083>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2022-01-17**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

VIKTOR ŠABARIĆ

**PATOGENEZA NEDOSTATNE HOMOLOGNE
REKOMBINACIJE U SOLIDNIM TUMORIMA**

DIPLOMSKI RAD



ZAGREB, 2020.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Natalije Dedić Plavetić, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2019./2020.

POPIS I OBJAŠNENJE KRATICA

A - adenin

aCGH - komparativna genomska hibridizacija na array-u (od engl. *array comparative genomic hybridization*)

APE1 - apurinska/apirimidinska endonukleaza 1

ATM – ataksija teleangiektazija mutirani (od engl. *ataxia teleangiectasia mutated*)

ATR – povezan s ataksija teleangiektazija i RAD3 (od engl. *ataxia teleangiectasia and Rad3-related*)

ATRIP - od engl. *ATR interacted protein*

BACH1 - od engl. *BTB and CNC homology 1*

BARD1 - RING domena 1 povezana s *BRCA* genom (od engl. *BRCA associated RING domain 1*)

BER - popravak izrezivanjem baza (od engl. *base excision repair*)

BLM - Bloom

BRCA1 - od engl. *breast cancer type 1*

BRCA2 - od engl. *breast cancer type 2*

C - citozin

CHEK1 - od engl. *checkpoint kinase 1*

CHEK2 - od engl. *checkpoint kinase 2*

CpG - 5'-citozin-fosfat-gvanin-3'

CPD - ciklobutanski pirimidinski dimeri

CS - Cockaynov sindrom

CSA - Cockayne sindrom grupa A

CSB - Cockayne sindrom grupa B

DDB2 - od engl. *DNA damage-binding protein 2*

DDR - odgovor na oštećenje DNA (od engl. *DNA damage response*)

dGTP - deoksigvanozin trifosfat (od engl. *deoxyguanosine triphosphate*)

dHJ - dvostruki Holliday spoj (od engl. *double Holliday junction*)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (od engl. *deoxyribonucleic acid*)

DNA-PK - DNA-ovisna protein kinaza (od engl. *DNA-dependent protein kinase*)

DNA-PKcs - DNA-ovisna protein kinaza, katalitička podjedinica (od engl. *DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*)

dNTP - deoksinukleozid trifosfat (od engl. *deoxyribonucleoside triphosphate*)

dRP - deoksiribofosfat

dsDNA - dvolančana DNA (od engl. *double-stranded DNA*)

dTTP - deoksitimidin trifosfat (od engl. *deoxythymidine triphosphate*)

ER - estrogen receptor

FEN1 - od engl. *Flap Structure-Specific Endonuclease 1*

G - gvanin

GG-NER - od engl. *global genome NER*

HAA - heterociklički aromatski amini

hDNA - od engl. *heteroduplex DNA*

HER2 - receptor za humani epidermalni čimbenik rasta 2 (od engl. *human epidermal growth factor receptor 2*)

HGSOC - serozni tumor visokog stupnja malignosti (od engl. *high-grade serous ovarian cancer*)

HR - homologna rekombinacija

HRD - nedostatna homologna rekombinacija (od engl. *homologous recombination deficiency*)

ICL - od engl. *interstrand crosslink*

LOH - gubitak heterozigotnosti od engl. *loss of heterozygosity*)

LST - od engl. *large scale transition*

MLH1 - mutL homolog 1

MMR - popravak pogrešno sparenih baza (od engl. *mismatch repair*)

MSH2 - mutS homolog 2

MSI - mikrosatelitna nestabilnost (od engl. *microsatellite instability*)

mutL - od engl. *mutator L*

mutS - od engl. *mutator S*

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (od engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NER - popravak izrezivanjem nukleotida (od engl. *nucleotide excision repair*)

NHEJ - nehomologno spajanje krajeva DNA (od engl. *non-homologous end joining*)

PAH - policklički aromatski ugljikovodici (od engl. *polycyclic aromatic hydrocarbons*)

PALB2 - od engl. *partner and localizer of BRCA2*

PARP - poli (ADP-riboza) polimeraza

PIKK – kinaza povezana s fosfatidilinozitol 3-kinazom (od engl. *phosphatidylinositol 3-kinase-related-kinase*)

PMS2 - od engl. *postmeiotic segregation increased 2*

PNK - polinukleotid kinaza

Pol - polimeraza

PR – progesteronski receptor

RB - retinoblastom

RMI1 - od engl. *RecQ-mediated genome instability protein 1*

RNA - ribonukleinska kiselina (od engl. *ribonucleic acid*)

rNTP - ribonukleozid trifosfat (od engl. *ribonucleoside triphosphate*)

ROS - reaktivni spojevi kisika (od engl. *reactive oxygen species*)

RPA - replikacijski protein A

SCID - teška kombinirana imunodeficijencija (od engl. *severe combined immunodeficiency*)

SDSA - od engl. *synthesis-dependant strand annealing*

SSB - jednolančani lom DNA (od engl. *single-stranded break*)

ss-DNA - jednolančana DNA (od engl. *single stranded-DNA*)

T - timin

TAI - od engl. *telomeric allelic imbalance*

TC-NER - od engl. *transcription coupled NER*

TFIIH - Transkripcijski faktor II H

TLS - translezijska DNA sinteza

TOP3 - topoizomeraza 3 alfa

TTD - trihotiodistrofija

UV - ultraljubičasto (od engl. *ultraviolet*)

UV-DDB - od engl. *UV-damaged DNA-binding protein*

VUS - varijanta neizvjesne važnosti (od engl. *variant of uncertain significance*)

XLF - od engl. *XRCC4-like faktor*

XP - Xeroderma pigmentosum

XPA - Xeroderma pigmentosum grupa A

XPB - Xeroderma pigmentosum grupa B

XPC - Xeroderma pigmentosum grupa C

XPD - Xeroderma pigmentosum grupa D

XPE - Xeroderma pigmentosum grupa E

XPG - Xeroderma pigmentosum grupa G

XRCC1 - od engl. *X-ray repair cross-complementing protein 1*

XRCC4 - od engl. *X-ray repair cross-complementing protein 4*

6-4PP - pirimidin - (6-4) - pirimidon

8-okso-G - 7,8-dihidro-8-okso-2'-deoksi-gvanin

SAŽETAK

Viktor Šabarić

Patogeneza nedostatne homologne rekombinacije u solidnim tumorima

Deoksiribonukleinska kiselina (DNA), osnovna molekula naslijeđivanja, svakodnevno trpi oštećenja nastala endogenim i/ili egzogenim putem, koja ako se ne poprave mogu dovesti do mutacija koje pridonose apoptozi stanica, starenju organizma, razvoju neurodegenerativnih bolesti i tumorogeneze. Kako se to ne bi dogodilo, stanice reagiraju pokretanjem odgovora na oštećenje DNA (DDR), koji regrutira mehanizme popravka DNA ovisno o tipu oštećenja. Popravak izrezivanjem baza (BER), popravak iscijecanjem nukleotida (NER) i popravak pogrešno sparenih baza (MMR) popravljaju jednolančane lomove DNA, dok su nehomologno spajanje krajeva DNA (NHEJ) i homologna rekombinacija (HR) zaduženi za popravak dvolančanih lomova DNA. Homologna rekombinacija vrlo je složen proces u kojem glavnu ulogu imaju geni poput *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *ATM*, *ATR*, *BACH1*, *BARD1*. Nedostatnu homolognu rekombinaciju mogu izazvati mutacije gena povezanih s procesom homologne rekombinacije, ali može nastati i putem epigenetskih promjena, što može uzrokovati tumore dojke, jajnika, prostate i gušterače, te razvoj bolesti poput Fanconijeve anemije i Bloomovog sindroma. Dijagnostika nedostatne homologne rekombinacije (HRD), izuzetno značajna zbog određivanja optimalne terapijske opcije, zasad nije polučila zadovoljavajuće rezultate. Onkološkim pacijentima, u čijim tumorskim stanicama je detektirana ili somatska ili mutacija zametne loze koja dovodi do nedostatne homologne rekombinacije, danas je poboljšano preživljenje i ishodi liječenja razvojem inhibitora poli (ADP-riboza) polimeraza (PARP) (olaparib, rucaparib, niraparib, talazoparib). Cilj ovog diplomskog rada je dati detaljniji pregled na mehanizme popravka DNA s naglaskom na homolognu rekombinaciju, te prikazati bolesti, a posebice solidne tumore, prouzročene nedostatnom homolognom rekombinacijom, te njihovu dijagnostiku i terapiju.

ključne riječi: nedostatna homologna rekombinacija, PARP, tumor

SUMMARY

Viktor Šabarić

Pathogenesis of deficient homologous recombination in solid tumors

Deoxyribonucleic acid (DNA), basic molecule of inheritance, gets damaged on daily basis by endogenous and/or exogenous agents. Damaged DNA, if left unrepaired, can lead to mutations which can cause cell death, organism senescence, neurodegenerative disease and tumorigenesis. In order to stop that, cells initiate DNA damage response (DDR), which recruits DNA repair pathways depending on the type of DNA damage. Single-stranded DNA breaks can be repaired by base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER) or mismatch repair (MMR), while double-stranded DNA breaks are repaired either by non-homologous end-joining (NHEJ) or homologous recombination (HR) pathway. Homologous recombination is a highly complex pathway in which genes such as *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *ATM*, *ATR*, *BACH1*, *BARD1* play pivotal role. Homologous recombination deficiency (HRD) can be caused by mutations in genes related to HR pathway, however it can be also caused by epigenetic changes in given genes, which can contribute to breast, ovary, prostate and pancreas carcinogenesis or add to development of Fanconi anemia or Bloom syndrome. HRD diagnostics, extremely significant in terms of selecting optimal therapy, so far has not obtained adequate results. Oncology patients, in whose tumor cells either somatic or germ-line mutation which leads to HRD has been detected, today have better survival rates due to development of PARP inhibitors (olaparib, rucaparib, niraparib, talazoparib). The aim of this graduate thesis is to give a detailed review of DNA repair pathways with emphasis on homologous recombination, as well as to present diseases, especially solid tumors, caused by HRD and their diagnostics along with therapy options.

key words: homologous recombination deficiency, PARP, tumor

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. NAČINI OŠTEĆENJA DNA.....	2
2.1. UV ZRAČENJE.....	3
2.2. REAKTIVNI SPOJEVI KISIKA.....	4
3. MEHANIZMI POPRAVKA DNA.....	6
3.1. POPRAVAK ISIJECANJEM BAZA (BER).....	6
3.2. POPRAVAK ISIJECANJEM NUKLEOTIDA (NER).....	8
3.3. POPRAVAK POGREŠNO SPARENIH BAZA (MMR).....	9
3.4. NEHOMOLOGNO SPAJANJE KRAJEVA DNA (NHEJ).....	10
3.5. HOMOLOGNA REKOMBINACIJA (HR).....	11
4. TUMORI UZROKOVANI NEDOSTATNOM HOMOLOGNOM REKOMBINACIJOM.....	16
4.1. TUMORI DOJKE.....	16
4.2. TUMORI JAJNIKA.....	19
4.3. TUMORI PROSTATE.....	20
4.4. TUMORI GUŠTERAČE.....	21
5. DIJAGNOSTIKA NEDOSTATNE HOMOLOGNE REKOMBINACIJE.....	21
6. ULOGA PARP INHIBITORA I OSTALIH LIJEKOVA U LIJEČENJU TUMORA S NEDOSTATNOM HOMOLOGNOM REKOMBINACIJOM.....	23
7. ZAKLJUČAK.....	28
8. ZAHVALE.....	29
9. LITERATURA.....	30
10. ŽIVOTOPIS.....	39

1. UVOD

Svaki dan u našim stanicama dogode se deseci tisuća deoksiribonukleinskih (DNA, od engl. *deoxyribonucleic acid*) grešaka i mnogi različiti stanični mehanizmi razvili su se sa svrhom popravka istih. Odgovor na oštećenje DNA (DDR, od engl. *DNA damage response*) je pojam koji obuhvaća sve intracelularne i intercelularne mehanizme koji se odvijaju posljedično nakon oštećenja DNA. (1) Poznato je da je DNA, osnovna jedinica nasljeđivanja, vrlo reaktivna molekula i podložna modifikacijama endogenim i egzogenim tvarima. (2) Kako bi stanica preživjela i proliferirala, DNA greške moraju biti popravljene. Genska nestabilnost uzrokuje inicijalno tumorogenezu, a kasnije dovodi do stečene otpornosti tumora na terapiju. Iako je genska nestabilnost biljeg tumorskih stanica, genom tumora ne može biti suviše nestabilan. Nakon prelaska određene granice, tumorske stanice umrijet će zbog prevelikih genomskih promjena. (3) Stanice reagiraju na oštećenje DNA pokretanjem spomenutog DDR-a, što osigurava dovoljno vremena specifičnim mehanizmima popravka DNA da uklone oštećenje. (2)

Koji će se mehanizam popravka DNA aktivirati ovisi o samom tipu oštećenja. Poznamo najmanje pet glavnih mehanizama popravka DNA – popravak izrezivanjem baza (BER, od engl. *base excision repair*), popravak izrezivanjem nukleotida (NER, od engl. *nucleotide excision repair*), popravak pogrešno sparenih baza (MMR, od engl. *mismatch repair*), homologna rekombincija (HR) i nehomologno spajanje krajeva DNA (NHEJ, od engl. *non-homologous end joining*), koji su aktivni tijekom različitih faza staničnog ciklusa. Ti procesi su ključni za održavanje genetske stabilnosti u stanicama. Ukoliko DNA greške perzistiraju, aktivira se programirana stanična smrt odnosno apoptoza da bi se odstranile stanice s nestabilnošću genoma. U mnogim tumorima su mehanizmi popravka DNA poremećeni, što pridonosi mutagenezi i razvitku tumora. Starenje i određene neurodegenerativne bolesti mogu biti produkt ovih procesa. (2)

U ovom preglednom radu naglasak će biti na solidnim tumorima čiju genezu uzrokuje nedostatna HR i disfunkcionalnim genima koji dovode do poremećaja u tom mehanizmu popravka DNA. Također, prikazana će biti i trenutno dostupna terapija

solidnih tumora koja se temelji na sadašnjim spoznajama mehanizama popravaka DNA.

2. NAČINI OŠTEĆENJA DNA

Godine 1761., nakon što je rekreacijsko korištenje duhana postalo popularno u Londonu, liječnik John Hill napisao je knjigu „Cautions Against the Immoderate Use of Snuff“. Hillova opažanja da ušmrkavanje duhana može uzrokovati polipe vodilo je ka epidemiološkim studijama gotovo 200 godina kasnije, koje su potvrdile povezanost između pušenja duhana i raka pluća. Nekoliko godina kasnije, 1775. godine, Sir Percivall Pott objavio je revolucionarni esej u kojem je pokazao da izloženost čađi dovodi do visoke incidencije skrotalnog karcinoma u mladih dimnjačara. To se smatra prvom poveznicom između zanimanja i raka. No, trebalo je gotovo 70 godina da se u Ujedinjenom kraljevstvu donese zakon protiv rada djece kao dimnjačara. Još više zapanjuje činjenica da je proteklo 150 godina do dodatnih studija o kemijskim karcinogenima, iako su slučajevi povezanosti raka i izloženosti kemijskim karcinogenima bili kontinuirano sporadično prijavljivani. (4)

Oštećenja DNA su posljedica egzogenih ili endogenih procesa. Karcinogeni, neovisno o njihovom podrijetlu, djeluju putem raznih mehanizama. Možemo ih podijeliti na kemijske i fizikalne agense, te prema izlaganju karcinogenima, oni mogu direktno ili indirektno oštetiti DNA. Direktni karcinogeni su svi oni koji ne zahtijevaju metaboličku aktivaciju ili bilo koju vrstu molekularne modifikacije kako bi oštetili DNA. U tu grupu, primjerice, spadaju ultraljubičasto (UV, od engl. *ultraviolet*) zračenje, nitrozamini i alkilirajući agensi. Indirektni karcinogeni su pak oni čije je relativno nereaktivne roditeljske spojeve potrebno bioaktivirati kako bi ih se pretvorilo u karcinogene ili reaktivne međuspojeve koji su sposobni izazvati genotoksične efekte. U tu skupinu, primjerice, spadaju policiklički aromatski ugljikovodici (PAH, od engl. *polycyclic aromatic hydrocarbons*), heterociklički aromatski amini (HAA), mikotoksini i aristoholična kislina. Također, egzogeni ili endogeni agensi mogu prouzročiti DNA oštećenje posredovano oksidativnim stresom, čiji glavni uzrok su reaktivni spojevi kisika (ROS, od engl. *reactive oxygen species*). (5)

U daljnjem tekstu detaljnije ćemo prikazati dva agensa kojima smo konstantno izloženi, UV zračenje i ROS.

2.1. Ultraljubičasto zračenje

Najčešći okolišni agens koji oštećuje DNA jest upravo UV zračenje. (6) Ultraljubičasto zračenje potiče od sunca i dio je elektromagnetskog spektra koji uključuje valne duljine između 100 i 400 nm: UVC (100-280 nm), UVB (280-315 nm) i UVA (315-400 nm) (7, 8). Kisik i ozonski omotač potpuno apsorbiraju UVC zrake i 90% UVB zraka, što znači kako su za ljudsko zdravlje i ekosisteme relevantne samo UVA i UVB zrake. UVB zračenje kože glavni je izvor vitamina D koji je ključan kako za održavanje homeostaze kalcija tako i za druge važne procese. No, pretjerano izlaganje UVB zrakama dovodi do raka kože poput malignog melanoma i nemelanomskih rakova kože poput planocelularnog i bazocelularnog karcinoma. Nekad smatrano relativno neškodljivim, za UVA zračenje danas je poznato da može uzrokovati oštećenja DNA (5, 6, 8), te oštećenje proteina i lipida, što može imati štetne posljedice poput karcinogeneze i starenja kože. (7)

Lezije inducirane ultraljubičastim zračenjem uzrokuju kemijske modifikacije i strukturne distorzije DNA formirajući fotoprodukte, te putem oksidativnog stresa. Produkcija fotoprodukata, poput ciklobutanskih pirimidinskih dimera (CPD), pirimidin – (6-4) – pirimidon (6-4PP) fotoprodukata i njihovih Dewarskih izomera postiže se putem direktne apsorpcije UVB zraka. (5, 9) Ciklobutanski pirimidinski dimeri predstavljaju 75% mutacija koje su inducirane UV-om. Timin-citozin (T-C) i C-C CDP lezije su predominantne u tumor supresor genu *TP53* u pacijenata s karcinomom kože. S druge strane, T-T CDP lezije su manje zastupljene zbog njihove eradikacije insercijom adenina putem DNA popravljачkih mehanizama. (5) Ciklobutanski pirimidinski dimeri, 6-4PP i Dewar izomeri blokiraju sintezu DNA kada se nalaze na lancu kalupu prevenirajući prolaz DNA polimeraze. (9) Izlaganje UVA zrakama uzrokuje stvaranje timinskih dimera, te vodi ka stvaranju reaktivnih spojeva kisika kroz fotosenzibilne reakcije i tako indirektno uzrokuje oksidativne DNA lezije. U ljudi i miševa se lezije CPD i 6-4PP izazvane UV zračenjem popravljaju putem NER-a,

najsvestranijeg mehanizma popravka DNA. Popravak izrezivanjem nukleotida popravlja široku lepezu lezija nukleotidnih baza, koje uzrokuju distorziju DNA uzvojnice, a posljedica su djelovanja okolišnih karcinogena, uključujući UV zračenje i zagađivače zraka. Ukoliko NER nije djelotvoran, opisane lezije ostaju nepopravljene što vodi ka bolestima poput: Xeroderme Pigmentosum (XP), Cockaynovog sindroma (CS) i trihotiodistrofiji (TTD). Ti poremećaji karakterizirani su učestalijom pojavom karcinoma u raznim organima, razvojnim i imunološkim defektima, neuronalnom i retinalnom degeneracijom te starenjem. Nadalje, pacijenti s defektnim NER-om imaju 2000-10000 puta veći rizik za razvitak raka kože i u ranijoj životnoj dobi, te im je rak kože na prvom mjestu po smrtnosti u usporedbi s drugim unutrašnjim tumorima. (8) Kako bi izbjegle takav nepovoljan ishod, stanice imaju nekoliko mehanizama, a jedan od njih je i translezijska sinteza DNA (TLS, od engl. *translesion DNA synthesis*) u kojem specijalizirane DNA polimeraze, nazvane TLS polimeraze, rade na prevladavanju replikacijskog bloka DNA (uzrokovanog nefunkcionalnim NER-om) ponovno pokrećući sintezu DNA na opstrukcijskim, odnosno oštećenim bazama. (9) Više riječi o NER-u biti će u daljnjem tekstu.

2.2. Reaktivni spojevi kisika

Svi aerobni oblici života ovisni su o kisiku kao pokretaču bazičnih kemijskih staničnih reakcija koje proizvode energiju i mnoštvo esencijalnih metabolita. Jedno od problematičnih svojstava potrošnje kisika svakako je njegov reaktivan potencijal koji dovodi do stvaranja ROS-a. (10) Reaktivni spojevi kisika je pojam koji se odnosi na nestabilne, reaktivne, djelomično reducirane derivate kisika. (11) Reaktivni spojevi kisika uključuju molekule poput superoksidnog aniona (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2) i hidroksilnog aniona (OH^-). (10-13) Endogeno ROS proizvode: mitohondriji (u kojima kisik služi kao terminalni akceptor elektrona u elektronskom transportnom lancu), nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH, od engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oksidaza (enzim koji se nalazi na membranama stanica), peroksisomi (sadrže enzime koji stvaraju vodikov peroksid) i endoplazmatski retikulum (proizvodi vodikov peroksid za vrijeme proteinskog savijanja). Reaktivni spojevi kisika mogu nastati i egzogeno primjerice nakon izlaganja ionizirajućem

zračenju ili prilikom uporabe kemoterapeutika. (12) Kako bi suzbile stvaranje ROS-a stanice su opremljene enzimatskim i neenzimatskim antioksidansima. No, kada intracelularne razine ROS-a nadmaše kapacitet antioksidansa stanice ulaze u stanje oksidativnog stresa, tijekom kojeg ROS može oštetiti makromolekule, poput proteina, lipida, ribonukleinske kiseline (RNA, od engl. *ribonucleic acid*) i DNA. Ukoliko novonastale lezije ostanu nepopravljene, one postaju prijetnja genomskom integritetu i mogu prouzročiti staničnu disfunkciju, smrt stanice ili njenu onkogenu transformaciju. (10)

Od raznih DNA lezija koje uzrokuje ROS najučestalija je 7,8-dihidro-8-okso-2'-deoksi-gvanin, skraćeno „8-okso-G“. (10, 12, 13) Visoke koncentracije 8-okso-G-a su primijećene pri upalnim patološkim promjenama, starenju, ubrzanom skraćivanju telomera i u neoplastičnom tkivu. Također, egzogeni poticatelji stvaranja ROS-a poput pušenja i prekomjerne konzumacije alkohola čine važan rizični čimbenik jer povećavaju stvaranje 8-okso-G-a za čak 50%. (13) Glavni problem s 8-okso-G pojavljuje se tijekom S-faze staničnog ciklusa, u kojoj stanica mora proizvesti točnu kopiju cijelog genoma kako bi obje stanice kćeri mogle naslijediti identične genetske informacije. U suprotnosti s mnogim DNA lezijama, 8-okso-G nije tzv. „*blocking*“ lezija koja bi zaustavila replikacijske rašlje, već 8-okso-G funkcionalno oponaša timin. To vodi ka formiranju promutagenog adenin (A):8-okso-G pogrešno spojenog para baza, umjesto nemutagenog C:8-okso-G para baza. Ukoliko te pogrešno spojene baze ostanu nepopravljene, jedna od stanica kćeri naslijedit će točkastu mutaciju na mjestu 8-okso-G (C:G -> A:T). Uz to što napada DNA baze direktno, ROS također može uzrokovati oksidaciju niza deoksinukleozid trifosfata (dNTP, od engl. *deoxyribose nucleotide triphosphate*) prisutnih u stanici. Doista, deoksigvanozin trifosfat (dGTP, od engl. *deoxyguanosine triphosphate*) je još skloniji oksidaciji od gvanina u DNA. Ukoliko je 8-okso-dGTP, imitirajući deoksitimidin trifosfat (dTTP, od engl. *deoxythymidine triphosphate*), umetnut nasuprot adenina, ciklusima replikacije ili popravka greškom može doći do zamjene adenina citozinom i time do točkaste mutacije (A:T -> C:G). (10) Oksidirane baze tipično prepoznaje i popravlja BER mehanizam. (10, 12) O BER mehanizmu biti će više riječi u nastavku rada.

3. MEHANIZMI POPRAVKA DNA

3.1. Popravak izrezivanjem baza (BER)

Popravak izrezivanjem baza je neophodan mehanizam za popravak oksidiranih DNA baza. Svi aerobni organizmi su kontinuirano izloženi reaktivnim spojevima kisika (ROS) nastalim kao nusprodukt respiracije, stoga su proteini uključeni u BER mehanizam evolucijski očuvani. Popravak izrezivanjem baza popravlja tzv. „*non-bulky*“ lezije i lezije koje ne uzrokuju distorziju heliksa, te uklanja i popravlja štetu pretrpljenu deaminacijom, alkilacijom ili oksidacijom. (14)

Popravak izrezivanjem baza može se podijeliti u korake koji uključuju: prepoznavanje lezije i eksciziju putem DNA glikozilaze koja tvori intermedijarno abazično mjesto, zatim inciziju posljedičnog abazičnog mjesta AP-endonukleazom 1 (APE1). Na poslijetku nastupa aktivnost fosfodiesteraze koja stvara 5' – deoksiribofosfat (dRP, od engl. *deoxyribosephosphate*)) fragment, te popunjavanje praznine DNA polimerazom i lijepljenje reza DNA ligazom koja ponovno uspostavlja kontinuitet fosfodiesterske okosnice DNA. (14) Ključan protein u BER-u koji regrutira ostale proteine uključene u popravak DNA je **poli(ADP-riboza) polimeraza 1 (PARP-1)**. Nakon pretrpljenog oksidativnog stresa, PARP-1 veže se efikasno na DNA lezije, što stimulira dodavanje ponavljajućih jedinica ADP-riboza, odnosno „PAR“ lanaca. Nakupljanje PAR lanaca, pogotovo na PARP-1, a i na njegovog homologa PARP-2, potiče novačenje BER komponenti poput XRCC1 (od engl. *x-ray repair cross-complementing protein 1*), APE1, Polimeraze (Pol) beta i DNA ligaze III. (15) Postoje dvije različite vrste DNA glikozilaza, monofunkcionalne glikozilaze (imaju samo aktivnost DNA glikozilaze) i bifunkcionalne glikozilaze (DNA glikozilaze koje vrše i cijepanje DNA). (16) U klasičnom putu glikozilaze uklanjaju oštećenu bazu putem reza N – glikozidne veze između ciljane baze i deoksiriboze i time ostavljaju tzv. „AP“ mjesto, odnosno mjesto na DNA lancu koje ne sadrži ni purinsku ni pirimidinsku bazu. Ovo netaknuto AP mjesto je dalje procesuirano ljudskom APE1 koja posljedično radi rez na 5' kraju AP mjesta i time stvara 3' – hidroksil i 5' – dRP kraj. 5' – dRP zatim uklanja dio Pol beta zadužen za lizu, a novi nukleotid na to

mjesto umeće dio Pol beta zadužen za transfer nukleotida. Uz pomoć proteina XRCC1, DNA ligaza III zapečaćuje rez i stvara novi popravljani produkt BER-a. Za usporedbu, bifunkcionalna glikozilaza pokreće BER mehanizam i uklanjajući oštećenu bazu i režući DNA na 3' mjestu AP mjesta (ili beta ili beta, delta eliminacijom) stvarajući jednostruki lom DNA. 3' – alfa, beta – nezasićeni aldehid nastao eliminacijom putem glikozilaze beta može biti uklonjen putem fosfodiesterazne aktivnosti APE1. Ukoliko bifunkcionalna glikozilaza iskoristi beta, delta – eliminacijski mehanizam, ostatna 3' fosfatna grupa biti će uklonjena polinukleotid kinazom (PNK). I APE1 i PNK ostavljaju 3' – hidroksilni kraj, te time omogućuju Pol beta popunjavanje praznine i ligaciju putem DNA ligaze III/ XRCC1, kao što je opisano iznad u klasičnom BER mehanizmu. (15-19)

Popravak izrezivanjem baza se može provesti i na drugi način. U tzv. „*long patch*“ BER-u, polimeraze (beta, delta i eta) popunjavanju prazninu jednim nukletidom i nastavljaju sintetizirati nukleotide pomičući DNA nizvodno od inicijalnog oštećenja, stvarajući fragment DNA. Endonukleaza FEN1, (od engl. *flap structure-specific endonuclease 1*) zatim uklanja fragment DNA ostavljajući prazninu te se 2-13 nukletida uklanjaju iz DNA. (15-19). Da li će se BER provesti prvo navedenim kratkim putem ili pak dugim putem ovisi o tome je li abazični šećer oksidiran ili reduciran, jer Pol beta ne može prepoznati modificirani šećer. Ukoliko je opisani šećer modificiran, nije ga moguće ukloniti putem Pol beta te se pokreće dugi put. (18)

Genetska stabilnost je od vitalne važnosti, ne samo za izbjegavanje bolesti, već i za preživljavanje same stanice. Popravak izrezivanjem baza mehanizam, koji je osnovno oruđe stanice za popravak oksidacijskog oštećenja, je toliko ključan za život da je vrlo teško povezati oštećenje individualnog proteina koji sudjeluje u mehanizmu razvitka određene bolesti, zbog toga što pokušaji da se stvore homozigotni „*knockout*“ modeli BER enzima brzo rezultiraju smrću organizma. (15) Također znamo da oštećenja popravljana BER mehanizmom mogu inicirati karcinogenezu ukoliko je više od jedne glikozilaze izbačeno u „*knockout*“ modelima miševa, te takvi miševi razvijaju tumore u ranoj dobi. Stoga zasad prikupljeni podaci ukazuju da su pojedinci s oštećenim BER mehanizmom pod povećanim rizikom za razvitak raka. Ovaj očiti zaključak je vodio prema velikom broju studija u kojima je ključno pitanje bilo stavlja li određena polimorfna varijanta u BER enzimima pojedince u skupinu s

povećanim rizikom za razvitak karcinoma. (18) Zasad, zaključci su nekonkluzivni, jedino je *MUTYH* gen iznimka, gdje su određene varijante povezane s razvitkom karcinoma kolona. (17, 18)

3.2. Popravak izrezivanjem nukleotida (NER)

Popravak izrezivanjem nukleotida mehanizam je najsvestraniji mehanizam popravka DNA. (20) Popravak izrezivanjem nukleotida uklanja široku lepezu lezija koje uzrokuju distorziju DNA heliksa, uključujući UV uzrokovane CPD-e, 6-4 PP-e i razne kemijski inducirane tzv. „*bulky*“ dodatke. (20, 21) NER mehanizam može se podijeliti na 4 osnovna koraka: prvi korak je prepoznavanje oštećenja, drugi korak obuhvaća inciziju na obje strane lezije i uklanjanje oligonukleotidnog fragmenta koji sadrži oštećenje, treći korak čini popunjavanje novonastale praznine kako bi se ponovno uspostavila DNA uzvojnica bez oštećenja i četvrti, posljednji korak je ligacija preostalog reza. (22, 23) Popravak izrezivanjem nukleotida se može odvijati na dva načina: *global genome* NER (GG-NER) ili *transcription-coupled* NER (TC-NER). GG-NER se može odviti na bilo kojem mjestu u genomu, dok je TC-NER odgovoran za ubrzan popravak lezija u aktivnim genima koji se nalaze na lancu koji se prepisuje. (20-25)

TC-NER prepoznaje i uklanja oštećenja s lanca kalupa i ovisi o aktivnosti RNA polimeraze 2, kao i proteinima Cockaynovog sindroma: Cockayne sindrom grupa A (CSA) i Cockayne sindrom grupa B (CSB). S druge strane, GG-NER uklanja greške prisutne u cijelom genomu i ovisi o faktorima koji prepoznaju leziju poput „*UV-damaged DNA-binding protein*“ (UV-DDB) kompleksa u kojem „*DNA damage-binding protein 2*“/Xeroderma pigmentosum grupa E (DDB2/XPE) dolazi u susret s lezijom, te Xeroderme pigmentosum grupe C(XPC). Kada oštećenje prepoznaju bilo TC-NER ili GG-NER, oba puta konvergiraju ka regrutaciji transkripcijskog faktora II H (TFIIH), koji sadržava helikaze Xeroderma pigmentosum grupa B (XPB) i Xeroderma pigmentosum grupa D (XPD) i pomoću njih otvara DNA heliks na mjestu oštećenja. Zajedno s Xeroderma pigmentosum grupom A (XPA), TFIIH kompleks pretražujući DNA traži mjesta koja blokiraju helikaze i time potvrđuje potrebu za popravkom DNA,

te regrutira endonukleaze Xeroderma pigmentosum grupa F (XPF) i Xeroderma pigmentosum grupa G (XPG) koje izrezuju oštećeni lanac. Posljedično nastaje rupa u jednolančanoj DNA (ssDNA, od engl. *single-stranded DNA*), koja se popunjava sintezom DNA i ligacijom. (20-25)

Defekti u NER mehanizmu su povezani s grupom autosomno recesivnih bolesti poput: Xeroderme pigmentosum, Cockaynovog sindroma i fotosenzitivnog oblika trihotiodistrofije. Svaki od ovih poremećaja karakteriziran je iznimnom osjetljivošću na UV zračenje, te razvijanjem tumora, a u nekim slučajevima uočena je i neurološka disfunkcija. (22)

3.3. Popravak pogrešno sparenih baza (MMR)

Popravak pogrešno sparenih baza je evolucijsko visoko očuvani stanični proces, koji uključuje brojne proteine zadužene za prepoznavanje i posljedično popravak pogrešno sparenih baza nastalih tijekom DNA replikacije, genetske rekombinacije ili nakon kemijskog, odnosno fizikalnog oštećenja. Četiri su ključna gena otkrivena do danas: mutL homolog 1 (*MLH1*), mutS homolog 2 (*MSH2*), mutS homolog 6 (*MSH6*) i *postmeiotic segregation increased 2 (PMS2)*, nazvani tako zbog svoje homolognosti MMR genima *E. coli*. (26)

Proteini MSH2 i MSH6 formiraju heterodimerni kompleks mutS (od engl. *mutator S*) alfa koji je uključen u inicijalno prepoznavanje pogrešno sparenih baza i nakon toga inicira DNA popravak, dok mutL (od engl. *mutator L*) homolozi MLH1 i PMS2 zajedno čine heterodimer mutL alfa zadužen za organiziranje drugih potrebnih proteina. (22, 26) Prepoznato je da svoju glavnu ulogu MMR upravo ima u stanicama koje se dijele, gdje djeluje tako da suprimira genetsku nestabilnost proizašlu iz replikacijskih grešaka i time spriječi posljedičnu karcinogenezu. (22) Ukoliko MMR sustav razvije grešku u funkcioniranju dolazi do određenog fenotipa nazvanog mikrosatelitna nestabilnost (MSI, od engl. *microsatellite instability*). (22, 26, 27) U genomu se nalazi više od 100 000 mjesta kratkih sekvenci tandemskog ponavljanja (mono-, di-, tri- ili tetranukleotidnih ponavljanja) koja su osobito sklona pogreškama tijekom replikacije i stoga ovise o popravku putem MMR sustava. (27) Uzrok

defektnog MMR sustava je drugačiji ovisno o tome da li je tumor sporadičan ili je rezultat autosomno dominantnog poremećaja, nazvanog Lynch sindrom. (26)

Lynch sindrom je posljedica mutacije zametne loze u opisanom MMR sustavu, a zahvaćeni bolesnici su skloni mnogim vrstama tumora, ponajviše nepolipoznom kolorektalnom karcinomu i karcinomu endometrija. (26, 27) Više od 1500 varijanti mutacija Lynch sindroma je prepoznato, a većinu čine delecije u *MLH1* (50%) i *MSH2* (39%) gena. (27) Sporadični tumori pak, u kojima je detektiran defektan MMR sustav, češće nastaju zbog epigenetskih promjena, osobito zbog metilacije 5'-citozin-fosfat-gvanin-3' (CpG, od engl. *5'-cytosine-phosphate-guanine-3'*) otoka unutar promotora *MLH1*, što vodi ka posljedičnom utišavanju *MLH1* gena. (22, 26, 27)

3.4. Nehomologno spajanje krajeva DNA (NHEJ)

Nehomologno spajanje krajeva DNA je najučestaliji mehanizam popravka dvostrukih lomova DNA i obuhvaća popravak gotovo svih dvostrukih lomova izvan S i G2 faze (28), dok je homologna rekombinacija zadužena za S i G2 fazu kada je sestrinska kromatida dostupna. (29) Od svih tipova oštećenja DNA, dvostruki lomovi su posebice pogubni jer mogu rezultirati insercijama, delecijama ili kromosomskim translokacijama, koje su početni korak nastanka brojnih tumora. Dvostruki lomovi DNA mogu prouzročiti egozgeni čimbenici, primjerice ionizirajuće zračenje ili ROS, a mogu nastati i endogenim mehanizmima poput pogrešaka u DNA replikaciji ili pogrešnom aktivacijom DNA enzima. (28, 30) Također, mogu biti uzrokovani i jatrogeno putem ionizirajućeg zračenja korištenog u radioterapiji, te lijekova poput bleomicina, inhibitora topoizomeraze 1 kamptotecina, te inhibitora topoizomeraze 2 etopozida. (31) Važno je napomenuti kako je homologna rekombinacija učinkovitija od NHEJ pri popravku dvostrukih lomova DNA i održavanju genomske stabilnosti jer koristi homologni kalup, dok je NHEJ skloniji pogreškama. (32, 33, 34) Štoviše NHEJ često može rezultirati malim delecijama i/ili kromosomskim preslagivanjima i time uvelike doprinijeti genomskoj nestabilnosti. (33) U nekim slučajevima dvostruki lomovi mogu biti dio fiziološkog procesa, kao što je V(D)J rekombinacija putem NHEJ-a u imunološkom sustavu (28-30) ili mejoza putem HR puta u reprodukciji. (35, 36)

Koja god bila njihova etiologija dvostruki lomovi moraju se popraviti tako da slomljeni kromosom pretrpi nikakvu ili vrlo malu štetu. Pojam „nehomologan“ moguće je pogrešno protumačiti u smislu da je proces koji uključuje nehomolognu rekombinaciju potpuno neovisan o homolognom DNA nizu, no taj proces ustvari koristi do 4 parova baza što ga čini mikrohomolognim za razliku od procesa homologne rekombinacije, koja koristi nekoliko stotina homolognih parova baza. (28)

Nehomologno spajanje krajeva DNA započinje detekcijom dvostrukog loma Ku heterodimerom (Ku70/80) i vezanjem Ku heterodimera za DNA krajeve nastale nakon dvostrukog loma DNA. Vezani Ku heterodimer zatim angažira katalitičku podjedinicu DNA-ovisne protein kinaze (DNA-PKcs, od engl. *DNA-protein kinase, catalytic subunit*) zajedno s endonukleazom Artemis, koja je ključna u V(D)J rekombinaciji. Nukleaze, pa tako i Artemis, služe za resekciju nekompatibilnih DNA krajeva nastalih nakon loma DNA. Ukoliko se nukleazama ne odstrane nekompatibilni DNA krajevi, posljednji korak tj. ligacija neće biti moguća. Kako bi se endonukleaza Artemis aktivirala kompleks DNA-PKcs se mora autofosforilizirati. Nakon što su se obradili krajevi, polimeraze iz Pol X obitelji polimeraza, polimeraza μ i polimeraza lambda umeću u DNA lanac dNTP ili ribonukleozid trifosfat (rNTP, od engl. *ribonucleoside triphosphate*), a svi umetnuti ribonukleotidi će kasnije biti uklonjeni BER-om. Naposljetku, DNA ligaza IV u kompleksu s „*X-ray repair cross-complementing 4*“ (XRCC4) lijepi krajeve oštećene DNA uz pomoć drugih faktora, uključujući „*XRCC4-like factor*“ (XLF, poznatim i kao Cernunnos). (28-30, 37)

Pacijenti s određenim deficitarnim NHEJ faktorima, poput Artemis, DNA ligaze IV i XLF skloni su razvitku teške kombinirane imunodeficijencije (SCID, od engl. *severe combined immunodeficiency*), zbog greške u V(D)J rekombinaciji. Također često razvijaju tumore, ubrzano stare, te su vrlo radiosenzitivni i pokazuju znakove mikrocefalije. (22)

3.5. Homologna rekombinacija

Homologna rekombinacija je esencijalni DNA mehanizam popravka, koji koristi

genetske informacije koje se nalaze na sestrinskim kromatidama ili na homolognim kromosomima. Glavna uloga HR jest popravak dvostrukih lomova DNA u somatskim stanicama, te proces mejoze u spolnim stanicama. (31, 38, 39) U ovom radu ćemo se fokusirati na ulogu HR u somatskim stanicama.

Kada god DNA pretrpi oštećenje aktivira se već spomenuti DDR mehanizam, čija uloga jest otkrivanje DNA lezija i pokretanje DNA popravilačkih mehanizama. Upravo na taj način započinje i proces HR. DDR signalni put primarno reguliraju Serin/Treonin proteinske kinaze koje spadaju u „*phosphatidylinositol3-kinase-like protein kinase*“ (PIKK) obitelj, koja uključuje DNA-PK, spomenutu u NHEJ, te *Ataxia Teleangiectasia Mutated* (ATM) i *ATM-related* (ATR) kinaze uključene u HR put. (32, 39) Nakon što se dogodio dvostruki lom DNA daljnju signalizaciju inicira vezanje Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) kompleksa na slomljene krajeve DNA. MRN kompleks ima nekoliko uloga. Prvo, pomaže ATP-ovisnu endonukleaznu aktivnost blizu mjestu dvostrukog loma, što vodi ka kratkoj 3'-5' resekciji prema DNA kraju čime se stvara 3' kraj. Drugo, potiče regrutaciju endonukleaze Exo1 ili Bloom (BLM) kompleksa kako bi se odvila velika 5'-3' DNA resekcija. Treće, dodaje replikacijski protein A (RPA), koji se regrutira na mjesta zaustavljanja replikacijskih rašlji na jednolančani dio DNA, te aktivira ATM. ATM regulira stotine supstrata koji naposljetku dovode do zaustavljanja staničnog ciklusa i pokretanja homologne rekombinacije. ATM redovno prati aktivnost ATR i „*ATR interacted protein*“ (ATRIP), koji zajedno utječu na signalizaciju stvaranja dugih dijelova ssDNA. Proces stvaranja dugih dijelova ssDNA koordinira RPA, te ujedno i štiti cjelovitost novonastale ssDNA. (39)

Ključan protein u pokretanju invazije novonastale ssDNA na homologni slijed DNA jest rekombinaza RAD51. Isprva, otkriven u plijesni kao RecA, ovaj protein mora se na ATP-ovisan način vezati na novonastalu ssDNA s kojom tvori RAD51-ssDNA nukleoproteinski filament, no tu radnju inhibira RPA. Kako bi RAD51 uspješno istisnuo RPA potreban je cijeli niz medijatora. Najvažniji od njih je „*breast cancer type 2*“ (BRCA2). Vezanje BRCA2 proteina složen je proces u kojem glavnu ulogu imaju „*partner and localizer of BRCA2*“ (PALB2) i „*breast cancer type 1*“ (BRCA1) protein. (31, 35, 38-40)

Gen *BRCA1* nalazi se na kromosomu 17 i prvi puta je kloniran 1994. godine.

Pokazalo se kako je BRCA1 multifunkcionalni protein koji ulazi u interakciju s brojnim proteinskim partnerima i igra esencijalnu ulogu u procesima poput DDR, zaustavljanja staničnog ciklusa, apoptozi, genetskoj nestabilnosti, aktivaciji transkripcije i tumorogenezi. (33, 41) U *BRCA1* genu najaktivnije su 3 domene: N-kraj RING domena kodirana egzonima 2-7, regije egzona 11-13, te C-kraj kodiran egzonima 16-24. (41) RING domena *BRCA1* gena važna je zbog suradnje s RING domenom „*BRCA1-associated RING domain protein 1*“ (BARD1). Heterodimer BRCA1-BARD1 je ključan za suradnju s PALB2 proteinom o kojem ovisi vezanje BRCA2 proteina. (32, 33, 41) BRCA1 ima vodeću ulogu u ovom kaskadnom nizu, jer disrupcija BRCA1 dovodi do poremećaja u PALB2, BRCA2 i RAD51. Oštećenje PALB2 dovodi do poremećaja u BRCA2 i RAD51, a BRCA 2 dovodi do poremećaja samo u RAD51. Naravno, svaka od tih patoloških promjena vodi u nedostatnu homolognu rekombinaciju. (42) Regije egzona 11-13 surađuju s brojnim proteinima poput retinoblastom proteina (RB), c-Myc, RAD50 i RAD51. Također ta regija je ključna u pokretanju MRN kompleksa opisanog ranije. C-terminalni kraj je zadužen za procese povezane s ATM i ATR koji zajedno s „*checkpoint kinase 1/checkpoint kinase 2*“ (CHEK1/CHEK2) u slučaju oštećenja DNA fosforiliraju BRCA1. C-kraj se dovodi i u vezu s regulatorima staničnog ciklusa p53 i „*BTB and CNC homology 1*“ (BACH1), kao i s proteinima DDR-a poput CtIP i CCDC98. (33, 41) Valja navesti kako su BRCA1 i BARD1 detektirani i u mitohondriju, što ukazuje na moguću ulogu BRCA1 i u reguliranju popravka mitohondrijske DNA. (41)

Mutacije u genima *BRCA1*, *BRCA2* i *PALB2* povezane su s nasljednim karcinomima dojke i jajnika (32, 33, 41), te s povećanim rizikom za karcinom prostate, gušterače, želudca, grkljana i jajovoda. Također, pojedinci s *BRCA2* mutacijom razvijaju sindrom Fanconijeve anemije, koju karakterizira anemija, skeletalne abnormalnosti i sklonost razvitku skvamoznih karcinoma. Važno je napomenuti kako je Fanconijeva anemija autosomno recesivna bolest, odnosno oba alela moraju biti mutirana kako bi se bolest manifestirala. (32, 42) Više o solidim tumorima uzrokovanim nedostatnom homolognom rekombinacijom biti će u nastavku.

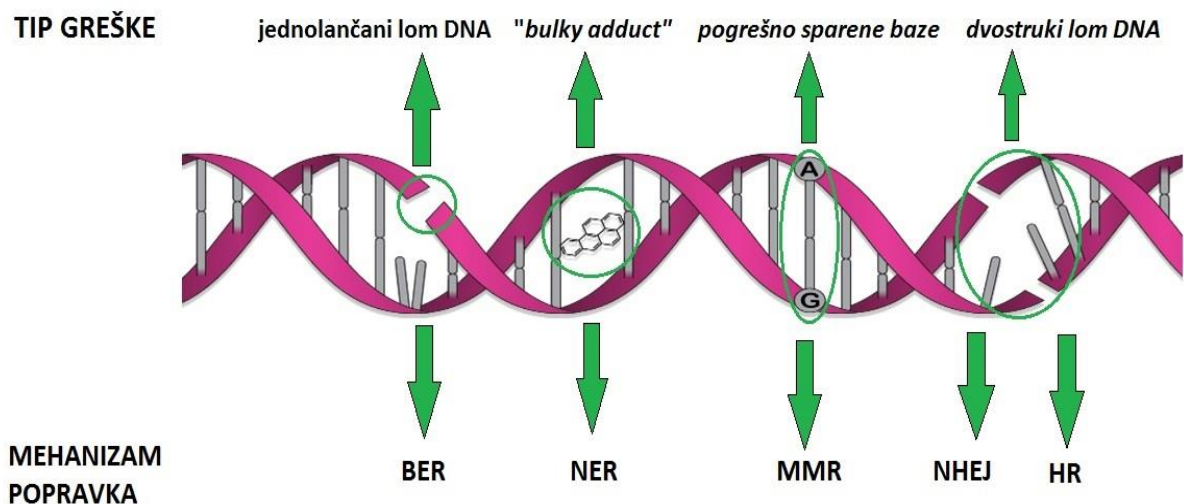
Jednom kada Rad51 uspješno pomoću medijatora istisne RPA sa ssDNA, Rad51 filament mora pronaći homolognog donora kako bi se pokrenula sinteza DNA. Da bi se to dogodilo homologna dvolančana DNA (dsDNA, od engl. *double stranded*

DNA) mora se destabilizirati i otvoriti svoj heliks što Rad51 filamentu omogućuje potragu za homolognom sekvencom DNA. (31, 35, 38, 40) Mikrohomologna područja od svega 8 nukleotida dovoljna su za poticanje trajanja novonastalih Rad51-ssDNA-dsDNA kompleksa. (38) Nakon što pronađe homolognu sekvencu, kompleks se stabilizira i tvori „sinaptički kompleks“. (31, 38)

Ključan međukorak u procesu homologne rekombinacije je formiranje D-petlje. D-petlja sadrži tzv. „*heteroduplex DNA*“ (hDNA), koja se može opisati kao regija unutar D-petlje koja sadrži invadirajuću heterodimer Rad51-ssDNA isprepleten s komplementarnom donorskom DNA. (31, 35, 38, 40) Minimalno samo 3' kraj invadirajuće Rad51-ssDNA je potreban u hDNA kako bi se kreirala klica za DNA sintezu, no hDNA može biti i nekoliko stotina parova baza dugačka. (32) Nakon uspješnog formiranja D-petlje DNA polimeraza delta sintetizira novu DNA po uzoru na homologni lanac. (31, 35, 38, 40) Valja napomenuti kako sinteza nove DNA na invadirajućem lancu mora biti dovoljno „dugačka“ kako bi se nakon raspuštanja D-petlje ssDNA mogla uspješno slijepiti s drugim krajem dvostrukog loma. (38)

Razrješenje D-petlje može se odvijati bez ili uz posljedični crossing-over. (31, 35, 38, 40) U spolnim stanicama, tijekom mejoze, mora se dogoditi barem jedan crossing-over, da se osigura uredno razdvajanje homolognih kromosoma u prvoj mejotičkoj diobi. (35, 36) No, u somatskim stanicama tijekom mitoze, crossing-over između homolognih kromosoma može rezultirati gubitkom heterozigotnosti na segmentu kromosoma distalno od mjesta crossing-overa, što je važan mehanizam u nastanku određenih tipova tumora. U primarnom putu kod somatskih stanica novosintetizirana DNA disocira iz D-petlje i prijanja za drugi kraj dvostrukog loma bez crossing-overa što se naziva „*synthesis-dependent strand annealing*“ (SDSA). U suprotnost, manje učestaliji put u somatskim stanicama uključuje stvaranje dvostrukih Hollidayevih spojeva (dHJ, od engl „*double-Holliday junction*“), koji nastaju kada oba kraja dvostrukog loma simultano invadiraju homologni niz DNA ili kada kraj koji nije uključen u invadiranje homolognog DNA niza prijanja na donorsku DNA na mjesto oslobođeno formiranjem D-petlje. Važno je napomenuti kako formirani dHJ mogu biti razriješeni s ili bez crossing-overa. Razrješenje dvostrukog Hollidayeva spoja nastaje djelovanjem enzimskog kompleksa BLM/topoizomeraza 3 alfa (TOP3alfa)/„*RecQ-mediated genome instability protein 1*“ (RMI1), čiju premećenu aktivnost nalazimo,

zbog mutiranog gena *BLM*, u Bloomovom sindromu, posljedica je povećana razmjena genetskog materijala i genomska nestabilnosti. (31, 35, 38, 40) Bloomov sindrom je rijedak, autosomno recesivan genetski poremećaj karakteriziran niskim rastom, eritematoznim osipom nakon izlaganja suncu i povećanoj sklonosti razvitka karcinoma. (43) Važno je napomenuti kako pacijenti oboljeli od Bloomovog sindroma razvijaju sve tipove karcinoma u prosjeku prije nego u prosječnoj populaciji, moguć je razvoj simultanih primarnih karcinoma, te tipovi i sjela karcinoma su vrlo raznolika, uključujući karcinome dišnog sustava, probavnog sustava, genito-urinarnog sustava, karcinome kože, karcinome dojke, limfome, leukemije i rijetke pedijatrijske tumore poput retinoblastoma, osteosarkoma i Wilmsovog tumora, a prosječna starost pri dijagnozi karcinoma iznosi svega 23 godine. (44)



Slika 1. Prikaz mehanizama popravka molekule DNA ovisno o tipu DNA oštećenja. prema: Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. Nature. 2012;481(7381):287-294. (84) i (1)

4. TUMORI UZROKOVANI NEDOSTATNOM HOMOLOGNOM REKOMBINACIJOM

4.1 Tumori dojke

Tumori dojke su najprevalentniji maligni tumor u žena u cijelom svijetu. (45) Prema Hrvatskom registru za rak, tumori dojke zauzimaju prvo mjesto u žena po incidenciji s 2767 novooboljelih u 2017. godini, što čini 25% svih novootkrivenih tumora u žena u 2017. godini. (46) Iako je tumor dojke u cijelom svijetu najučestaliji tumor u žena, petogodišnje preživljenje bolesnica uvelike se razlikuje među državama, pa u razvijenim državama iznosi oko 80% zbog konstantnog ulaganja u probir, odnosno mamografiju te suvremenih metoda liječenja, dok u zemljama u razvoju ta brojka nerijetko pada i ispod 40%. (47)

Iako vrlo heterogena grupa tumora, karcinomi dojke mogu se podijeliti na molekularne podtipove prema ekspresiji estrogenskog receptora (ER), progesteronskog receptora (PR), koji zajedno čine hormonske receptore (HR), te prema ekspresiji receptora za humani epidermalni faktor rasta (HER2, od engl. „*human epidermal growth factor receptor 2*“). (48, 49) 4 glavna molekulska tipa su: Luminalni A (HR+/HER2-), Luminalni B (HR+/HER2+), HER2 obogaćeni (HR-/HER2+) i trostruko negativni (HR-/HER2-). (49) Podjela na molekularnoj razini omogućila je ciljanu terapiju, primjerice hormonsku (tamoksifen) i HER2 ciljanu (trastuzumab), te time poboljšala ishode liječenja. (48)

Tablica 1. Molekularni podtipovi karcinoma dojke

VRSTA TUMORA	HORMONSKI RECEPTORI	HER2 RECEPTORI
Luminalni A	+	-
Luminalni B	+	+
HER2 obogaćeni	-	+

Trostruko negativni	-	-
---------------------	---	---

Danas poznajemo mnoge faktore rizika poput: spola, dobi, reproduktivnih faktora, izloženosti estrogenu, pozitivne obiteljske anamneze i životnog stila, koji pridonose vjerojatnosti razvitka tumora dojke. Spol je glavni faktor, što pokazuje činjenica da muškarci razvijaju tumor dojke 100 puta rjeđe od žena. (47, 50) Osim spola, dob je najvažniji faktor rizika za razvitak tumora dojke. U 2016. godini 99. 3% žena umrlih u Americi od karcinoma dojke bilo je starije od 40 godina, stoga važnost mamografskog probira dolazi do izražaja nakon što žena napuni 40 godina. (50) Dojka je estrogen osjetljivi organ. (47) Endogeni i egzogeni estrogene povećavaju rizik nastanka tumora dojke. Endogeni estrogen se većinom proizvodi u jajniku premenopauzalnih žena, stoga ovariektomija može umanjiti rizik razvitka tumora dojke. (50) U postmenopauzalnih žena estrogen nastaje primarno u masnom tkivu pomoću enzima aromataze, a kako dojka sadrži mnogo masnih stanica ne iznenađuje činjenica da se estrogene u dojci postmenopauzalnih žena nalaze u većim koncentracijama u usporedbi s ostatkom tijela. Također možemo uvidjeti kako pretilost igra važnu ulogu u povećanju rizika za razvitak karcinoma dojke. (47) Glavni izvor egzogenih estrogene su oralni kontraceptivi u premenopauzalnih žena, te hormonska nadomjesna terapija u postmenopauzalnih žena. (50) Rana menarha, kasna menopauze, te nuliparitet pokazali su se rizičnim čimbenicima kao i povećan unos masti i alkohola koji utječu na podizanje razina estrogene u krvi. (47, 50) Pušenje zasad nije čvrsto povezano s razvitkom karcinoma dojke. (50) Nadalje, karcinom u jednoj dojci 4 puta povećava rizik razvitka karcinoma u drugoj dojci, a pacijenti s osobnom anamnezom karcinoma jajnika, endometrija ili kolona imaju 1-2 puta veći rizik razvitka karcinoma dojke. (47)

Gotovo četvrtina karcinoma dojke povezana je s pozitivnom obiteljskom anamnezom. (50) Ne postoji jedinstvena definicija hereditarnog raka dojke, ali neki od prihvaćenih kriterija su: barem 3 karcinoma dojke i/ili jajnika u obitelji, dva karcinoma dojke u bliskih srodnika, od kojih je jedan dijagnosticiran prije 50. godine, dva karcinoma dojke u obitelji dijagnosticiranih prije 40. godine, karcinom dojke u muškaraca s obiteljskom anamnezom karcinoma jajnika ili ženskog karcinoma dojke

u ranoj dobi, rak dojke u Ashkenazi židovskoj zajednici, te rak dojke i jajnika u iste pacijentice. (51)

Velika većina hereditarnih slučajeva raka dojke povezana je s visoko penetrantnim, no rijetkim genima. U zadnjih godina dodatno su otkriveni geni srednje i niske penetrantnosti koji također mogu dovesti do pojave obiteljskih karcinoma. Prvi visoko penetrantni gen otkriven 1990. godine bio je *BRCA1*, a ubrzo je 1994. godine slijedilo otkriće *BRCA2* gena. (51) Dosad je otkriveno preko 1800 mutacija *BRCA1* gena i oko 2000 mutacija *BRCA2* gena. (52) 16% svih nasljednih karcinoma dojke može se povezati s mutacijama u zametnoj lozi gena *BRCA1* i *BRCA2*. (45, 51) Fenotip opisan u *BRCA* mutacija u zametnoj lozi naziva se Sindrom obiteljskog karcinoma dojke/jajnika Hereditary Breast/Ovarian Cancer (HBOC) sindrom. Važno je napomenuti da postoje pacijenti s istim fenotipom, iako su negativni na *BRCA* mutacije. Žene nosioci *BRCA1* ili *BRCA2* mutacije u zametnoj lozi imaju kumulativni rizik od 50-85% za razvijanje karcinoma dojke, dok za karcinom jajnika taj rizik iznosi 10-40% za *BRCA1* i 10-20% za *BRCA2* mutaciju.(51) *BRCA* mutacije u zametnoj lozi mogu biti prisutne u različitim vrstama karcinoma dojke, no posebno su prevalentne u trostruko negativnih karcinoma (HR-/HER2-), povezanim sa znatno lošijim ishodom u usporedbi s hormonski pozitivnim ili HER2 pozitivnim karcinomima. 15-20% žena u kojih je dijagnosticiran trostruko negativni karcinom dojke imaju mutacije *BRCA* gena u zametnoj lozi. Osim mutacija u zametnoj lozi, *BRCA* geni mogu biti i sporadično mutirani. Bili *BRCA* geni mutirani u sporadičnim slučajevima ili postoji mutacija u zametnoj lozi, tumori koji sadrže te mutacije dijele slična patološko-molekularna svojstva, poput nedostatne homologne rekombinacije, što može biti iskorišteno u liječenju istih. (53)

Ženama, koje nose mutaciju *BRCA* gena u zametnoj lozi, može biti predložena i redukcija rizika putem kirurškog uklanjanja jajnika i jajovoda, ukoliko su završile s rađanjem, što smanjuje rizik za razvitak raka jajnika i rizik za razvitak raka dojke ukoliko je uklanjanje učinjeno prije menopauze. Profilaktička mastektomija također ulazi u mjere prevencije. (51)

Osim u visoko penetrantnim genima, mutacije u srednje penetrantnim genima koji također sudjeluju u DNA popravljачkim putevima i surađuju s *BRCA* genima

poput *CHEK2*, *BACH1*, *ATM* i *PALB2*, povisuju rizik nastanka karcinoma. Prema studijama na populaciji žena u Ujedinjenom Kraljevstvu, mutacije u srednje penetrantnih gena su zaslužne za 3% obiteljskih karcinoma dojke. Zbog činjenice da je rizik u srednje penetrantnih gena manji nego u visoko penetrantnih gena, probir i preventivne intervencije su slabo definirane. (51)

Pomoću novih metoda sekvenciranja genoma pojavila se mogućnost paralelnog sekvenciranja brojnih gena, stoga danas proučavamo i utjecaj polimorfizma jednog nukleotida, koji se mogu nalaziti i u kodirajućoj i u nekodirajućoj regiji genoma. Ukoliko se nalaze u nekodirajućim regijama zahtjevno je odrediti koji gen reguliraju i na koji način. (51)

4.2 Tumori jajnika

Svake godine 225 tisuća žena diljem svijeta oboli od raka jajnika. (54) Samo u Hrvatskoj u 2015. godini od raka jajnika oboljela je 449 žena. (46) U 75-80% slučajeva rak jajnika dijagnosticiran je u uznapredovalom stadiju, stoga je petogodišnje preživljenje pacijentica unatoč suvremenim načinima liječenja svega 40%. (55) Glavni krivac tome su nedovoljno efikasne metode rane detekcije, čemu doprinosi nepovoljan anatomske položaj jajnika. (54)

Pojam tumor ovarija obuhvaća heterogenu grupu tumora različitih molekularnih i kliničkih svojstava. Procjenjuje se kako 90% tumora jajnika čine tumori epitelnog porijekla, dok samo 10% čine tumori specijaliziranih stromalnih stanica i tumori nastali iz zametnih stanica. (54) Prema histološkoj slici postoje 4 glavna tipa epitelnog tumora jajnika: serozni, endometrioidni, klarocelularni i mucinozni. (54, 56, 57) Najčešći tip epitelnog tumora jajnika je serozni tumor visokog stupnja malignosti (HGSOC, od engl. *high-grade serous ovarian cancer*), koji čini 70-75% svih epitelnih tipova tumora jajnika. (58, 59) Nažalost, HGSOC je također jedan od najagresivnijih tipova tumora jajnika, što uz neizražavanje specifičnih simptoma, te posljedično kasnu dijagnozu, dovodi do loše prognoze. (4)

U gotovo trećine tumora ovarija može se pronaći mutacija u jednom ili više gena homologne rekombinacije (*BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BARD1*, *BACH1*, *CHEK1*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD51*). (55, 59) Posebno skloni mutacijama u genima homologne rekombinacije su HGSOE u kojih je 15-20% svih HGSOE pozitivno na *BRCA* mutacije, a 50% pozitivno na mutacije u drugim genima homologne rekombinacije. (58)

Rano otkrivanje tumora jajnika pomoću ultrazvučnog pregleda i određivanje razine CA-125 antigena nije polučilo zadovoljavajuće rezultate. Sekvenciranjem genoma i određivanjem mutacije *BRCA* gena u zametnoj lozi moguće je prevenirati rak jajnika radikalnim uklanjanjem jajnika i jajovoda. Zasad su preporuke o radikalnom uklanjanju za nositeljice *BRCA1* mutacije u zametnoj lozi nakon 35 godine ili po završavanju perioda rađanja djece, te za nositeljice *BRCA2* mutacije u zametnoj lozi nakon 50. godine. (59)

4.3. Tumori prostate

Tumor prostate je najčešće dijagnosticirana novotvorina u muškaraca u Hrvatskoj. Prema podacima Registra za rak u 2017. godini u Hrvatskoj je dijagnosticirano 2794 slučaja tumora prostate, što je 21% svih dijagnosticiranih tumora u muškaraca u 2017. godini. (46)

Kao i u pojedinih pacijenta s tumorima dojke i jajnika dio tumora prostate također nastaje zbog mutacija u genima zaduženim za proces homologne rekombinacije. (60)

Takvi pacijenti razvijaju tumore višeg zbroja na Gleason ljestvici, češće su tumori uznapredovali pri trenutku dijagnoze i imaju lošiju prognozu u odnosu na pacijente bez takvih mutacija. (61) Mutacije u *BRCA2* genu nalaze se u 1.2%-3.2% slučajeva tumora prostate (62), dok su mutacije u *BRCA1* genu nađene u oko 1% slučajeva. (60) U nekih etničkih grupa, kao u već prije spomenutih Ashkenazi židova, *BRCA* mutacije su učestalije i čak 5.2% tumora prostate u Ashkenazi židova sadrži *BRCA* mutacije. (62) Mutacije *BRCA2* gena u stanicama zametne loze povećavaju rizik razvitka tumora prostate za oko 8 puta (60, 62), dok *BRCA1* mutacije u stanicama

zametne loze nose četverostruko veći rizik za razvitak tumora prostate. (62) I drugi mutirani geni zaduženi za proces homologne rekombinacije, poput *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD51*, su pronađeni u tumorima prostate no njihov klinički značaj još nije definitivno određen. (60, 61)

4.4. Tumori gušterače

Tumor gušterače bolest je s vrlo nepovoljnom prognozom. (63) Prema Registru za rak u 2017. godini dijagnosticirano je 799 novih slučajeva novotvorina gušterače u Hrvatskoj. (46) Najčešći histološki tip je duktalni adenokarcinom na kojeg otpada 95% novotvorina gušterače. (62, 63) Naime, petogodišnje preživljenje 1A stadija dukalnog adenokarcinoma je svega 14%, a u 4 stadiju ne prelazi 1%. Zbog tako nepovoljne prirode tumora gušterače do izražaja dolaze analize karcinogeneze na molekularnoj razini. (63)

Gotovo 5-10% oboljelih ima pozitivnu obiteljsku anamnezu dukalnog adenokarcinoma, te dodatno je ustanovljena povezanost dukalnog adenokarcinoma s pojavom tumora jajnika i dojke u obitelji. (63) Najčešće mutacije povezane s obiteljskom pojavom tumora gušterače su *BRCA1* i *BRCA2* mutacije. (62,63) Pojedinci s *BRCA1* mutacijom imaju relativan rizik razvitka tumora gušterače 3.1, dok je on gotovo dvostruk u nositelja mutacije *BRCA2* gena i iznosi 6.6. (63) Također su u slučajevima obiteljskog pojavljivanja dukalnog adenokarcinoma pronađene mutacije i u drugim manje penetrantnim genima zaduženih za proces homologne rekombinacije poput *ATM* i *PALB2* gena, no njihovo kliničko značenje još nije definirano. (62)

5. DIJAGNOSTIKA NEDOSTATNE HOMOLOGNE REKOMBINACIJE

Tumori koji se pojavljuju u obiteljima zbog mutacije *BRCA* gena u lozi zametnih stanica ili mutacije drugih gena povezanih s procesom homologne rekombinacije, kao i sporadični tumori u kojih su nađene mutacije gena zaduženih za proces homologne

rekombinacije, sadrže veliku količinu kromosomskih aberacija i pokazuju značajnu genomsku nestabilnost. (64) Fenotip sporadičnih tumora koji dijele fenotip s tumorima nastalim zbog mutacija *BRCA* gena u stanicama zametne loze naziva se „*BRCAness*“ ili točnije „*BRCAlessness*“. (64, 65) „*BRCAness*“ fenotip se definira kao fenotip s mutacijama u drugim genima zaduženim za homolognu rekombinaciju i/ili epigenetskim utišavanjem *BRCA* gena i/ili post-translacijskim promjenama proteina zaduženih za homolognu rekombinaciju. (64,66) Ovdje valja spomenuti i *EMSY* gen koji nije direktno zadužen za proces homologne rekombinacije, ali utječe na funkciju *BRCA2* gena. (67) Njegova amplifikacija dovodi do utišavanja *BRCA2* gena, a pronađena je u 20% HGSOV. (68) Važnost utvrđivanja „*BRCAnessa*“ proizlazi iz činjenice kako su i tumori koji pokazuju „*BRCAness*“ fenotip i tumori s mutacijama *BRCA* gena u stanicama zametne loze osjetljivi na terapiju spojevima platine i PARP inhibitorima.(64-70)

Kako je ranije spomenuto, opisani tumori izražavaju značajnu genomsku nestabilnost proizašlu iz nedostatne homologne rekombinacije, te se to svojstvo može iskoristiti u njihovoj dijagnostici. Genomska nestabilnost, odnosno tzv. „genomski ožiljak“, može se mjeriti pomoću biomarkera dobivenih komparativnom genomskom hibridizacijom na array-u (aCGH od engl. „*array comparative genomic hybridization*“). (66) Dosad su 3 takva biomarkera razvijena: „*loss of heterozygosity (LOH) score*“, „*telomeric allelic imbalance (TAI) score*“ i „*large-scale state transitions (LST) score*“. (64, 69, 70) LOH se definira kao gubitak jednog roditeljskog alela, TAI označava različitu ekspresiju 2 alela s ili bez promjena u količini genetskog materijala, a LST karakterizira lom kromosoma veći od 10 mega baza između susjednih regija. (64) Sva 3 biomarkera pojedinačno visoko koreliraju s promjenama u *BRCA* i ostalim genima koji sudjeluju u procesu homologne rekombinacije, te sa osjetljivošću tumora na soli platine i PARP inhibitore (69, 70), no najbolje rezultate daje njihova kombinacija, odnosno tzv. „*homologous recombination deficiency (HRD) score*“. (70)

Tumore općenito karakterizira genomsku nestabilnost, zbog čega je teško razlučiti koje greške u genomu dovode do nedostatne homologne rekombinacije, stoga je specifičnost ovakvog testa zasad nezadovoljavajuća. (66) Nadalje, određivanjem HRD score-a se ne može detektirati ponovna uspostava funkcionalne

homologne rekombinacije, koja se razvija kao oblik rezistencije na terapiju solima platine i PARP inhibitorima. Kada se dogodi reverzija homologne rekombinacije, kumulativni defekti u genomu tumora koji su doveli do nedostatne homologne rekombinacije ostaju nepromijenjeni, stoga će HRD skor idalje pokazivati kako tumor izražava fenotip nedostatne homologne rekombinacije, iako je ona ponovno funkcionalna. Taj nedostatak mogli bi popraviti dinamički biomarkeri poput imunofluorescencijske detekcije formiranja nukleofilamenta RAD51. (69)

6. ULOGA PARP INHIBITORA I OSTALIH LIJEKOVA U LIJEČENJU TUMORA S NEDOSTATNOM HOMOLOGNOM REKOMBINACIJOM

Kao što je u prijašnjim odlomcima navedeno, spojevi platine i PARP inhibitori glavno su oruđe u borbi protiv tumora s nedostatnom homolognom rekombinacijom. Spojevi platine koriste se u onkološkom liječenju već 50 godina, još od otkrića cisplatine u šezdesetim godinama prošlog stoljeća. Nisu specifični za određeni dio staničnog ciklusa, no pokazalo se da je citotoksičnost izraženija kada se stanice nalaze u S-fazi. Djeluju stvarajući kovalentne veze, tzv. „*interstrand crosslinks*“ (ICL) s molekulom DNA, stoga ih svrstavamo u alkilirajuće citostatike. ICL onemogućavaju razdvajanje DNA lanaca i time sprječavaju DNA transkripciju i replikaciju. Ukoliko se ICL ne poprave prije dijeljenja stanice, stanica može posljedično otići u proces apoptoze. Iz navedenog je vidljivo kako su upravo tumori s nedostatnim mehanizmima popravka idealna meta za terapiju spojevima platine. (71)

Cisplatin je vrlo potentan citostatik koji se koristi u terapiji mnogih tumora (jajnik, dojka, mozak, pluća). Osim stvaranjem ICL, djeluje i putem povećanja oksidativnog stresa. Glavni nedostatak mu je izrazita toksičnost. Pokazalo se kako je cisplatin hepatotoksičan, nefrotoksičan, kardiotoksičan, neurotoksičan, te hematotoksičan. Potaknuti toksičnosti cisplatina, za uporabu liječenja neoplazmi razvijeni su i drugi spojevi platine poput karboplatina, koji se ističe smanjenom nefrotoksičnošću, no istovremeno je manje potentan u usporedbi s cisplatinom, te je

skloniji izazivanju mijelosupresije. (72)

Otkrićem specifičnih genskih mutacija, primjerice mutacija u *BRCA* genima, primijećeno je da su tumori koji sadrže takve mutacije osjetljiviji na terapiju spojevima platine i PARP inhibitorima. (71, 73) Razlog uvođenja PARP inhibitora u klinička ispitivanja bila je pretpostavka da bi PARP inhibitori mogli dodatno senzibilizirati tumorske stanice na konvencionalnu kemoterapiju i radioterapiju. (73) Obitelj PARP enzima čini 18 članova od kojih su PARP1, PARP2 i PARP3 jedini članovi u kojih je uočena aktivnost pri popravku DNA. (74) Kako je već opisano, PARP enzimi, poglavito PARP1, ključni su u pokretanju BER popravilačkog puta. Ukoliko je aktivnost PARP enzima inhibirana, novonastalo oštećenje na lancu DNA, jednolančani lom (SSB, od engl. *single-stranded break*), nije moguće popraviti. Dolaskom replikacijskih rašlji na oštećeno mjesto lom se proširuje i na drugi lanac DNA, te nastaje dvolančani lom DNA. Dvolančani lom DNA uobičajeno popravljiva proces homologne rekombinacije, što u stanicama s nedostatnom homolognom rekombinacijom nije moguće, te posljedično stanica umire putem apoptoze. (74, 75) Popravak može teći i NHEJ putem, koji pak dovodi do dodatnih DNA promjena, poput delecija genetičkog materijala. (73) Opisani mehanizam djelovanja PARP inhibitora naziva se sintetska letalnost. Sintetska letalnost se pojavljuje kada defekt u jednom genu ili proteinu ne ugrožava život stanice, no udruženje tog defekta s drugim defektom u genu ili proteinu dovodi do stanične smrti. (76-78)

Poli (ADP-riboza) polimeraza inhibitori djeluju na dva načina. Prvi je putem supresije katalitičke aktivnosti PARPa, odnosno PARP inhibitori onemogućavaju formiranje ADP-riboza polimera na mjestu oštećenja DNA lanca, što vodi ka dvostrukom lomu DNA lanca. Drugi način je putem „zarobljavanja“ PARPa na oštećenom mjestu DNA. Posljedično PARP ne može disocirati s DNA lanca i u trenutku prolaska replikacijskih rašlji na tom mjestu nastaje dvostruki lom DNA lanca. (74, 76, 79) Upravo mehanizam „zarobljavanja“ PARPa na mjestu oštećenja DNA uvjetuje potentnost PARP inhibitora. (79)

Prvi registrirani PARP inhibitor bio je olaparib čija učinkovitost se pokazala u terapiji karcinoma ovarija s dokazanom mutacijom u *BRCA* genima (SOLO studije)

(76), te u terapiji BRCA-deficijentnom metastatskom karcinomu dojke (OlympiAD studija). (79) Najpotentniji PARP inhibitor je talazoparib, što proizlazi iz opisanog mehanizma „zarobljavanja“ PARPa na mjestu oštećenje DNA, a njegova učinkovitost je potvrđena u terapiji BRCA-deficijentnih karcinoma dojke (EMBRACA studija). (74, 79) Trenutno su u Hrvatskoj registrirana 4 PARP inhibitora centraliziranim postupkom registracije: olaparib, rucaparib, niraparib i talazoparib. Indikacije za njihovu uporabu navedene su u Tablici 2.

Tablica 2. Registrirani PARP inhibitori u EU i njihove indikacije

PARP inhibitor	REGISTRIRANA INDIKACIJA
Olaparib	<ul style="list-style-type: none"> • Monoterapija u terapiji održavanja odraslih pacijenata s na platinu osjetljivim BRCA mutiranim (zametna loza i/ili somatska mutacija) HGSOE, karcinomom jajovoda ili primarnim peritonealnim karcinomom koji su imali kompletan ili parcijalan odgovor na terapiju spojevima platine. • Monoterapija u terapiji održavanja odraslih pacijenata s na platinu osjetljivim relapsnim HGSOE, karcinomom jajovoda ili primarnim peritonealnim karcinomom koji su imali kompletan ili parcijalan odgovor na terapiju spojevima platine. • Monoterapija za liječenje odraslih pacijenata s BRCA1/2 mutacijama u zametnoj lozi, koji boluju od HER2-negativnog lokalno uznapređovalog ili metastatskog raka dojke. Pacijenti su prethodno trebali biti liječeni antraciklinom i/ili taksanom u (neo)adjuvantnom, lokalno uznapređovalom ili metastatskom okruženju osim ako pacijenti nisu bili prikladni za opisana liječenja. Pacijenti s HR-pozitivnim rakom dojke trebali su prethodno primiti hormonsku terapiju ili se hormonska terapija smatrala neprikladom za njih.

	<ul style="list-style-type: none"> • Monoterapija u terapiji održavanja odraslih pacijenata s na platinu osjetljivim relapsnim BRCA mutiranim (zametna loza i/ili somatska mutacija) HGSOE, karcinomom jajovoda ili primarnim peritonealnim karcinomom koji su imali kompletan ili parcijalan odgovor na terapiju spojevima platine. (80)
Rucaparib	<ul style="list-style-type: none"> • Monoterapija u terapiji održavanja odraslih pacijenata s na platinu osjetljivim relapsnim HGSOE, karcinomom jajovoda ili primarnim peritonealnim karcinomom koji su imali kompletan ili parcijalan odgovor na terapiju spojevima platine. • Monoterapija u terapiji odraslih pacijenata s na platinu osjetljivim, relapsnim ili progresivnim BRCA mutiranim (zametna loza i/ili somatska mutacija) HGSOE, karcinomom jajovoda ili primarnim peritonealnim karcinomom, koji su bili prethodno liječeni s 2 ili više linija kemoterapije na bazi platine i koji više ne podnose daljnju kemoterapiju na bazi platine. (81)
Niraparib	<ul style="list-style-type: none"> • Monoterapija u terapiji održavanja odraslih pacijenata s na platinu osjetljivim relapsnim HGSOE, karcinomom jajovoda ili primarnim peritonealnim karcinomom koji su imali kompletan ili parcijalan odgovor na terapiju spojevima platine. (82)
Talazoparib	<ul style="list-style-type: none"> • Monoterapija za liječenje odraslih pacijenata s BRCA1/2 mutacijama u zametnoj lozi, koji boluju od HER2-negativnog lokalno uznapređovalog ili metastatskog raka dojke. Pacijenti su prethodno trebali biti liječeni antraciklinom i/ili taksanom u (neo)adjuvantnom, lokalno uznapređovalom ili metastatskom okruženju osim ako pacijenti nisu bili prikladni za opisana liječenja. Pacijenti s HR-pozitivnim rakom dojke trebali su prethodno primiti hormonsku terapiju ili se hormonska terapija smatrala neprikladom za njih. (83)

Na gotovo svu antineoplastičnu terapiju s vremenom se javlja rezistencija, pa tako i na PARP inhibitore. Zasad su poznata dva puta stjecanja rezistencije na PARP inhibitore: ponovna uspostava homologne rekombinacije i izbacivanje PARP inhibitora iz stanice. Ponovna uspostava homologne rekombinacije nastaje zbog sekundarnih mutacija u genima zaduženim za proces homologne rekombinacije, dok izbacivanje PARP inhibitora iz stanice i posljedično smanjenje koncentracije istih u stanici uzrokuje pojačana regulacija P-glikoproteina u tumorskim stanicama. (73, 74, 79)

Nedostatak terapije PARP inhibitorima su i nuspojave. Najčešće nuspojave su mučnina, povraćanje, umor i glavobolja. Moguća je također i mijelosupresija koja dovodi do anemije, leukocitopenije i trombocitopenije. (74, 78) Zabrinjava i činjenica da lijekovi koji inhibiraju DNA popravilačke mehanizme mogu izazvati nove primarne neoplazme, pa tako su u bolesnika liječenih PARP inhibitorima primijećeni mijelodisplastični sindrom i akutna mijeloična leukemija. (74)

Svojevrsni izazov u primjeni PARP inhibitora predstavlja i pitanje „koga liječiti PARP inhibitorima?“ Iako osjetljivost na spojeve platine dobro korelira s tumorskim fenotipom nedostatne homologne kombinacije, još uvijek nije moguće sa zadovoljavajućom točnošću odrediti osjetljivost tumora na PARP inhibitore. Stoga, potreban je razvitak odgovarajućeg biomarkera „BRCAness-a“ o čemu je bilo govora u dijagnostici nedostatne homologne rekombinacije. (73-75, 79) Također, veliki problem u primjeni terapije predstavljaju *variant of uncertain significance* (VUS), odnosno varijante gena čije nam kliničko značenje nije poznato. (78)

Osim PARP inhibitora, razvijaju se i drugi potencijalni lijekovi koji iskorištavaju princip nedostatne homologne rekombinacije. Regulatori transkripcije gena zaduženih za homolognu rekombinaciju i inhibitori ubikvitinacije proteina koji sudjeluju u homolognoj rekombinaciji su primjer molekula kojima bi se mogao proizvesti efekt sintetske letalnosti. Opisani tipovi molekula djelovali bi na principu inhibicije homologne rekombinacije, što bi bilo korisno u slučajevima kada se razvije otpornost na postojeće lijekove putem sekundarne mutacije tumora i ponovne

uspostave homologne rekombinacije ili bi se mogle koristiti kao molekule koje sintetski proizvode defekt homologne rekombinacije, te tako senzibilizirati na PARP inhibitore i one tumore koji nemaju nedostatnu homolognu rekombinaciju. (2)

7. ZAKLJUČAK

Otkrićem PARP inhibitora i novih lijekova u nastajanju, mogućnosti liječenja onkoloških bolesnika sve su veće, što vodi ka boljim ishodima liječenja i povećanom preživljenju. No, i dalje ostaje mnogo pitanja na koja je potrebno odgovoriti, poput boljeg razumijevanja mehanizma rezistencije na liječenje, te kako probrati one koji će imati korist od novih lijekova. Također, pitanje dugoročnih nuspojava ostaje neistraženo zbog relativno kratke primjene PARP inhibitora, koji su se do sada koristili samo za metastatsku bolest, a polako ulaze i u ranije linije liječenja. Novim otkrićima u fiziološkim i patofiziološkim procesima našeg organizma dolazimo do vrijednih spoznaja koje će nam možda pomoći bolje razumjeti naše tijelo i način na koje funkcionira, ali potrebne su još godine istraživanja kako bismo dobivena saznanja mogli optimalno iskoristiti, te omogućiti ne samo bolju terapiju bolesti, nego i njihovu prevenciju.

8. ZAHVALE

Zahvaljujem svima koji su mi pomogli u pisanju ovog rada, a posebice zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Nataliji Dedić Plavetić, dr. med na pomoći i dostupnosti za vrijeme pisanja ovog rada, bez čijeg znanja i truda ovaj rad ne bih uspio napisati.

Također, zahvaljujem prof. dr. sc. Ljiljani Šerman, dr. med na vrijednim savjetima kroz cijeli studij.

Nadalje, zahvaljujem svim svojim prijateljima, koji su ublažili loše trenutke, a dobre učinili još boljima.

I naposljetku, posebice želim zahvaliti majci Sandri, baki Đurđici i djedu Ivanu koji su me podržavali i vjerovali u mene od početka mog života.

9. LITERATURA

1. O'Connor MJ. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol Cell*. 2015;60(4):547–560.
2. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*. 2017;58(5):235–263.
3. Sanford-Crane H, Pejovic T, Xiao X. Drugging homologous recombination: back to the future. *Future Med Chem*. 2018;10(11):1279–1281.
4. Basu AK. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4):970.
5. Barnes JL, Zubair M, John K, Poirier MC, Martin FL. Carcinogens and DNA damage. *Biochem Soc Trans*. 2018;46(5):1213–1224.
6. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009;461(7267):1071–1078.
7. Schuch AP, Moreno NC, Schuch NJ, Menck CFM, Garcia CCM. Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. *Free Radic Biol Med*. 2017;107:110–124.
8. Shah P, He YY. Molecular regulation of UV-induced DNA repair. *Photochem Photobiol*. 2015;91(2):254–264.
9. Ikehata H, Ono T. The mechanisms of UV mutagenesis. *J Radiat Res*. 2011;52(2):115–125.

10. Markkanen E. Not breathing is not an option: How to deal with oxidative DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 2017;59:82–105.
11. Yang H, Villani RM, Wang H, et al. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):266.
12. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol*. 2019;25:101084.
13. de Sá Junior PL, Câmara DAD, Porcacchia AS, et al. The Roles of ROS in Cancer Heterogeneity and Therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:2467940.
14. Leandro GS, Sykora P, Bohr VA. The impact of base excision DNA repair in age-related neurodegenerative diseases. *Mutat Res*. 2015;776:31–39.
15. Whitaker AM, Schaich MA, Smith MR, Flynn TS, Freudenthal BD. Base excision repair of oxidative DNA damage: from mechanism to disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2017;22:1493–1522.
16. Carter RJ, Parsons JL. Base Excision Repair, a Pathway Regulated by Posttranslational Modifications. *Mol Cell Biol*. 2016;36(10):1426–1437.
17. Wallace SS. Base excision repair: a critical player in many games. *DNA Repair (Amst)*. 2014;19:14–26.
18. Wallace SS, Murphy DL, Sweasy JB. Base excision repair and cancer. *Cancer Lett*. 2012;327(1-2):73–89.
19. Krokan HE, Bjørås M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(4):a012583.

20. Zhu Q, Wani AA. Nucleotide Excision Repair: Finely Tuned Molecular Orchestra of Early Pre-incision Events. *Photochem Photobiol.* 2017;93(1):166–177.
21. Schärer OD. Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(10):a012609.
22. Iyama T, Wilson DM 3rd. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst).* 2013;12(8):620–636.
23. Spivak G. Nucleotide excision repair in humans. *DNA Repair (Amst).* 2015;36:13–18.
24. Cambindo Botto AE, Muñoz JC, Muñoz MJ. Coupling between nucleotide excision repair and gene expression. *RNA Biol.* 2018;15(7):845–848.
25. Kemp MG, Hu J. PostExcision Events in Human Nucleotide Excision Repair. *Photochem Photobiol.* 2017;93(1):178–191.
26. Richman S. Deficient mismatch repair: Read all about it (Review). *Int J Oncol.* 2015;47(4):1189–1202.
27. Lee V, Murphy A, Le DT, Diaz LA Jr. Mismatch Repair Deficiency and Response to Immune Checkpoint Blockade. *Oncologist.* 2016;21(10):1200–1211.
28. Pannunzio NR, Watanabe G, Lieber MR. Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 2018;293(27):10512–10523.
29. Radhakrishnan SK, Jette N, Lees-Miller SP. Non-homologous end joining: emerging themes and unanswered questions. *DNA Repair (Amst).* 2014;17:2–8.

30. Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(8):495–506.
31. Li X, Heyer WD. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res.* 2008;18(1):99–113.
32. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer.* 2011;12(1):68–78.
33. Savage KI, Harkin DP. BRCA1, a 'complex' protein involved in the maintenance of genomic stability. *FEBS J.* 2015;282(4):630–646.
34. da Cunha Colombo Bonadio RR, Fogace RN, Miranda VC, Diz MDPE. Homologous recombination deficiency in ovarian cancer: a review of its epidemiology and management. *Clinics (Sao Paulo).* 2018;73(suppl 1):e450s.
35. Jasin M, Rothstein R. Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(11):a012740.
36. Hunter N. Meiotic Recombination: The Essence of Heredity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(12):a016618.
37. Kakarougkas A, Jeggo PA. DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. *Br J Radiol.* 2014;87(1035):20130685.
38. Wright WD, Shah SS, Heyer WD. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 2018;293(27):10524–10535.
39. Sun Y, McCorvie TJ, Yates LA, Zhang X. Structural basis of homologous recombination. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(1):3–18.

40. Krejci L, Altmannova V, Spirek M, Zhao X. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(13):5795–5818.
41. Paul A, Paul S. The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2014;19:605–618.
42. Prakash R, Zhang Y, Feng W, Jasin M. Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(4):a016600.
43. Campbell MB, Campbell WC, Rogers J, et al. Bloom syndrome: research and data priorities for the development of precision medicine as identified by some affected families. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 2018;4(2):a002816.
44. de Renty C, Ellis NA. Bloom's syndrome: Why not premature aging?: A comparison of the BLM and WRN helicases. *Ageing Res Rev.* 2017;33:36–51.
45. Sheikh A, Hussain SA, Ghori Q, et al. The spectrum of genetic mutations in breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(6):2177–2185.
46. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2017., Bilten 42. Šekerija M, ur. [Internet] Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2020 [pristupljeno 10.04.2020.]. Dostupno na https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/03/Bilten_2015_rak_final.pdf
47. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res.* 2017;50(1):33.
48. Yeo SK, Guan JL. Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor?. *Trends Cancer.* 2017;3(11):753–760.

49. Howlader N, Cronin KA, Kurian AW, Andridge R. Differences in Breast Cancer Survival by Molecular Subtypes in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2018;27(6):619–626.
50. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci.* 2017;13(11):1387–1397.
51. Shiovitz S, Korde LA. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann Oncol.* 2015;26(7):1291–1299.
52. Tung NM, Garber JE. BRCA1/2 testing: therapeutic implications for breast cancer management. *Br J Cancer.* 2018;119(2):141–152.
53. Sharma P. Biology and Management of Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *Oncologist.* 2016;21(9):1050–1062.
54. Toss A, Tomasello C, Razzaboni E, et al. Hereditary ovarian cancer: not only BRCA 1 and 2 genes. *Biomed Res Int.* 2015;2015:341723.
55. Moschetta M, George A, Kaye SB, Banerjee S. BRCA somatic mutations and epigenetic BRCA modifications in serous ovarian cancer. *Ann Oncol.* 2016;27(8):1449–1455.
56. Gadducci A, Guarneri V, Peccatori FA, et al. Current strategies for the targeted treatment of high-grade serous epithelial ovarian cancer and relevance of BRCA mutational status. *J Ovarian Res.* 2019;12(1):9.
57. Pan Z, Xie X. BRCA mutations in the manifestation and treatment of ovarian cancer. *Oncotarget.* 2017;8(57):97657–97670.
58. Kroeger PT Jr, Drapkin R. Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2017;29(1):26–34.

59. Neff RT, Senter L, Salani R. *BRCA* mutation in ovarian cancer: testing, implications and treatment considerations. *Ther Adv Med Oncol*. 2017;9(8):519–531.
60. Mateo J, Boysen G, Barbieri CE, et al. DNA Repair in Prostate Cancer: Biology and Clinical Implications. *Eur Urol*. 2017;71(3):417–425.
61. Criscuolo D, Morra F, Giannella R, Cerrato A, Celetti A. Identification of Novel Biomarkers of Homologous Recombination Defect in DNA Repair to Predict Sensitivity of Prostate Cancer Cells to PARP-Inhibitors. *Int J Mol Sci*. 2019;20(12):3100.
62. Pilarski R. The Role of *BRCA* Testing in Hereditary Pancreatic and Prostate Cancer Families. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2019;39:79–86.
63. Kowalewski A, Szyłberg Ł, Saganeł M, Napiontek W, Antosik P, Grzanka D. Emerging strategies in *BRCA*-positive pancreatic cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018;144(8):1503–1507.
64. Jin J, Zhang W, Ji W, Yang F, Guan X. Predictive biomarkers for triple negative breast cancer treated with platinum-based chemotherapy. *Cancer Biol Ther*. 2017;18(6):369–378.
65. Muggia F, Safra T. 'BRCAness' and its implications for platinum action in gynecologic cancer. *Anticancer Res*. 2014;34(2):551–556.
66. Watkins JA, Irshad S, Grigoriadis A, Tutt AN. Genomic scars as biomarkers of homologous recombination deficiency and drug response in breast and ovarian cancers. *Breast Cancer Res*. 2014;16(3):211.
67. Chalasani P, Livingston R. Differential chemotherapeutic sensitivity for breast tumors with "BRCAness": a review. *Oncologist*. 2013;18(8):909–916.

68. Rigakos G, Razis E. BRCAness: finding the Achilles heel in ovarian cancer. *Oncologist*. 2012;17(7):956–962.
69. Konstantinopoulos PA, Ceccaldi R, Shapiro GI, D'Andrea AD. Homologous Recombination Deficiency: Exploiting the Fundamental Vulnerability of Ovarian Cancer. *Cancer Discov*. 2015;5(11):1137–1154.
70. Telli ML, Timms KM, Reid J, et al. Homologous Recombination Deficiency (HRD) Score Predicts Response to Platinum-Containing Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2016;22(15):3764–3773.
71. Basourakos SP, Li L, Aparicio AM, Corn PG, Kim J, Thompson TC. Combination Platinum-based and DNA Damage Response-targeting Cancer Therapy: Evolution and Future Directions. *Curr Med Chem*. 2017;24(15):1586–1606.
72. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:364–378.
73. Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science*. 2017;355(6330):1152–1158.
74. Livraghi L, Garber JE. PARP inhibitors in the management of breast cancer: current data and future prospects. *BMC Med*. 2015;13:188.
75. Faraoni I, Graziani G. Role of BRCA Mutations in Cancer Treatment with Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitors. *Cancers (Basel)*. 2018;10(12):487.
76. Liu FW, Tewari KS. New Targeted Agents in Gynecologic Cancers: Synthetic Lethality, Homologous Recombination Deficiency, and PARP Inhibitors. *Curr Treat Options Oncol*. 2016;17(3):12.

77. Guo GS, Zhang FM, Gao RJ, Delsite R, Feng ZH, Powell SN. DNA repair and synthetic lethality. *Int J Oral Sci.* 2011;3(4):176–179.

78. Dziadkowiec KN, Gašiorowska E, Nowak-Markwitz E, Jankowska A. PARP inhibitors: review of mechanisms of action and BRCA1/2 mutation targeting. *Prz Menopauzalny.* 2016;15(4):215–219.

79. Turk AA, Wisinski KB. PARP inhibitors in breast cancer: Bringing synthetic lethality to the bedside. *Cancer.* 2018;124(12):2498–2506.

80. European Medicines Agency [Internet]. Amsterdam (Ne): Lynparza; [ažurirano 12.11.2019.; pristupljeno 29.04.2020.] Dostupno na:
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/lynparza#product-information-section>

81. European Medicines Agency [Internet]. Amsterdam (Ne): Rubraca; [ažurirano 29.04.2020; pristupljeno 29.04.2020.] Dostupno na:
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/rubraca#product-information-section>

82. European Medicines Agency [Internet]. Amsterdam (Ne): Zejula; [ažurirano 14.02.2020.; pristupljeno 29.04.2020.] Dostupno na:
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zejula#product-information-section>

83. European Medicines Agency [Internet]. Amsterdam (Ne): Talzenna; [ažurirano 08.07.2019.; pristupljeno 29.04.2020.] Dostupno na:
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/talzenna#product-information-section>

84. Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature.* 2012;481(7381):287-294.

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 29. ožujka 1995. godine u Zagrebu. Od 2002. godine do 2010. godine pohađao sam Osnovnu školu Sveta Nedelja, te sam potom upisao V. Gimnaziju u Zagrebu. Maturirao sam 2014. godine i iste godine upisujem Medicinski fakultet u Zagrebu. Od 2015. do 2017. godine bio sam demonstrator na Katedri za anatomiju. 2016. godine sam bio jedan od učesnika Fesivala znanosti u Zagrebu, na kojem sam predstavljao Medicinski fakultet. Položio sam FCE ispit iz engleskog jezika, kojim se aktivno služim, a poznajem i osnove njemačkog, te španjolskog jezika. Osnivač sam i voditelj popularnog kviza općeg znanja „Kvizdarija“.