

# Potencijalna primjena nestanične DNA u neinvazivnoj dijagnostici tumora

---

Šutalo, Josip

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:105:092858>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-05**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

Josip Šutalo

**Potencijalna primjena nestanične DNA u  
neinvazivnoj dijagnostici tumora**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2021.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na Katedri za medicinsku biologiju pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Nina Sinčića, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2020./2021.

# SADRŽAJ

## SAŽETAK

## SUMMARY

<b>1. MOLEKULA DNA</b> .....	1
<b>1.1 Kemijska struktura</b> .....	1
<b>1.2. Funkcionalni dijelovi molekule DNA</b> .....	1
<i>1.2.1. Geni</i> .....	1
<i>1.2.2. Vangenska DNA</i> .....	2
<b>2. MUTACIJE GENA I TUMORI</b> .....	4
<b>2.1. Mutacije uzrokovane čimbenicima okoliša</b> .....	4
<b>2.2 Mutacije uzrokovane greškom popravka DNA</b> .....	5
<b>3. EPIMUTACIJE GENA U TUMORIMA</b> .....	6
<b>3.1. Epigenetika</b> .....	6
<b>3.2. Metilacija DNA</b> .....	6
<b>3.3 Poremećaji metilacije DNA povezani s tumorima</b> .....	7
<b>4. NESTANIČNA DNA</b> .....	7
<b>5. CIRKULIRAJUĆA TUMORSKA DNA</b> .....	8
<b>6. METODE IZOLACIJE nsDNA</b> .....	9
<b>7. METODE ANALIZE nsDNA</b> .....	10
<b>7.1. ddPCR</b> .....	11
<b>7.2. BEAMing</b> .....	11
<b>7.3. CAPP-Seq</b> .....	12
<b>7.4. TAM-Seq</b> .....	12
<b>7.5. Safe-seq</b> .....	12
<b>7.6. Duplex sekvenciranje</b> .....	13
<b>7.7. iDES-pojačano CAPP sekvenciranje</b> .....	13
<b>7.8. Pirosekvenciranje</b> .....	13
<b>8. POTENCIJALNA PRIMJENA nsDNA KAO BIOMARKERA TUMORA</b> .....	13
<b>8.1. Probir i rana dijagnostika</b> .....	14
<b>8.2. Odabir terapije</b> .....	16
<b>8.3. Prognoza bolesti i praćenje pacijenata</b> .....	16
<b>8.4. Praćenje rezistencije i mutacijskog statusa tumora</b> .....	17
<b>8.5. Detektiranje minimalno rezidualne bolesti</b> .....	18

<b>9.</b>	<b>TRENTNE PREPREKE U KORIŠTENJU nsDNA KAO KLINIČKI STANDARD .....</b>	<b>18</b>
<b>10.</b>	<b>ZAKLJUČAK.....</b>	<b>19</b>
<b>11.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>22</b>
<b>12.</b>	<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>26</b>

## SAŽETAK

### Potencijalna primjena nestanične DNA u neinvazivnoj dijagnostici tumora

Josip Šutalo

Nestanična DNA (nsDNA, engl. *cell-free DNA*, *cfDNA*) je fragmentirana genomska DNA koja se nalazi slobodna primarno u tjelesnim tekućinama. U onkoloških pacijenata, određeni udio nsDNA potječe od tumorskih stanica kada se naziva cirkulirajuća tumorska DNA (ctDNA), a nosi informaciju o genskim i epigenetičkim promjenama neoplastično transformiranih stanica. To je osnovni postulat koji nsDNA, odnosno ctDNA, definira kao potencijalni biomarker tumora. Rutinski primjenjivane biopsije tkiva su invazivne, a ponekada otežane ili nemoguće, što potiče razvoj novih neinvazivnih pristupa i vezanih tehnologija. Stoga posljednjih godina, potencijalna primjena nsDNA kao neinvazivnog tumorskog biomarkera koji je lako dostupan posebice u perifernoj krvi pacijenta, dobiva veliku pažnju. Nestanična DNA iz tekućinskih biopsija je idealan neinvazivni biomarker tumora s mogućnosti čestog ponavljanja uzorkovanja i analize s praktički nepostojećim stresom na onkološkog pacijenta. U kliničkoj onkologiji analiza nsDNA iz tekućinskih biopsija ima potencijalnu primjenu u probiru, ranoj dijagnozi tumora, evaluaciji terapije, praćenju progresije bolesti, identifikaciji razvoja rezistencije na terapiju i prognoziranju ishoda bolesti uopće. Usprkos brzom i snažnom razvoju ovog pristupa i vezanih tehnologija, mnogi se izazovi još moraju uspješno adresirati.

**Ključne riječi:** *nestanična DNA, cirkulirajuća tumorska DNA, biomarker, tumor, neinvazivna dijagnostika*

## **SUMMARY**

### **Potential application of cell-free DNA in non-invasive tumor diagnosis**

Cell-free DNA (cfDNA) is a fragmented genomic DNA that is found free in body fluids primarily. In cancer patients, a certain proportion of cfDNA originates from tumor cells when it is called circulating-tumor DNA (ctDNA), and carries information about genetic and epigenetic changes of neoplastically transformed cells. This is the basic postulate that defines cfDNA, or ctDNA, as a potential tumor biomarker. Routine applications of tissue biopsy are invasive, sometimes difficult or impossible, which encourages the development of new non-invasive approaches and related technologies. Therefore, in recent years, the potential use of nsDNA as a non-invasive tumor biomarker that is readily available especially in a patient's peripheral blood is receiving much attention. Cell-free DNA from liquid biopsies is an ideal noninvasive tumor biomarker with the ability of frequently repeated sampling and analysis with virtually no stress for an oncology patient. In clinical oncology, cfDNA analysis from liquid biopsy has potential application in screening, early tumor diagnosis, evaluation of therapies, monitoring disease progression, identifying the development of resistance to therapy, and predicting disease outcomes in general. Despite the rapid and strong development of this approach and related technologies, many challenges still need to be successfully addressed.

**Keywords:** *cell-free DNA, circulating tumor DNA, biomarker, tumor, non-invasive diagnosis*

# 1. MOLEKULA DNA

## 1.1 Kemijska struktura

Molekula DNA se sastoji od dva povezana lanca, polimera nukleotida koji čine spiralnu zavojnicu. Svaki pojedini nukleotid se sastoji od dušikove baze koja se nalazi na unutarnjoj strani zavojnice, te šećera deoksiriboze i fosfatne skupine koji se nalaze na vanjskoj strani. Dušikova baza može biti purinska (adenin i gvanin) ili pirimidinska (citozin i timin). Dva uvijena lanca su u zavojnici međusobno povezana vodikovim vezama između dušikovih baza. Baze se ne spajaju nasumično nego slijede pravilo komplementarnosti. Citozin jednog lanca se spaja s gvaninom drugog lanca, a adenin se spaja s timinom. Nukleotidi se u jednom lancu povezuju fosfodiesterskim vezama tako da vezu čine ugljikov atom 3' deoksiriboze jednog nukleotida i ugljikov atom 5' susjedne deoksiriboze, odnosno susjednog nukleotida. Lanci koji čine molekulu DNA su antiparalelni. To znači da je smjer jednog lanca obrnut od smjera drugog lanca. Pritom se smjer određuje slobodnim 5' odnosno 3' ugljikovim atomima. Jedan lanac je smjera 5'-3' dok je drugi obrnutog smjera u odnosu na prethodni lanac, dakle 3'-5' (1). Zavoji uzvojnice DNA su veličine 3,4 nm, a razmak između dviju susjednih baza je 0,34 nm. Jedan se zavoj sastoji od 10 parova baza. Budući da je širina jednog lanca 1 nm, ukupan je promjer molekule DNA 2 nm (2).

## 1.2. Funkcionalni dijelovi molekule DNA

### 1.2.1. Geni

Gen čini sekvenca određenog broja nukleotida. Gen je osnovna jedinica biološke informacije i može se definirati kao dio DNA koji daje završni produkt u obliku RNA ili u obliku proteina. Geni određuju strukturu proteina odgovornih za funkcioniranje stanice. Točnije, kodiraju redoslijed aminokiselina od kojih se protein sastoji. No, slijed nukleotida koji čini pojedini gen ne kodira svakim nukleotidom odgovarajući protein, nego postoje i dijelovi DNA slijeda u genu koji ne kodiraju. Kodirajući dijelovi gena nazivaju se egzoni, a dijelovi DNA unutar gena koji su nekodirajući nazivaju se introni. Introni se nalaze između egzona, odnosno „ubacuju“ se između kodirajućih dijelova DNA. Poznate su mnoge funkcije introna poput zaštite kodirajuće sekvence od mutacija, mogućnost prekrajanja mRNA kao i reguliranje ekspresije pojedinih gena, primjerice (3).



Ponekad introni mogu i kodirati bjelančevinu odnosno mRNA. Tada se zovu ugniježđeni geni. Riječ je o genu koji se nalazi u intronu većeg gena. U čovjeka je identificirano tek oko 150 takvih ugniježđenih kodirajućih gena. Introni također daju mogućnost alternativnog prekrajanja što omogućuje jednom genu da ima više različitih proteinskog produkata. Količina egzonskog dijela DNA u jednom genu je u prosjeku manja od nekodirajućeg intronskog dijela. Na oko 30.000 parova baza u genu nalazi se 9 egzona isprekidanih s 8 introna. Prosječno, 9 egzona sveukupno čini oko 2.500 parova baza. To znači da oko 90% prosječnog gena čovjeka čine introni (3). No veličina gena može jako varirati. Geni mogu imati samo jedan egzon, a mogu biti veliki i sadržavati čak 79 egzona kao u gena za distrofin.

Geni se mogu podijeliti na jedinstvene gene jedne kopije i multigenske obitelji koje se dijele u klasične genske obitelji i genske superobitelji. Jedinstveni geni jedne kopije čine većinu ljudskih gena. Kodiraju polipeptide s različitim staničnim funkcijama kao što su enzimi, receptori i hormoni, primjerice. Multigenske obitelji čine geni koji imaju sličnu funkciju. Često su nastali zbog duplikacija pod pritiskom evolucije. Mogu se nalaziti blizu jedan drugome ili raspršeni po genomu. Dije se u dva tipa. Jedna od njih je klasična genska obitelj koje imaju visok stupanj homologije sekvenci. To su na primjer različite genske obitelji transportnih RNA. Genske superobitelji su drugi tip multigenskih obitelji. Imaju ograničenu homolognost slijedova, no srodnih su funkcija zbog sličnosti strukturnih domena.

Potrebno je još spomenuti pseudogene. To su geni koji nalikuju na poznate gene, ali nisu funkcionalni. Smatra se da su nastali procesom genske duplikacije, pa su poslije utišani mutacijama u regulacijskom ili kodirajućem dijelu, ili su nastali kao rezultat umetanja komplementarnog slijeda DNA proizvedenog djelovanjem enzima reverzne transkriptaze, a bez promotorskog slijeda potrebnog za ekspresiju (1).

### **1.2.2. Vangenska DNA**

Geni nisu jedine funkcionalne regije molekule DNA. Postoji i vangenska DNA, odnosno DNA koja ne tvori gene. Ukupni genom čovjeka ima oko 3,2 milijardi parova baza, a nekodirajuća DNA predstavlja oko 98 %. Zove se još i zastarjelim nazivom „*junk*“ DNA. Ipak, pojedine regije vangenske DNA imaju bitnu ulogu u funkcioniranju stanice, regulaciji genske ekspresije ili evolucijskog očuvanja, primjerice.

Veliki udio nekodirajućeg dijela genoma (oko 50 %) čine repetitivne DNA sekvence koje grade tandemska ponavljanja odnosno blokovi nukleotidnih baza kojih u pojedinom tandemu može biti od 2 do 10. Tandemska ponavljanja se mogu podijeliti u 3 podgrupe: satelitska DNA,

minisatelitska DNA i mikrosatelitska DNA. Satelitska DNA čini od 10 % do 15 % ponavljajućih DNA slijedova. Ona je transkripcijski inaktivna i nalazi se oko centromera pojedinih kromosoma. Minisatelitske DNA su također transkripcijski neaktivne, a pod minisatelitske DNA spadaju dvije obitelji tandemski ponavljajućih sekvenci. Telomerna minisatelitska DNA koja se nalazi na krajevima kromosoma, veličine je od 10 do 15 kilobaza i građena od ponavljajućih tandema veličine 6 parova baza. Funkcija telomerne DNA je očuvanje cjelovitosti kromosoma pored određivanja ukupnog broja mogućih replikacija DNA odnosno dioba stanice. Druga obitelj minisatelitskih DNA je hipervarijabilna minisatelitska DNA. To su visoko polimorfne sekvence DNA koje se sastoje od kratkih tandemskih ponavljanja. Može imati 1 do 5 tisuća parova baza, a tandem je ukupne veličine od 15 do 100 parova baza. Broj ponavljanja je izrazito varijabilan i osnova je za tehnologiju DNA fingerprintinga. Mikrosatelitne DNA se sastoje od jednog, dva, tri ili četiri parova baza koje se također ponavljaju. Prožimaju cijeli genom, ali se rijetko nalaze unutar kodirajućih sekvenci. Ako se pak nalaze unutar ili blizu gena, često uzrokuju pojavu određenih nasljednih bolesti kao što su Fragilni X sindrom i miotonu distrofiju, primjerice. Koriste se u određivanju očinstva odnosno u forenzici općenito (1).

Druga velika skupina ponavljajućih sekvenci su visokoponavljajuće DNA sekvence koje su raspršene po cijelom genomu i čine oko jednu trećinu genoma. Ova skupina uključuje dvije vrste DNA sekvenci. Kratka raspršena visokoponavljajuća DNA (engl. *short interspersed nuclear elements*, SINE) čini oko 5 % ukupnog genoma. Najzastupljenije su sekvence od otprilike 300 parova baza koje su slične sekvenci za prepoznavanje signala uključenog u sintezu proteina. Duga raspršena visokoponavljajuća sekvenca (engl. *long interspersed nuclear elements*, LINE ) također čini oko 5 % cjelokupnog genoma. Najčešća je LINE-1 ili L1, a sadrži 100.000 kopija DNA sekvence. LINE i SINE se još nazivaju retrotranspozoni. Mogu se ugraditi u bilo koji dio ljudskog genoma uz pomoć reverzne transkriptaze. RNA kopija SINE-a ili LINE-a se prepisuje u DNA pomoću reverzne transkriptaze te se nova kopija DNA integrira na novom mjestu u genomu.

Poseban tip DNA svakako je mitohondrijska DNA. To je DNA koja se nalazi u mitohondrijima, kružnog je oblika i sadrži 37 gena od kojih 22 kodiraju za tRNA, 2 za rRNA i 13 za podjedinice proteina kao što su citokrom b i citokrom oksidaza (1).

## 2. MUTACIJE GENA I TUMORI

Mutacija je termin koji opisuje promjenu sekvence unutar molekule DNA. Mutacija gena opisuje promjenu sekvence DNA koja kodira za proteine. Mutacije se mogu podijeliti na nekoliko načina. Prema uzroku, mutacije mogu biti spontane ili inducirane. Ponekad razlikujemo i treću zasebnu skupinu mutacija koje nastaju kao posljedice grešaka u popravku DNA. Prema tipu stanica u kojima se javljaju, mutacije mogu biti somatske bez mogućnosti prijenosa na potomstvo, ili mogu biti smještene u spolnim stanicama kada se prenose na potomstvo. Najčešće mutacije, obzirom na samu promjenu u sekvenci DNA, su supstitucija baze, odnosno zamjena jedne baze drugom bazom, te insercija ili delecija, odnosno ubacivanje ili izbacivanje jedne ili više baza. Vrste mutacija po učinku na proteinski produkt mogu biti tihe mutacije, mutacije krivog smisla, besmislene i mutacije pomaka okvira čitanja. U tihim mutacijama, koje najčešće nastaju kao posljedica supstitucije jedne baze, ne dolazi do promjene kodirane aminokiseline. Naime, novonastali kodon kodira za istu aminokiselinu zbog čega tihe mutacije ne dovode do promjene strukture proteina i vezane promjene fenotipa stanice. Za razliku od tihim mutacija, kod mutacija krivog smisla dolazi do promjene aminokiseline i time do promjene strukture proteinskog produkta koji u većini slučajeva gubi ili mu je smanjena funkcionalnost. Besmislene mutacije su mutacije u kojima supstitucijom nastaje STOP kodon što uzrokuje prerani završetak translacije. Pomak okvira čitanja nastaje delecijom ili insercijom jedne baze ili većeg broja baza uz uvjet da taj broj nije višekratnik broja tri. Nakon takvog tipa mutacije, slijed aminokiselina nije nimalo sličan s normalnom slijedu, a proteinski produkt je samim time znatno drugačiji. U ovom slučaju ponekad ni nema proteinskog produkta budući da se mRNA tako mutiranog gena može degradirati i prije same translacije (1).

### 2.1. Mutacije uzrokovane čimbenicima okoliša

Mutacije mogu biti uzrokovane čimbenicima okoliša, odnosno mutagenima. Mutagene dijelimo u tri velike skupine. Fizikalni mutageni fizikalnim djelovanjem oštećuju molekulu DNA. Tu spadaju različiti oblici prirodnih i umjetnih zračenja kao što su kozmička zračenja, UV zračenja, vanjska  $\gamma$ -zračenja, zračenja uzrokovana radioaktivnim otpadom, primjerice. U ovu skupinu mutagena spada i izloženost zračenju u medicinskoj praksi. Kemijski mutageni iznimno su rašireni i povezani s modernim načinom života, posebice prehranom i kozmetikom, a oštećuju molekulu DNA uslijed kemijskih reakcija. Uistinu, stil prehrane je jedan od faktora koji često

može uzrokovati mutacije. Poznato je da hrana kontaminirana aflatoksinom B<sub>1</sub> uzrokuje specifičnu mutaciju u kodonu 249 p53 gena. Događa se supstitucija gvanina timinom (AGG u AGT) (4). Nadalje, dokazano je da heterociklički aromatski amini koji mogu nastati obradom mesa pri visokim temperaturama kao što je meso s roštilja, uzrokuju također mutacije gena (5). U skupinu kemijskih mutagena spadaju i određeni lijekovi, poput ponekih citostatika. Fizikalni i kemijski mutageni mogu se pojaviti i u kombinaciji te sinergijski povećavati rizik od maligne transformacije stanice. Primjer sinergije fizikalnih i kemijskih mutagena svakako je pušenje duhana. Naime, prilikom pušenja duhana mutaciju DNA mogu izazvati i toplina duhanskog dima kao fizikalni mutagen, te niz kemikalija prisutnih u duhanskom dimu kao kemijski mutageni. Tako je primjerice dokazano da je mutacija gena supresora tumora *P53* u plućima puno češća u pušača nego u nepušača. Transverzija gvanina u timin je izraženija u karcinomima pluća pušača nego u nepušača, a isto vrijedi, ali u manjoj mjeri, za tumore larinksa i tumore glave i vrata (6). Posljednja skupina mutagena su biološki mutageni. Riječ je o organizmima koji mogu izazvati oštećenje molekule DNA poput virusa i bakterija. Tako se primjerice genom hepatitis B virusa može integrirati u genom stanice domaćina. Virus često dovodi do izmjene sekvence gena na samom mjestu integracije što za posljedicu može imati inaktivacije pogođenog gena, ili transformaciju protoonkogeno u onkogen. Određene bakterije koje izazivaju upalu poput *Helicobacter pylori* povećavaju količinu slobodnih kisikovih radikala u tkivu što rezultira oštećenjem DNA i smanjenim popravkom DNA povećavajući vjerojatnost mutacije.

## 2.2 Mutacije uzrokovane greškom popravka DNA

Stabilnost DNA ovisi o njenom kontinuiranom popravku različitim staničnim mehanizmima. Popravak izrezivanjem nukleotida uklanja timinske dimere i velike kemijske adukte. Uklanjaju se fragmenti od otprilike 30 nukleotida, a proces uključuje oko 30 proteina. *Xeroderma pigmentosum* je bolest uzrokovana greškom u navedenom mehanizmu popravka DNA. Popravak izrezivanjem baze zahtjeva drugačiji komplet enzima. Kod mutacije *MYH* gena, mehanizam je oštećen i pokazano je da uzrokuje autosomno recesivni oblik kolorektalnog karcinoma. Normalno prisutni reaktivni metaboliti kisika i ionizirajuće zračenje stvaraju lomove lanaca DNA. Poslijereplikacijski popravak je potreban da bi se ti lomovi ispravili. Ljudski geni koji sudjeluju u tom procesu su *NBS*, *BLM* i *BRCA 1/2*. Popravak krivo sparenih baza popravlja pogrešno sparene baze koje se pojavljuju tijekom DNA replikacije. Greška u tom mehanizmu može uzrokovati nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom. Geni za

popravak krivo sparenih baza DNA povezani s nasljednim nepolipoznim kolorektalnim karcinomom su *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS1* i *PMS2* (1).

### **3. EPIMUTACIJE GENA U TUMORIMA**

#### **3.1. Epigenetika**

Epigenetika je znanstvena disciplina koja proučava promjene u ekspresiji gena i strukturi kromatina koje su mitotski i mejotički nasljedne, a koje ne podrazumijevaju promjenu sekvence DNA. Kanonske epigenetičke modifikacije su metilacija DNA, posttranslacijske modifikacije histona i RNA interferencija odnosno sustav miRNA molekula (7).

#### **3.2. Metilacija DNA**

Metilacija DNA je najbolje proučena epigenetička modifikacija i najsnažnije dokazano povezana s razvojem tumora. Kovalentna adicija metilne skupine se događa na petom atomu ugljika citozina. Točnije, na citozinu koji prethodi gvaninu, odnosno na citozinu unutar CpG dinuklotida. Metilacija DNA snažno je prisutna unutar prenosivih elemenata gdje ima ključnu ulogu u suzbijanju kretanja transpozona kroz genom odnosno razvoja insercijske mutageneze. Uz to, metilacija DNA povezana je s represijom transkripcije gena koji su uključeni u razvoj i diferencijaciju. Metilacija DNA važan je mehanizam epigenetičkog nasljeđivanja. Obrasci metilacije DNA su održani nakon replikacije. Dakle, gen koji je metiliran u roditeljskoj stanici ostaje metiliran i njegova ekspresija potisnuta i u stanici kćeri (8).

Metilacija gena konstantno se mijenja i to pod utjecajem okolišnih faktora u najširem smislu. Najbolji primjer ove povezanosti metilacije DNA i okoliša, a u odnosu na genom, očituje se u istraživanjima na blizancima. Dokazano je naime da identični blizanci imaju drugačije obrasce metilacije DNA. Intenzitet razlike pozitivno korelira sa dobi blizanaca ali i sa periodom razdvojenog života u različitim sredinama (9).

Metilacija DNA je reverzibilna te se može i obrnuti. To se ponajviše događa pomoću TET obitelji enzima, ali i pasivno. Ova spoznaja temelj je za razvoj epigenetičke terapije koja se temelji na korištenju tvari, epigenetičkih lijekova, koji imaju sposobnost inducirane izmjene metilacije DNA u željenom smjeru (8).

### 3.3 Poremećaji metilacije DNA povezani s tumorima

Poremećaj metilacija gena *Rb* je prva epimutacija povezana s razvojem tumora. S vremenom, poremećaji metilacije DNA mnogih gena poput *VHL*, *hMLH1*, *APC* i *BRCA1* otkriveni su u sporadičnim karcinomima. Poremećaji metilacije DNA gena *hMLH1* i *hMLH2* predisponiraju osobu za pojavu karcinoma jajnika, tankog crijeva i karcinoma endometrija uz karcinom kolona. Inaktivacija ta dva gena uzrokuje mikrosatelitnu nestabilnost u tumorskim stanicama, što je direktan dokaz povezanosti epigenetičkih i genskih mutacija koje za posljedicu imaju inicijaciju i progresiju tumora. Pojačana metilacija DNA promotorske regije gena *BRCA1* pronađena je u sporadičnom karcinomu dojke (10). Geni za popravak DNA su često utišani u karcinomima zbog hipermetilacije DNA u CpG otocima njihovih promotora. No, postoji i obrnuta situacija. Hipometilacija promotora nekih gena može dovesti do pojave karcinoma, posebice protoonkogeni koji se hipometilacijom DNA transformiraju u onkogene. *PARP1* je jedan od takvih gena. Njegova prekomjerna ekspresija se pronalazi u tirozin kinaza-aktiviranim leukemijama (11).

## 4. NESTANIČNA DNA

Nestanična DNA (nsDNA, engl. *cell free DNA*, cfDNA) predstavlja raspadnute fragmente genomske DNA veličine najčešće od 50 do 200 parova baza, oslobođene najčešće u tjelesne tekućine. Budući da je daleko najviše znanstvenih i kliničkih istraživanja rađeno na nsDNA koja cirkulira u krvnoj plazmi, često se nsDNA krivo povezuje isključivo s krvi. Međutim, nsDNA je prisutna i u urinu, likvoru, ejakulatu, amnijskoj tekućini, slini, peritonealnoj tekućini i bronhalnom aspiratu, primjerice (12). NsDNA primarno nastaje apoptozom i nekrozom stanica kada biva oslobođena u međustanični prostor iz kojeg dospijeva u tjelesne tekućine, najčešće krv (13).

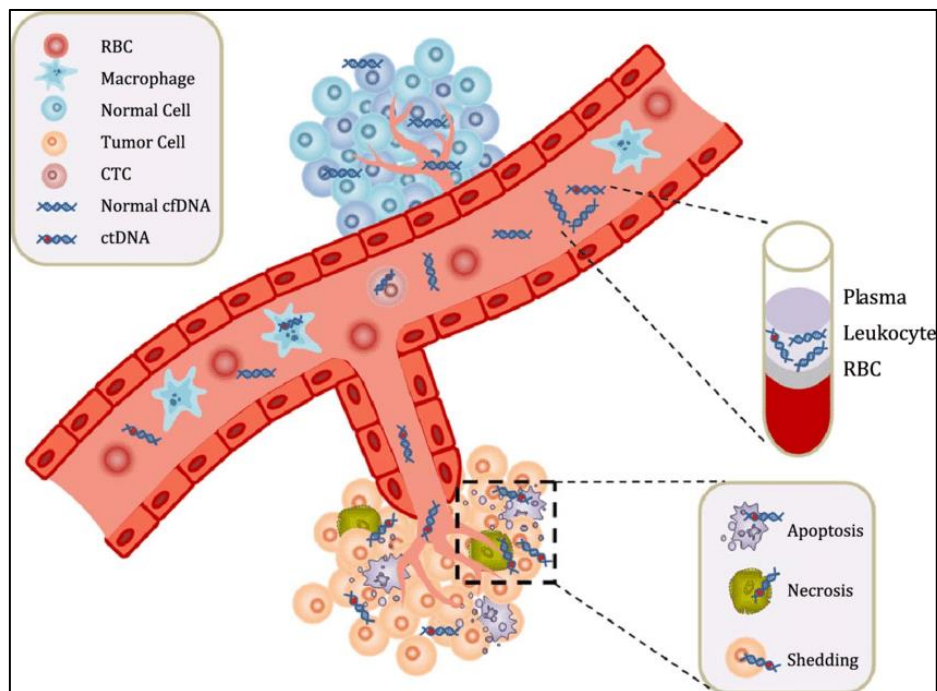
Stoga ne začuđuje činjenica da se povećana količina nsDNA pronalazi u stanjima povezanima s pojačanim intenzitetom apoptoze i nekroze, kao što su neoplastične bolesti posebice u podmaklim stadijima (14). Uistinu, dokazana je povećana količina nsDNA ne samo u karcinomima, nego i u stanjima kao što su sepsa, trauma, infarkt miokarda, diabetes i srpasta anemija (15). Zanimljivo, fiziološki kod starijih ljudi prisutna je veća razina cfDNA u krvi u usporedbi s mlađom populacijom. Koncentracija nsDNA u zdravih ljudi je oko 30 ng/ml

plazme, a može biti u rasponu od 0 do 100 ng/ml. U krvi pacijenata oboljelih od tumora, koncentracija raste i do 1000 ng/ml (16).

U literaturi se opisuju različiti tipovi nsDNA poput izvanstanične tumorske DNA odnosno cirkulirajuća tumorska DNA, izvanstanična mitohondrijska DNA i izvanstanična fetalna DNA, primjerice. Riječ je o nsDNA molekulama podrijetla iz određenih tkiva, prije nego o zasebnoj vrsti nsDNA.

## 5. CIRKULIRAJUĆA TUMORSKA DNA

Cirkulirajuća tumorska DNA (ctDNA) je nsDNA podrijetlom iz stanica tumora ili cirkulirajućih tumorskih stanica (15) (Slika 1). Razina ctDNA u cirkulaciji ovisi o lokaciji, veličini i vaskularizaciji tumora. Vrijeme poluživota ctDNA u cirkulaciji čovjeka varira od 16 minuta do 2,5 sata (17).



**Slika 1. DNA koja cirkulira u tjelesnim tekućinama slobodna od stanice (nsDNA i ctDNA) nalazi se u frakcijama seruma i plazme iz krvi, primjerice.** Mehanizam oslobađanja nsDNA i ctDNA uključuje apoptozu, nekrozu i aktivnu sekreciju iz tumorskih stanica. Jednom kad se nsDNA i ctDNA izoliraju, mogu se dalje analizirati na genske i epigenetičke promjene specifične za tumor. Izvor: *Hahn et al., 2019.*

CtDNA ulazi u krvotok na dva načina. Prvi, već navedeni, pasivni je put ovisan o apoptozi ili češće nekrozi tumorskih stanica. Tijekom apoptoze, kao posljedica enzimatskog cijepanja DNA, fragmenti ctDNA još uvijek obavijaju nukleosom i veličine su od oko 166 parova baza. Veći fragmenti, od 320 parova baza do preko 1000 parova baza, otpuštaju se tijekom nekroze tumorskih stanica. Drugi mehanizam oslobađanja ctDNA je aktivna sekrecija. Sekrecija ctDNA se odvija otpuštanjem ekstracelularnih vezikula kao što su egzosomi i proteasomi koji sadrže dijelove DNA veličine 150-250 parova baza. Pretpostavlja se da izlučivanje ctDNA od strane tumorskih stanica potpomaže razvoju tumora i metastaziranju budući da ti fragmenti ctDNA djeluju kao signalne molekule. Uistinu, nekoliko neovisnih studija već je opisalo da je ctDNA potencijalno uključena u tumorogenezu i nastajanje metastaza. Ubrizgavanjem NIH-3T3 stanica, prethodno tretiranih s plazmom pacijenata koji boluju od kolorektalnog karcinoma sa *KRAS* mutacijom, u miša, došlo je do razvoja tumora te detekcije ljudskih *KRAS* mutacija u plazmi miševa. Nadalje, uočeno je da bi ctDNA mogla promovirati proliferaciju stanica hormonski pozitivnog karcinoma dojke aktivacijom TLR9-NF- $\kappa$ B-ciklin D1 puta.

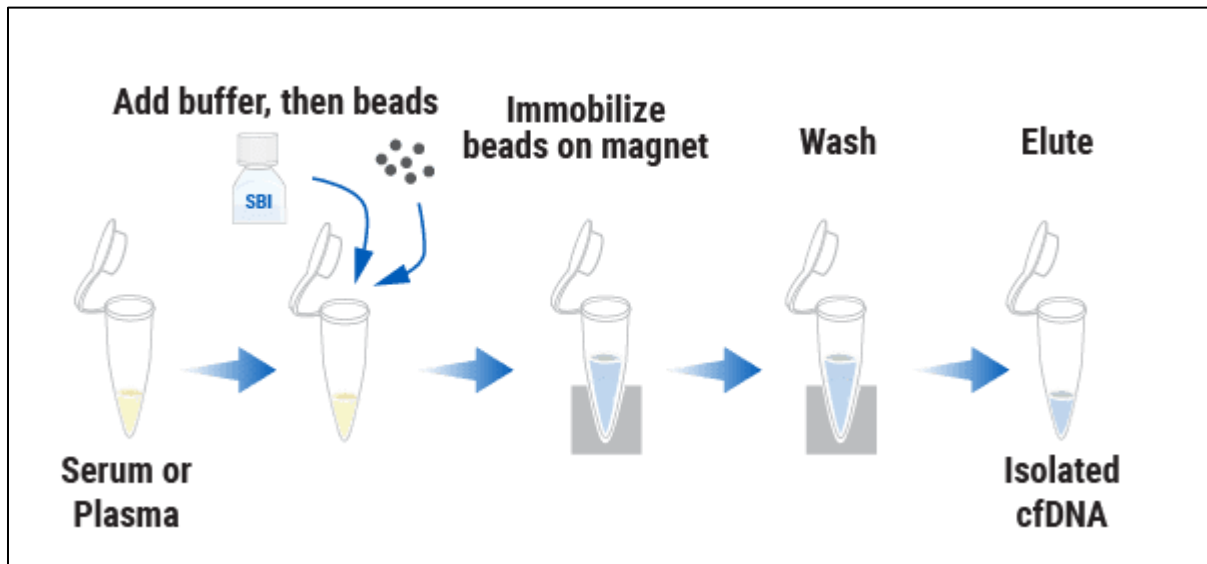
CtDNA se može naći i u urinu, što je izrazito korisno u dijagnostici i liječenju pacijenata s urogenitalnim tumorima. U sedimentu urina kod tri pacijenta s invazivnim karcinomom mokraćnog mjehura pronađene su mutacije gena *P53* (18). Longitudinalno praćenje ctDNA kod pacijenata s invazivnim karcinomom mokraćnog mjehura prije i poslije neoadjuvantne kemoterapije pomaže u predviđanju ishoda bolesti (19). Zanimljivo, analizom ctDNA u urinu mogu se pratiti ne samo urogenitalni nego i tumori ostalih organskih sustava. Naime, praćenjem 10 pacijenata s hepatocelularnim karcinomom, kod 5 pacijenata magnetskom rezonancom je potvrđen povratak hepatocelularnog karcinoma i kod svih 5 pacijenata su nađene detektibilne razine ctDNA u urinu i do 9 mjeseci prije povratka bolesti (20).

## **6. METODE IZOLACIJE nsDNA**

Izolacija nsDNA najčešće zahtjeva oko 3 mL krvi u EDTA obavijenim epruvetama. EDTA je potrebna za sprečavanje koagulacije krvi. Zatim se serum ili plazma odvajaju postupcima centrifugiranja, nakon čega slijedi sama izolacija nsDNA pomoću različitih kućnih protokola ili komercijalno dostupnih kompleta. U kliničkoj praksi koriste se gotovo isključivo komercijalno dostupni kompleti poput QIAamp, PME, Maxwell RSC ccfDNA Plasma kit, EpiQuick Circulating Cell-Free DNA Isolation Kit i NEXTprep-Mag cfDNA Isolation Kit, primjerice (21) (Slika 2). Valja napomenuti da svi kućni protokoli i komercijalno dostupni



kompleti izoliraju nsDNA iz uzorka. CtDNA predstavlja samo jednu frakciju izolirane nsDNA, i to frakciju podrijetla iz tumorskih stanica u ukupnom izolatu nsDNA podrijetla iz stanica svih ostalih tkiva.



**Slika 2. Prikaz protokola izolacije nsDNA jednim od komercijalnih kompleta.** Izolacija nsDNA u kliničkoj se praksi izvodi koristeći gotovo isključivo komercijalno dostupne komplete. Ovakva izolacija standardizirana je, jednostavna i brza te pruža maksimalnu sigurnost u kvalitetu izolata. Izvor: <https://systembio.com>.

## 7. METODE ANALIZE nsDNA

Analize nsDNA nakon izolacije zahtijevaju korištenje različitih amplifikacijskih i sekvencirajućih metoda. Sekvenciranje čitavog genoma ili egzona tumora dobivenog tkivnom biopsijom pomaže u otkrivanju genetskih i epigenetičkih mutacija specifičnih za tumor što zatim može biti korišteno za ciljano sekvencioniranje nsDNA te detekciju i analizu frakcije ctDNA u pacijenata.

Najveću osjetljivost detekcije ctDNA pruža ciljano traženje specifičnog SNP-a (mononukleotidnog polimorfizma). Često mutirani geni u tumoru, najčešće onkogeni, koji uglavnom imaju tipična žarišta mutacija, dobri su kandidati za pristup ciljanog sekvencioniranja. Neke od metoda analize ctDNA su ddPCR, BEAMing, CAPP-Seq, TAM-Seq, Safe-Seq, Duplex sekvenciranje, iDES–pojačano CAPP-Seq i pirosekvenciranje (17).

Valja napomenuti da su sve metode, inače prikladne za sekvencioniranje nsDNA odnosno ctDNA u cilju identifikacije i kvantifikacije genskih mutacija, prikladne i za detekciju i kvantifikaciju epimutacija metilacije DNA. Naime, budući da epimutacije podrazumijevaju nepromijenjenu sekvencu DNA, a metode sekvenciranja analiziraju upravo samu sekvencu, moglo bi se zaključiti suprotno. Ipak, postupkom bisulfitne konverzije nsDNA, koji prethodi samom sekvenciranju, metilacija DNA se iz epigenetičke oznake konvertira u metodološku mutaciju koja se može indentificirati sekvencioniranjem kao i biološka mutacija. Postupkom bisulfitne konverzije svi nemetilirani citozini nsDNA pretvaraju se u timine, dok metilirani citozini ostaju citozini. Uz informaciju o slijedu nukleotida u bisulfitno netretiranoj nsDNA odnosno ctDNA, na ovaj način se sekvencioniranjem jako jednostavno identificiraju DNA metilacijske točke i eventualne epigenetičke promjene u nsDNA i ctDNA pacijenta.

### **7.1. ddPCR**

Digital droplet PCR (ddPCR) je metoda koja koristi generator kapljica kako bi se pojedini fragment nsDNA integrirao u zasebnu kapljicu pomoću emulzije ulja i vode. Tada se iniciraju lančane reakcije polimeraze u svakoj pojedinoj kapljici koristeći specifične početnice komplementarne ctDNA od interesa. Početnice su obilježene fluorosecentnim sondama, koje služe za detekciju amplikona koji nastaje samo ukoliko postoji fragment od interesa u kapljici. Time se može odrediti apsolutna koncentracija ctDNA od interesa u danom uzorku. Stoga ddPCR omogućuje visoko kvantitativnu procjenu frekvencije mutacija, ali je limitiran brojem fluorescentnih sonde koje se mogu koristiti u jednom testu . Osjetljivost testa varira ovisno o količini analizirane DNA (22).

### **7.2. BEAMing**

BEAMing, punog naziva *Beads, Emulsification, Amplification and Magnetics*, predstavlja modifikaciju prethodno opisane metode odnosno kombinaciju ddPCR-a i protočne citometrije. Nakon što se nsDNA, odnosno ctDNA, izolira iz krvi, ddPCR se izvodi s početnicama dizajniranim ciljano za područja od interesa. Amplificirana DNA se pomiješa s magnetskim kuglicama obloženima streptavidinom i emulgira u kapljice. Još se koristi biotinizacija koja omogućava amplificiranoj DNA da se veže za magnetske kuglice obložene streptavidinom. Nakon što je PCR završio, kuglice na koje su vezane DNA se odvajaju magnetom. DNA na

kuglicama se denaturira i hibridizira s fluorescentnim oligonuklotidima specifičnim za svaku DNA mutaciju odnosno epimutaciju. Nakon toga se kompleksi kuglica-DNA analiziraju protočnom citometrijom. Prednost ove metode u odnosu na klasični ddPCR je ta što nije limitirana brojem fluorescentnih sonda te se veći broj različitih DNA mutacija ili epimutacija može ispitati istovremeno u istom uzorku (23).

### **7.3. CAPP-Seq**

CAPP-Seq (*engl. CAncer Personalized Profiling sekvenciranje*) koristi biotinizirane oligonukleotide specifičnih sekvenci za detekciju ctDNA. Javno dostupne baze podataka za karcinome koriste se za izradu biblioteke sonda koje se potom koriste u istraživanjima. Protokol je idealan za niske koncentracije ctDNA, što je česta pojava. Ova tehnika omogućuje ispitivanje stotina regija DNA (24).

### **7.4. TAM-Seq**

TAM-Seq (*engl. Tagged AMplicon sequencing*) metoda je koja omogućuje ciljano sekvenciranje cijelih gena iz fragmenata ctDNA. Prvo se izvodi opća amplifikacija ctDNA pomoću početnica koje obuhvaćaju cijeli gen od interesa u fragmentima od 150 do 200 parova baza. Zatim se ponovno provodi amplifikacija DNA, ali sada specifično ciljnog fragmenta ctDNA. U drugu amplifikacijsku reakciju dodaje se adapter koji se poveže s ampliconima i služi kao svojevrsni barkod za identifikaciju amplicona. Ova metoda se pokazala uspješnom kod identificiranja raštrkanih mutacija u genu *P53* kod pacijenata s uznapredovanim karcinomom jajnika, primjerice (25).

### **7.5. Safe-seq**

Safe-seq je metoda koja smanjuje stopu pogreške masovnog paralelnog sekvenciranja kako bi se povećala osjetljivost na rijetke mutacije. To se postiže dodavanjem sekvence jedinstvenog identifikatora. DNA se zatim amplificira pomoću dodanih sekvenci. Sve DNA molekule s istom sekvencijom jedinstvenog identifikatora bi trebale imati istu sekvenciju DNA jer su amplificirane iz jedne molekule. Mutacija se smatra „supermutantom“ ako se 95% sekvencioniranih očitovanja slaže (22).

## 7.6. Duplex sekvenciranje

Duplex sekvenciranje predstavlja poboljšanu modifikaciju Safe-seq metode. Randomizirana dvolančana DNA djeluje kao jedinstvena oznaka i pričvršćena je na invarijantni odstonik. Oznake su pričvršćene na oba kraja DNA fragmenta ( $\alpha$  i  $\beta$  oznake), što rezultira dvama jedinstvenim predlošcima za PCR. Jedan lanac s  $\alpha$  oznakom na 5' kraju i  $\beta$  oznakom na 3' kraju, a drugi lanac s  $\beta$  oznakom na 5' kraju i  $\alpha$  oznakom na 3' kraju. Ti se DNA fragmenti zatim amplificiraju. Amplificirana DNA se sekvencira i analizira. DNA s duplex adapterima se uspoređuju i mutacije se prihvaćaju samo ako postoji konsenzus između oba lanca. Ova metoda uzima u obzir i greške u sekvenciranju i greške u ranoj fazi PCR amplifikacije (26).

## 7.7. iDES-pojačano CAPP sekvenciranje

iDES (engl. *Integrated Digital Error Supression*) pojačano CAPP sekvenciranje metoda je koja poboljšava CAPP-seq analizu ctDNA kako bi smanjila pogrešku i time povećala osjetljivost detekcije. iDES kombinira CAPP-seq s duplex sekvenciranjem i s računalnim algoritmom koji uklanja stereotipne greške povezane s korakom hibridizacije u CAPP sekvenciranju (24).

## 7.8. Pirosekvenciranje

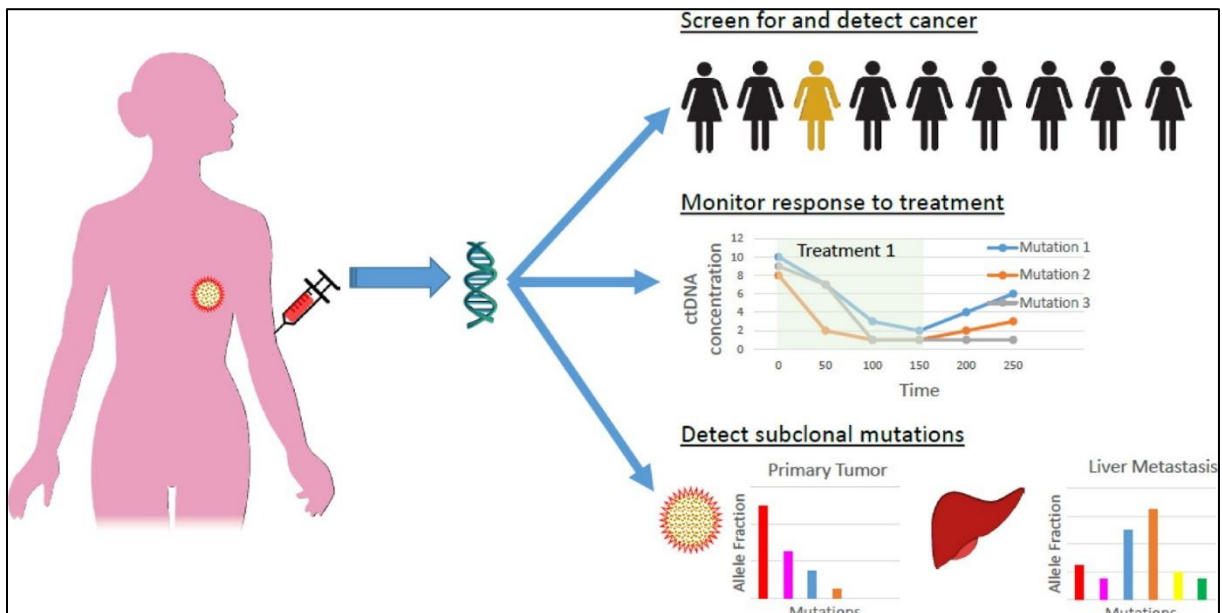
Pirosekvenciranje je jedan od prvih sustava sekvenciranja nove generacije. Danas je još u upotrebi budući da posjeduje najbolji omjer detekcijske moći i cijene same analize. Ipak, pirosekvenciranjem se mogu analizirati omanji fragmenti DNA ponajviše veličine do 150 pb. Upravo ga to ograničenje čini idealnim za analizu specifičnih fragmenata nsDNA odnosno ctDNA. Pirosekvenciranje također koristi kuglice obložene streptavidinom te amplifikaciju DNA fragmenta od interesa s početnicama konjugiranim biotinom. Samo sekvencioniranje temelji se na proizvodnji svjetla tijekom reakcije sinteze lanca DNA *de novo*.

## 8. POTENCIJALNA PRIMJENA nsDNA KAO BIOMARKERA TUMORA

Mnogobrojna istraživanja su pokazala mogućnost primjene nsDNA odnosno ctDNA u onkološkoj kliničkoj praksi posebice u dijagnostici tumora ali i u molekularnoj stratifikaciji kod dijagnoze, prognozi liječenja te otkrivanja rezistencije, recidiva i minimalno rezidualne bolesti.

## 8.1. Probir i rana dijagnostika

Rano otkrivanje karcinoma predstavlja trenutno jedan od najznačajnijih potencijala primjene nsDNA u medicinskoj praksi (Slika 3). Uspješnost ranog otkrivanja tumora raste uz kombiniranje različitih metoda i pristupa u samom dijagnostičkom protokolu. Nedavna studija koja kombinira detekciju proteinskih biomarkera i detekciju mutacija nsDNA u 8 različitih tipova karcinoma, postigla je osjetljivost od 73% za karcinome drugog stadija i 49% osjetljivosti za karcinome prvog stadija uz specifičnost iznad 99 % (27). Treba uzeti u obzir da je studija imala ispitanike kojima je karcinom već bio dijagnosticiran, ali pokazuje potencijalnu korist kombiniranja nsDNA s ostalim biomarkerima za probir karcinoma.



**Slika 3. Prikaz tekuće biopsije i potencijalne primjene analize genskih i epigenetičkih promjena u nsDNA kao biomarkera tumora.** U bolesnika s rakom, dio nsDNA potječe iz tumorskih stanica. Tu frakciju nazivamo ctDNA, koja ima iste mutacije i epimutacije kao i tumor. Razvoj novih, učinkovitijih metoda za otkrivanje tih promjena doveo je do povećanog interesa za razvoj nsDNA i ctDNA kao biomarkera tumora s potencijalom translacije u kliničku praksu posebice probir, rano otkrivanje, prognozu, praćenje odgovora na terapiju i praćenje porasta novih mutiranih subklonova. Izvor: *VanLiere Canzoniero et al., 2016.*

Apsolutne razine nsDNA te genske mutacije i epigenetičke promjene prisutne u ctDNA frakciji pokazuju se kao potencijalno korisnim biomarkerima biologije, progresije i odgovora na

terapiju gastrointestinalnih tumora. Štoviše, studije su pokazale diskriminacijsku točnost razine ctDNA za dijagnozu karcinoma probavnog sustava u usporedbi s benignim upalnim bolestima. Stoga ctDNA otkrivena u krvi nudi minimalno invazivnu i lako ponovljivu pretragu za rano otkrivanje raka, olakšavajući dinamičku analizu ponašanja tumora u stvarnom vremenu koja bi mogla revolucionirati i kliničku i istraživačku praksu u onkologiji (28).

Nekoliko je studija pokazalo korisnost analize tumor specifičnih genskih mutacija i epigenetičkih promjena nsDNA, poput gubitka heterozigotnosti, učestalosti mutacija, promjena mikrosatelita i metilacije gena u uzorcima krvi pacijenta, a u cilju rane dijagnoze tumora jetre i gušterače. Međutim, provedeno je svega nekoliko dobro osmišljenih ispitivanja kako bi se ovi nalazi učinkovito mogli translirati u kliničku praksu (29).

Podaci o promjeni metilacije DNA dobiveni na nsDNA mogu biti korišteni kao biomarkeri za detekciju epigenetičkih deregulacija gena specifično povezanih sa razvojem i progresijom tumora te rezistencijom. Hipermetilacija promotora gena *RASSF1A*, *FHIT* i *APC* nađena u nsDNA pokazala se kao snažan dijagnostički marker za karcinom bubrega u ranom stadiju s osjetljivošću od 56.8 % i specifičnošću od 96.7 % (30).

U relativno nedavno provedenoj prospektivnoj studiji istraživači su prikupili 30 primarnih tumora dojke i pripadajuće uzorke krvi prije i poslije operacije od bolesnika s rakom dojke u ranoj fazi. Tumori su analizirani Sangerovim sekvenciranjem na uobičajene *PIK3CA* mutacije, a zatim je DNA iz ovih tumora i podudarne plazme analizirana na *PIK3CA* mutacije pomoću ddPCR. Rezultati su pokazali da je analiza nsDNA iz plazme, od 15 mutacija *PIK3CA* otkrivenih u tkivu tumorima pomoću ddPCR, 14 identificirano u pre-kirurškoj nsDNA pacijenata. Ova studija pokazala je da se navedene mutacije nsDNA mogu detektirati u bolesnika s rakom dojke u ranoj fazi (31).

Nadalje, kako bi se ispitala vrijednost analize metilacija nsDNA kao potencijalnog biomarkera za rano otkrivanje raka dojke, provedeno je istraživanje učestalosti aberantne metilacije četiri gena kandidata (*APC*, *GSTP1*, *RASSF1A* i *RARB2*) u plazmi 93 žene s rakom dojke i 76 kontrola. Rezultati su pokazali da je metilacija nsDNA barem jednog gena rezultirala osjetljivošću od 62 % i specifičnošću od 87 % u otkrivanju raka dojke. Štoviše, test je uspješno otkrio 33 % (8 od 24) tumora u ranoj fazi (32).

Ukratko, iz mnogih istraživanja može se izvući generalni zaključak da u tumora s najvećom učestalošću promjena metilacije nsDNA najčešće se pronalazi u genima *SHOX2* za rak pluća, *RASSF1A*, *RARB2* i *GSTP1* za karcinome pluća, dojke, genitourinarnog sustava i debelog

crijeva te *SEPT9* za rak debelog crijeva. Štoviše, testovi zasnovani na analizi metilacije nsDNA komercijalno su dostupni (33).

## **8.2. Odabir terapije**

Detekcija tumor specifičnih mutacija u nsDNA može biti korištena za stratifikaciju pacijenata prema terapiji izbora te za vođenje terapije (adjuvantna terapija, endokrina terapija i imuno terapija, primjerice). Testiranje nsDNA PCR-om na *EGFR* mutacije se trenutno koristi kod karcinoma pluća nemalih stanica. Uzimanje tkivnih uzorka za biopsiju kod NSCLC je otežano (34), a visoka korelacija između mutacija tumora i istih nađenih u plazmi pacijenta je ubrzala kliničku primjenu analize nsDNA u ovom tipu karcinoma. Naime, tumori u pacijenata s detektiranom *EGFR* mutacijom osjetljivi su na EGFR inhibitore (35). Dva testa, Therascreen EGFR i Cobas EGFR, odobrena su od strane Europske agencije za lijekove i Američke agencije za hranu i lijekove.

## **8.3. Prognoza bolesti i praćenje pacijenata**

Analizom nsDNA može se postaviti točnija prognoza bolesti i odgovor na liječenje. Količina nsDNA korelira sa stadijem (36) i veličinom karcinoma (37). Pokazano je da tumori u kasnijim stadijima izlučuju u plazmu od 10 do 100 puta veće količine ctDNA nego tumori u ranijim stadijima (22). Povećana razina ctDNA se također nalazi kod pacijenata s metastatskom bolesti (38). Uistinu, količina ctDNA, odnosno nsDNA, u tekućim biopsijama može biti mjera težine bolesti i ukazati na prognozu iste. Primjerice, u studiji provedenoj nakon liječenja pacijenata sa stadijem I-III kolorektalnog karcinoma, pacijenti s detektabilnom razinom ctDNA su imali stopu preživljenja od 48 % unutar dvije godine od završetka liječenja dok su pacijenti koji nisu imali detektabilnu razinu koncentracije ctDNA imali stopu preživljenja od 100 % u istom vremenskom razdoblju praćenja (39). Razine ctDNA prije liječenja također mogu biti korištene u prognostičke svrhe. Pacijenti s malom razinom ctDNA (<25 percentila) su imali razinu kontrole bolesti 42 %, dok pacijenti s visokom razinom ctDNA (>75 percentila) su imali razinu kontrole bolesti 0 % nakon 9 tjedana (40). Visoke razine ctDNA prije početka liječenja koreliraju s visokom rezistencijom u različitim tipova tumora, a vrijedi i obrnuto. Niske razine ctDNA ili odsutnost iste znači bolji odgovor na terapiju (41).

CtDNA ima potencijalno veliku prognostičku vrijednost u vođenju bolesnika s karcinomom. Praćenje onkoloških pacijenata mjerenjem razine nsDNA je jedna od mogućnosti kliničke primjene ove tehnologije. No, zbog pokazane velike varijacije količine nsDNA između pacijenata s istim stadijem i vrstom karcinoma (22), taj pristup bi trebao biti snažno individualiziran. Osim razlike u prisutnosti metastaza, ta varijacija se djelomično može objasniti širokim spektrom bioloških i fizioloških faktora koji moduliraju brzinu nastajanja i uklanjanja cfDNA. Neki od tih faktora su vaskularizacija tumora, histološke razlike, tumorska aktivnost i razina proliferacije (42). Uz to, limitirajući element oslobađanja nsDNA iz tumora u krvotok može biti i sijelo tumora. Primjerice, tumor središnjeg živčanog sustava oslobađa manju količinu nsDNA u krv zbog krvno-moždane barijere.

#### **8.4. Praćenje rezistencije i mutacijskog statusa tumora**

NsDNA se može koristiti za praćenje razvoja rezistencije tumora, bilo analizom prisutnosti poznatih mutacija i epimutacija koje uzrokuju rezistenciju (43) ili identifikacijom novih. Redovno monitoriranje može otkriti nastanak mutacije ili epimutacije i prije kliničke progresije tumora. Intervencija tada može biti pravovremena i znatno poboljšati pozitivne izgleda za pacijenta. Uistinu, u studiji na pacijenatima s kolorektalnim karcinomom koji su primali anti-EGFR terapiju, *KRAS* mutacija se pojavila 5 do 6 mjeseci prije nego je došlo do kliničke progresije bolesti (44).

Detektirana hipermetilacija promotora *MLH1* gena je asocirana s lošijom prognozom i preživljenjem bez progresije tumora te se smatra potencijalnim prediktivnim biomarkerom za stečenu rezistenciju kod karcinoma jajnika (45). Slično tome, detekcija metilacije DNA promotora gena *ESR1* u nsDNA asocirana je s manjkom odgovora na terapiju everolimusom/egzemestanom kod pacijenata s karcinomom dojke s razvijenim metastazama (46).

Nadalje, postoji velika klinička potreba za određivanje mutacijskog statusa tumora kod pacijenata kod kojih se razmatra uporaba terapije specifičnim antitijelima ili inhibitorima tirozin kinaze. Kod melanoma, pacijent će imati koristi od terapije inhibitorom serin-treonin protein kinaze BRAF (vemurafenib ili dabrafenib) samo ako je prisutna *BRAF* V600E mutacija. Kod pacijenata s kolorektalnim karcinomom ako je prisutna mutacija *KRAS* gena, teško da će terapija anti-EGFR protutijelima pomoći pacijentu. Dok je tkivna biopsija tumora standard, pokazano je da samo često jedna biopsija nije dovoljna za točan odabir terapije i praćenje



mutacijskog statusa tumora. Stoga se poseže za više biopsija ili za opetovanim biopsijama što je često izrazito problematično za same pacijente, ali nosi i povećani rizik za raznim komplikacijama. Također, invazivne biopsije se ne bi smjele provoditi kod pacijenata s metastatskim stadijem bolesti ili kod pacijenata s više morbiditeta. Te prepreke se mogu nadvladati korištenjem analize nsDNA iz tekućih biopsija ili drugih izvora poput lavaža. Procedura je manje invazivna u odnosu na tkivnu biopsiju i može se provoditi više puta, te je idealni pristup za praćenje mutacijskog statusa tumora a samim time i povoljnim odabirom terapije (42).

Ukratko, efektivnost terapije se može vremenom smanjiti upravo zbog novostečenih mutacija u tumora. Mutacije mogu nastati *de novo* ili ekspanzijom subklonalne populacije stanica s već postojećom rezistencijom. S mogućnošću kontinuiranog neinvazivnog serijskog uzimanja krvi za analizu nsDNA, otvara se prostor za praćenje mutacijskog statusa tumora i eventualnih promjena odnosno odgovora na terapiju s mogućnošću ranije intervencije ako je potrebno (42).

### **8.5. Detektiranje minimalno rezidualne bolesti**

NsDNA ima veliki potencijal u detektiranju minimalno rezidualne bolesti. U studiji iz 2015. godine, kod pacijentica s lokaliziranim tumorom dojke, visoke razine ctDNA postoperativno su bile indikator metastatskog relapsa. Ako je ctDNA bila detektirana, zahvat koji je trebao biti kurativan to nije bio te je došlo do relapsa bolesti za 8 mjeseci (47). Detekcija ctDNA nakon resekcije kod pacijenata s karcinomom kolona u II. stadiju predviđjela je recidiv bolesti u 100 % slučajeva u periodu od 3 godine. Kod pacijenata kod kojih nije bilo moguće detektirati ctDNA, recidiv bolesti zabilježen je tek u 10 % pacijenata u istom promatranom periodu (48).

## **9. TRENUTNE PREPREKE U KORIŠTENJU nsDNA KAO KLINIČKI STANDARD**

Neke od trenutnih prepreka koje stoje na putu snažnije primjene nsDNA kao standardnog biomarkera za kliničku uporabu kod onkoloških oboljenja su manjak standardizacije u predanalitičkoj obradi (način uzimanja uzorka, način skladištenja uzorka, način pripreme uzorka) ali i nedostatak standardizacije u samoj tehnologiji i kontekstualizaciji rezultata analize nsDNA odnosno ctDNA. Često su znanstveni podaci čak i kontradiktorni, što znatno usporava i otežava translaciju ove tehnologije i pristupa u kliničku praksu. Manjak standardizacije dovodi

i do veće mogućnosti kontaminacije uzorka pogreškom u procesu što onda može uzrokovati krivu interpretaciju podataka (49).

Limitacija uporabe nsDNA u ranoj dijagnostici tumora je mali udio ctDNA u ukupno izoliranoj nsDNA što zahtjeva testove velike osjetljivosti. Na primjer, kod pacijenata oboljelih od karcinoma pluća nemalih stanica u ranim stadijima bolesti postotak ctDNA u krvi pacijenta može biti manji od 0.5% od ukupne nsDNA u krvi. Ako uzmemo efikasnost procesa od 100 % (svaka molekula nsDNA se uspije analizirati), 90 ng cfDNA je potrebno za test 95 %-tne osjetljivosti da detektira 0.01 % VAF alele (engl. *variant allele frequency*). Trebalo bi nam 39.1 mililitara plazme za pojedinog pacijenta. Uzevši u obzir da je postotak plazme oko 55 %, trebalo bi nam 71.1 mL krvi po pacijentu. Budući da efikasnost nije 100% nego oko 25-50%, trebalo bi nam 150 do 300 mL krvi što je visoki postotak ukupne količine krvi kod odrasle osobe (50).

Zbog tkivnih specifičnosti, poput krvno-moždane barijere, korištenje nsDNA u dijagnostici tumora središnjeg živčanog sustava je izrazito limitirana, a to naročito vrijedi za inkapsulirane tumore u kojima je ctDNA u nedetektabilnim razinama (51). Korisnost likvora kao izvora ctDNA ostaje još za istražiti.

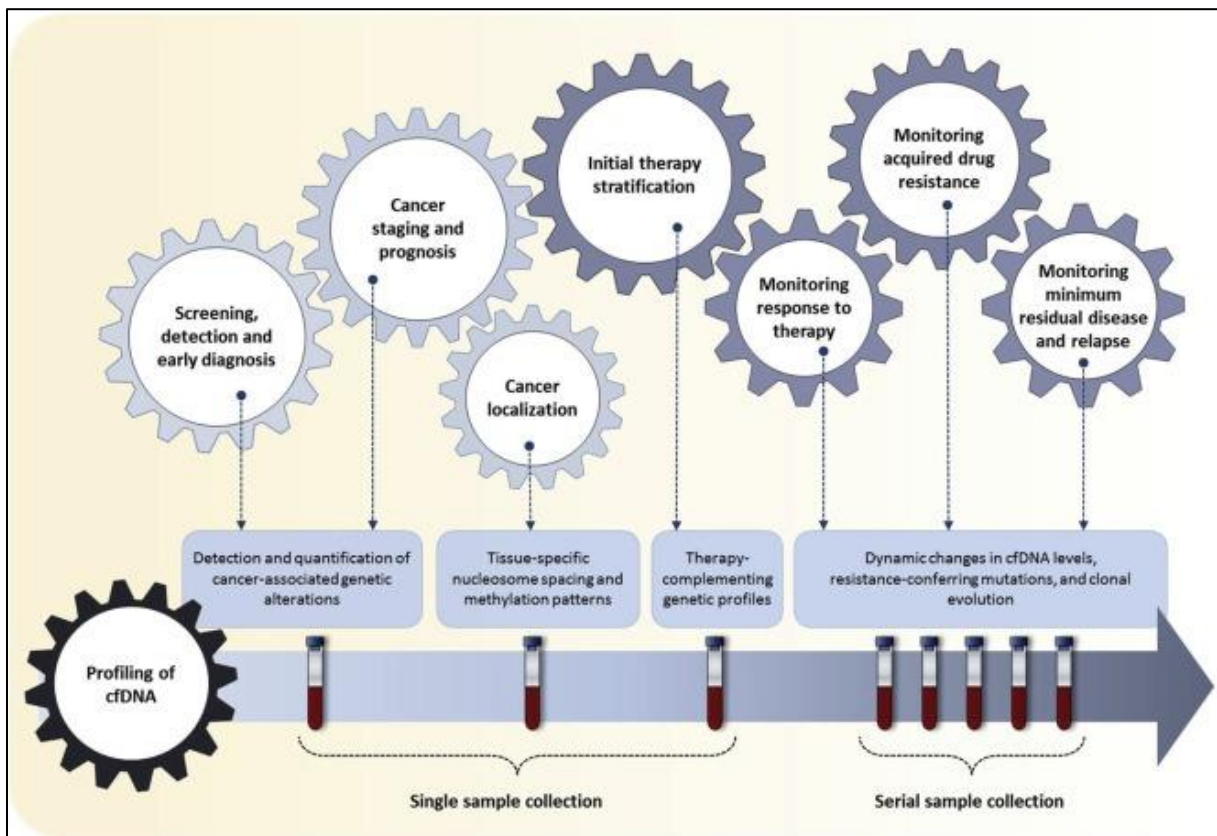
Razine nsDNA su povećane i kod netumorskih bolesti kao što su diabetes, bolesti jetre, infekcije i kardiovaskularne bolesti, primjerice. Količina frakcije ctDNA u takvim stanjima može biti dodatno smanjena i konačno premala za detekciju što smanjuje osjetljivost analize i stvara lažno negativne rezultate pretrage (42).

Ipak, valja napomenuti da je primjena nsDNA odnosno ctDNA kao biomarkera u onkološkoj kliničkoj praksi, relativno novog datuma. Uistinu, ovo je područje iznimno dinamično s mnoštvom znanstvenih i kliničkih istraživanja te prijava iskustava iz kliničke prakse, a u cilju razvoja ovog pristupa i tehnologije te snažnije translacije u onkološku kliničku praksu.

## **10. ZAKLJUČAK**

NsDNA pokazuje veliki potencijal kao svestrani biomarker s potencijalnom primjenom u onkologiji (Slika 4). Prije svega, neinvazivnost ovog pristupa je iznimna prednost nsDNA tehnologije u uzorcima tekućinskih biopsija u odnosu na tkivne biopsije općenito, a posebice u dijagnostici tumora. Omogućuje manje rizične i za pacijenta poštenije pretragu za praćenje tijeka bolesti. Analiza same nsDNA proizašle iz tumorskih stanica, odnosno ctDNA, pruža mogućnost ordiniranja usmjerenije terapije i praćenje mutacijskog statusa tumora uz mogućnost

identifikacije stečene rezistencije i pravovremenu intervenciju uz promjenu terapije. Ova tehnologija također je primjenjiva za korištenje u probiru i ranoj dijagnostici tumora čak i prije pojave kliničke slike. Trenutne prepreke koje predstavljaju izazov na putu snažnije translacije u redovnu kliničku praksu su manjak standardizacije procesa u predanalitičkoj fazi kao i u samoj analizi nsDNA. Svakako su potrebni osjetljiviji testovi jer se često radi s malim količinama nsDNA što posebice vrijedi u ranijim stadijima tumora.



Slika 4. Potencijalne primjene nsDNA u kliničkoj onkološkoj praksi. Profiliranje genskih i epigenetičkih promjena povezanih s rakom u nsDNA može omogućiti masovni pregled zdravih ili rizičnih skupina za rano otkrivanje tumora. Nadalje, analiza nsDNA pokazuje izniman potencijal za primjenu u kliničkoj praksi posebice u klasifikaciji tumora, odabiru najbolje terapije i praćenju pojave rezistencije, praćenju i predviđanju minimalne rezidualne bolesti i recidiva nakon operacije ili terapije te ukupnoj prognostici tijekom bolesti. Izvor: *Bronkhorst et al., 2019.*

## **ZAHVALE**

Zahvaljujem se svom mentoru, izv. prof. dr. sc. Nini Sinčiću na pomoći, savjetovanju i vođenju pri pisanju ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se svojoj djevojci Antoniji na potpori, strpljenju i razumijevanju tijekom studiranja. Zahvaljujem se svojim roditeljima i sestrama na podršci. Hvala i baki Katici na velikoj pomoći tijekom studiranja ovih 6 godina.

Ovaj Diplomski rad izrađen je uz potporu Hrvatske zaklade za znanost u okviru Uspostavnog istraživačkog projekta „Epigenetički biomarkeri prostate“ (epiPro, UIP-2017-05-8138).

## 11. LITERATURA

1. Turnpenny PD, Ellard S. Emery's Elements of Medical Genetics. Fifteenth edition. Elsevier; 2017., str. 9 - 23.
2. Cooper GM. The cell: a molecular approach. Eighth edition. Oxford; New York: Sinauer Associates, an imprint of Oxford University Press; 2019., str. 113 - 121.
3. Cooper GM. The cell: a molecular approach. Eighth edition. Oxford; New York: Sinauer Associates, an imprint of Oxford University Press; 2019., str 187. - 195
4. Goldman R, Shields PG. Food Mutagens. The Journal of Nutrition. 1. ožujka 2003;133(3):965S-973S.
5. Nagao M, Ushijima T, Toyota M, Inoue R, Sugimura T. Genetic changes induced by heterocyclic amines. Mutat Res. 12. svibnja 1997.;376(1-2):161-7.
6. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. Oncogene. 21. listopada 2002;21(48):7435-51.
7. Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. Semin Reprod Med. rujna 2009;27(5):351-7.
8. Cooper GM. The cell: a molecular approach. Eighth edition. Oxford; New York: Sinauer Associates, an imprint of Oxford University Press; 2019., str 301. - 311.
9. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. Proc Natl Acad Sci U S A. 26. srpanj 2005.;102(30):10604-9.
10. BANNO K, KISU I, YANOKURA M, TSUJI K, MASUDA K, UEKI A, et al. Epimutation and cancer: A new carcinogenic mechanism of Lynch syndrome. Int J Oncol. 25. lipanj 2012;41(3):793-7.
11. Muvarak N, Kelley S, Robert C, Baer MR, Perrotti D, Gambacorti-Passerini C, et al. c-MYC Generates Repair Errors via Increased Transcription of Alternative-NHEJ Factors, LIG3 and PARP1, in Tyrosine Kinase-activated Leukemias. Mol Cancer Res. travanj 2015;13(4):699-712.

12. Hui L, Maron JL, Gahan PB. Other Body Fluids as Non-invasive Sources of Cell-Free DNA/RNA. In: Gahan PB, editor. *Circulating Nucleic Acids in Early Diagnosis, Prognosis and Treatment Monitoring: An Introduction* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2015 [citirano 19. lipnja 2021.]. p. 295–323. (Advances in Predictive, Preventive and Personalised Medicine). Dostupno na: [https://doi.org/10.1007/978-94-017-9168-7\\_11](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9168-7_11)
13. Teo YV, Capri M, Morsiani C, Pizza G, Faria AMC, Franceschi C, et al. Cell-free DNA as a biomarker of aging. *Aging Cell*. veljača 2019.;18(1):e12890.
14. Shaw JA, Stebbing J. Circulating free DNA in the management of breast cancer. *Ann Transl Med*. siječanj 2014.;2(1):3
15. Butt AN, Swaminathan R. Overview of Circulating Nucleic Acids in Plasma/Serum. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1137(1):236–42.
16. Gedvilaitė V, Schveigert D, Cicėnas S. Cell-free DNA in non-small cell lung cancer. *Acta Med Lituanica*. 2017;24(2):138–44.
17. Elazezy M, Joosse SA. Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 1. siječanj 2018.1;16:370–8.
18. Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall F, et al. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science*. 3. svibanj 1991.;252(5006):706–9.
19. Patel KM, van der Vos KE, Smith CG, Mouliere F, Tsui D, Morris J, et al. Association Of Plasma And Urinary Mutant DNA With Clinical Outcomes In Muscle Invasive Bladder Cancer. *Sci Rep*. 17. srpanj 2017.;7(1):5554.
20. Hann H-W, Jain S, Park G, Steffen JD, Song W, Su Y-H. Detection of urine DNA markers for monitoring recurrent hepatocellular carcinoma. *Hepatoma Res*. 2017;3:105–11.
21. Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V, Roeyen G, Lardon F, Rolfo C, et al. A Comparison of Cell-Free DNA Isolation Kits: Isolation and Quantification of Cell-Free DNA in Plasma. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 1. siječanj 2017;19(1):162–8.
22. Butler TM, Spellman PT, Gray J. Circulating-tumor DNA as an early detection and diagnostic tool. *Curr Opin Genet Dev*. veljača 2017.;42:14–21.

23. Diehl F, Li M, He Y, Kinzler KW, Vogelstein B, Dressman D. BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat Methods*. srpanj 2006;3(7):551–9.
24. Newman AM, Lovejoy AF, Klass DM, Kurtz DM, Chabon JJ, Scherer F, et al. Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol*. svibanj 2016;34(5):547–55.
25. Forshew T, Murtaza M, Parkinson C, Gale D, Tsui DWY, Kaper F, et al. Noninvasive Identification and Monitoring of Cancer Mutations by Targeted Deep Sequencing of Plasma DNA. *Science Translational Medicine*.30. svibanj 2012.;4(136):136ra68-136ra68.
26. Kennedy SR, Schmitt MW, Fox EJ, Kohn BF, Salk JJ, Ahn EH, et al. Detecting ultralow-frequency mutations by Duplex Sequencing. *Nat Protoc*. studeni 2014.;9(11):2586–606.
27. Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*.23. veljača 2018.;359(6378):926–30.
28. Howell JA, Khan SA, Knapp S, Thursz MR, Sharma R. The clinical role of circulating free tumor DNA in gastrointestinal malignancy. *Transl Res*. svibanj 2017.;183:137–54.
29. Gall TMH, Frampton AE, Krell J, Habib NA, Castellano L, Stebbing J, i ostali. Cell-free DNA for the detection of pancreatic, liver and upper gastrointestinal cancers: has progress been made? *Future Oncol*. prosinac 2013.;9(12):1861–9.
30. Skrypkina I, Tsyba L, Onyshchenko K, Morderer D, Kashparova O, Nikolaienko O, et al. Concentration and Methylation of Cell-Free DNA from Blood Plasma as Diagnostic Markers of Renal Cancer. *Disease Markers*. 20. rujan 2016.;2016:e3693096.
31. Beaver JA, Jelovac D, Balukrishna S, Cochran R, Croessmann S, Zabransky DJ, i ostali. Detection of Cancer DNA in Plasma of Early Stage Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 15. svibanj 2014.;20(10):2643–50.
32. Hoque MO, Feng Q, Toure P, Dem A, Critchlow CW, Hawes SE, i ostali. Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *J Clin Oncol*. 10. rujan 2006.;24(26):4262–9.

33. Palanca-Ballester C, Rodriguez-Casanova A, Torres S, Calabuig-Fariñas S, Exposito F, Serrano D, i ostali. Cancer Epigenetic Biomarkers in Liquid Biopsy for High Incidence Malignancies. *Cancers (Basel)*. 16. lipanj 2021.;13(12):3016.
34. VanderLaan PA, Yamaguchi N, Folch E, Boucher DH, Kent MS, Gangadharan SP, et al. Success and failure rates of tumor genotyping techniques in routine pathological samples with non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. travanj 2014.;84(1):39–44.
35. Qian X, Liu J, Sun Y, Wang M, Lei H, Luo G, et al. Circulating cell-free DNA has a high degree of specificity to detect exon 19 deletions and the single-point substitution mutation L858R in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 11. travanj 2016.;7(20):29154–65.
36. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Sci Transl Med*. 19. veljača 2014.;6(224):224ra24.
37. Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Constantin T, Salari R, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early stage lung cancer evolution. *Nature*.26. travanj 2017.;545(7655):446–51.
38. Stewart CM, Kothari PD, Mouliere F, Mair R, Somnay S, Benayed R, et al. The value of cell-free DNA for molecular pathology. *J Pathol*. travanj 2018;244(5):616–27.
39. Lecomte T, Berger A, Zinzindohoué F, Micard S, Landi B, Blons H, et al. Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *Int J Cancer*. 10.kolovoz 2002.;100(5):542–8.
40. Spindler K-LG, Pallisgaard N, Vogelius I, Jakobsen A. Quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan. *Clin Cancer Res*. 15. veljača 2012.;18(4):1177–85.
41. Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 28. ožujak 2013.368(13):1199–209.
42. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif*. 18. ožujak 2019.;17:100087.
43. Goodall J, Mateo J, Yuan W, Mossop H, Porta N, Miranda S, et al. Circulating Cell-Free DNA to Guide Prostate Cancer Treatment with PARP Inhibition. *Cancer Discov*. rujanj 2017;7(9):1006–17
44. Morelli MP, Overman MJ, Dasari A, Kazmi SMA, Mazard T, Vilar E, et al. Characterizing the patterns of clonal selection in circulating tumor DNA from patients with colorectal cancer refractory to anti-EGFR treatment. *Ann Oncol*. travanj 2015;26(4):731–6.



45. Gifford G, Paul J, Vasey PA, Kaye SB, Brown R. The acquisition of hMLH1 methylation in plasma DNA after chemotherapy predicts poor survival for ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res.* 1. srpanj 2004.;10(13):4420–6.
46. Mastoraki S, Strati A, Tzanikou E, Chimonidou M, Politaki E, Voutsina A, et al. ESR1 Methylation: A Liquid Biopsy-Based Epigenetic Assay for the Follow-up of Patients with Metastatic Breast Cancer Receiving Endocrine Treatment. *Clin Cancer Res.* 15. ožujak 2018.;24(6):1500–10.
47. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, Ng C, Hrebien S, Cutts RJ, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med.* 26. kolovoz 2015.;7(302):302ra133.
48. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med.* 6. srpanj 2016.;8(346):346ra92.
49. Ilie M, Hofman V, Long E, Bordone O, Selva E, Washetine K, et al. Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine? *Ann Transl Med.* studeni 2014.;2(11):107.
50. Haque IS, Elemento O. Challenges in Using ctDNA to Achieve Early Detection of Cancer. *bioRxiv.* 21. prosinac 2017.;237578.
51. Wang J, Bettegowda C. Applications of DNA-Based Liquid Biopsy for Central Nervous System Neoplasms. *J Mol Diagn.* siječanj 2017;19(1):24–34.

## 12. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 4.11.1996. u Virovitici. Pohađao sam OŠ Ivane Brlić-Mažuranić u Virovitici i tijekom osnovnoškolskog obrazovanja sam sudjelovao na natjecanjima iz fizike, kemije i matematike na kojima najbolje rezultate postizem iz matematike: 1. i 3. mjesto na županijskom natjecanju, te nastupi na regionalnim i državnom natjecanju. 2011. godine se upisujem u prvi razred prirodoslovno-matematičkog smjera Gimnazije Petra Preradovića u Virovitici. U srednjoškolskom obrazovanju nastavljam sa sudjelovanjem na natjecanjima i na biologiji i kemiji osvajam dva puta prvo mjesto na županijskom natjecanju te jednom treće mjesto. Najbolje uspjehe sam imao iz natjecanja iz matematike gdje nastupam na A razini državnog natjecanja. Tijekom svog osnovnoškolskog i srednjoškolskog obrazovanja se bavim košarkom i proglašen sam najboljim sportašem škole 2015. godine. Unatoč velikom zanimanju za matematiku, upisujem se na Medicinski fakultet u Zagrebu 2015. godine.