

Povezanost metilacije promotora s ekspresijom gena BRCA1 i BRCA2 u seroznom raku jajnika visokog stupnja malignosti

Miloš, Tina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:472113>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tina Miloš

**Povezanost metilacije promotora s ekspresijom
gena *BRCA1* i *BRCA2* u seroznom raku jajnika
visokog stupnja malignosti**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za nasljedni rak na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Petra Ozretića i suvoditeljstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić sa Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovnog-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovnog-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije (mag. biol. exp.).

Ovaj rad izrađen je u okviru projekta „Mutacijski profili nasljednog raka dojke i jajnika“ [The Terry Fox Foundation]; Voditelj: doc. dr. sc. Petar Ozretić

Zahvale

Neizmjerne hvala mentoru dr. sc. Petru Ozretiću na pruženoj prilici, ukazanom povjerenju, strpljenju i mentorstvu. Od Vas sam puno naučila i bilo mi je zadovoljstvo raditi s Vama!

Veliku zahvalnost dugujem i Nikolini Rinčić na pomoći, strpljenju i bezbrojnim savjetima pri izradi ovog diplomskog rada.

Također, veliko hvala i svim ostalim članovima Laboratorija za nasljedni rak – Matei, Vesni i Maji koje su u svakom trenutku bile tu, uvijek spremne pomoći i dati savjet.

Hvala prof. dr.sc. Nadi Oršolić na pomoći i savjetima prilikom pisanja diplomskog rada te na divnim predavanjima tokom cijelog studija.

Hvala mojim curama koje su ovaj dio života učinile predivnim i nezaboravnim.

Posebno hvala mom Ivi na neizmjerne ljubavi i podršci uvijek i u svemu. Ti si moja snaga, moj najveći navijač i s tobom sve svoje snove pretvaram u predivnu stvarnost!

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima i bratu na neiscrpoj vjeri u mene, strpljenju, podršci i ljubavi! Bez Vas ovo ne bi bilo moguće!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Povezanost metilacije promotora s ekspresijom gena *BRCA1* i *BRCA2* u seroznom raku jajnika visokog stupnja malignosti

Tina Miloš

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Serozni rak jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) karakterizira visoka stopa smrtnosti budući da se, zbog izostanka jasnih simptoma i nedostatka testova za ranu detekciju, često otkriva u uznapredovanoj fazi bolesti. Cilj ovog rada je istražiti povezanost metilacije promotora gena *BRCA1* i *BRCA2* s njihovom ekspresijom u tkivima HGSOC kako bi se omogućilo stvaranje novih dijagnostičkih i terapijskih pristupa. Uzorci HGSOC i zdravih jajovoda su analizirana metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) kako bi se odredila ekspresija gena *BRCA1* i *BRCA2*, dok je stupanj metilacije njihovih promotora određen metodom analize krivulje mekšanja visoke rezolucije osjetljive na metilaciju (MS-HRM). Naposljetku, stanična linija OVCAR-3 je tretirana demetilirajućim spojem, 5-aza-2'-deoksicitidinom, kako bi se istražio utjecaj globalne demetilacije DNA na razinu ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2*. Rezultati su pokazali da je ekspresija gena, osobito *BRCA2*, značajno pojačana u raku jajnika te da su ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2* međusobno u korelaciji što ukazuje da je regulacija njihove ekspresije međusobno povezana. Metodom MS-HRM utvrđeno je da je u određenom broju uzoraka prisutna hipermetilacija gena *BRCA1*, dok je *BRCA2* pokazao potpunu hipometilaciju. Tretman stanica 5-aza-2'-deoksicitidinom utjecao je na pojačanu ekspresiju gena *BRCA1* i *BRCA2*, a stupanj metilacije promotora gena *BRCA1* pokazao se nižim u odnosu na netretirane stanice.

(64 stranica, 24 slike, 10 tablica, 109 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: HGSOC, *BRCA1*, *BRCA2*, metilacija, MS-HRM, homologna rekombinacija

Voditelj: Dr. sc. Petar Ozretić, znan. sur.

Suvoditelj: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Ocjenitelji: 1. Prof. dr. sc. Nada Oršolić

2. Prof. dr. sc. Biljana Balen

3. Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Rad prihvaćen: 24. lipnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Master Thesis

Association between promoter methylation and *BRCA1* and *BRCA2* gene expression in high-grade serous ovarian cancer

Tina Miloš

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

High-grade serous ovarian cancer (HGSOC) is often diagnosed in its late stage due to the absence of symptoms and a general lack of early detection tests, resulting in a high mortality rate. The goal of this work was to study the relationship between *BRCA1* and *BRCA2* gene expression and their promoters' methylation in HGSOC to understand the molecular mechanisms underlying its occurrence that would aid in the development of new diagnostic and therapeutic approaches. Healthy and cancerous tissue samples were analyzed using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) to determine the *BRCA1* and *BRCA2* gene expression. Methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM) was employed to determine the level of *BRCA1* and *BRCA2* promoter methylation. Finally, OVCAR-3 cells were treated with demethylating agent, 5-aza-2'-deoxycytidine, to study the effect of DNA demethylation on *BRCA1* and *BRCA2* gene expression. The results presented in this work demonstrate that the expression of both genes, especially of *BRCA2*, is significantly increased and correlated in cancerous tissues indicating their common expression regulation. MS-HRM analysis showed that *BRCA1* promoter is hypermethylated in cancerous tissues while *BRCA2* promoter exhibited complete hypomethylation. The 5-aza-2'-deoxycytidine treatment of OVCAR-3 cells induced reduced methylation of *BRCA1* promoter and increased expression of both *BRCA1* and *BRCA2* genes.

(64 pages, 24 figures, 10 tables, 109 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: HGSOC, *BRCA1*, *BRCA2*, methylation, MS-HRM, homologous recombination

Supervisor: Dr. Petar Ozretić, Res. Assoc.

Co-supervisor: Prof. Dr. Nada Oršolić

Reviewers: 1. Prof. Dr. Nada Oršolić

2. Prof. Dr. Biljana Balen

3. Assoc. Prof. Dr. Jasna Lajtner

Thesis accepted: 24th June 2021

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Rak jajnika.....	1
1.1.1. Serozni karcinom jajnika visokog gradusa.....	2
1.1.2. Epitel jajovoda kao izvorni organ seroznog raka jajnika visokog gradusa	2
1.2. Uloga dvolančanih lomova molekule DNA i nedostatak homologne rekombinacije u nastanku tumora.....	5
1.2.1. Geni <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i> i njihovi proteinski produkti	6
1.2.1.1. Uloga proteina <i>BRCA1</i> u popravku oštećenja molekule DNA	7
1.2.1.2. Uloga proteina <i>BRCA2</i> u popravku oštećenja molekule DNA	8
1.2.2. Fenotip „ <i>BRCAness</i> “ kao karakteristika HGSOC	9
1.3. Epigenetika	10
1.3.1. Metilacija molekule DNA	11
1.3.2. Regulacija genske ekspresije putem metilacije DNA	12
1.3.2.1. Hipermetilacija molekule DNA	13
1.3.2.2. Globalna demetilacija.....	14
1.3.3. Demetilacijski agensi kao antitumorski lijekovi	14
1.3.4. Detekcija metilacije DNA pomoću metode analize krivulje mekšanja visoke rezolucije osjetljive na metilaciju	16
2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA.....	19
3. MATERIJALI I METODE.....	20
3.1. Materijali.....	20
3.2. Metode.....	20
3.2.1. Izolacija molekula RNA iz tkiva.....	20
3.2.2. Izolacija molekula DNA iz tkiva i pune krvi	22
3.2.3. Reverzna transkripcija.....	24
3.2.4. Određivanje relativne ekspresije gena <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i> metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)	25
3.2.5. Bisulfitna konverzija	27
3.2.6. Analiza krivulje mekšanja visoke rezolucije osjetljiva na metilaciju (MS-HRM).....	29
3.2.7. Rad na staničnoj kulturi	32
3.2.7.1. Odmrzavanje stanica	32
3.2.7.2. Presađivanje i održavanje stanica u kulturi	33
3.2.7.3. Tretman stanica 5-aza-2'-deoksicitidinom i doksorubicinom.....	33
3.2.8. Protočna citometrija	35
3.2.8.1. Analiza oštećenja molekule DNA	35

3.2.9.	Statistička obrada podataka.....	36
4.	Rezultati	38
4.1.	Ekspresija gena <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i> u uzorcima tkiva seroznog raka jajnika visokog gradusa i zdravih jajovoda	38
4.1.1.	Korelacija između ekspresije gena <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i>	40
4.2.	Metilacija gena <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i> u uzorcima tkiva i krvi seroznog raka jajnika visokog gradusa i tkiva zdravih jajovoda	40
4.2.1.	Rezultati uhadavanja metode MS-HRM	40
4.2.2.	Rezultati analize metilacije promotora gena <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i>	42
4.2.3.	Povezanost genske ekspresije sa stupnjem metilacije gena	43
4.3.	Analiza oštećenja molekule DNA.....	44
4.3.1.	Utjecaj tretmana na pojavu dvolančanih lomova DNA.....	44
4.3.2.	Utjecaj tretmana na ekspresiju gena <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i>	46
4.4.	Utjecaj tretmana na metilaciju DNA.....	47
5.	Rasprava	49
6.	Zaključak	55
7.	Literatura.....	56
8.	Životopis.....	64

POPIS KRATICA

5-azaC – 5-azacitidin

5-azadC – 5-aza-2'-deoksicitidin

5-mC – 5-metil-citozin

ATM – engl. *ataxia telangiectasia mutated kinase*, kinaza ataksija teleangiektazija

ATR – engl. *ATM-related kinase*, kinaza povezana s ATM

BRCA1 – engl. *breast cancer 1*, gen za karcinom dojke 1

BRCA2 – engl. *breast cancer 2*, gen za karcinom dojke 2

BRCT – engl. *BRCA1 carboxyl terminus*, karboksilni kraj proteina BRCA1

cDNA – engl. *complementary DNA*, komplementarnu DNA

CHK2 – engl. *G2/M control kinase*, kontrolna kinaza G2/M

DDB – engl. *DNA double-stranded breaks*, dvolančani lomovi na molekuli DNA

DMEM – engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – engl. *Dimethyl Sulfoxide*, dimetil-sulfoksid

DNMT – engl. *DNA methyltransferases*, metiltransferaze DNA

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

FBS – engl. *fetal bovine serum*, fetalnog goveđeg seruma

FT – engl. *fallopian tube*, jajovod

HGSOC – engl. *high-grade serous ovarian cancer*, serozni karcinom jajnika visokog gradusa

HR – engl. *homologous recombination*, homologna rekombinacija

HRD – engl. *homologous recombination defect*, nefunkcionalna homologna rekombinacija

LOH – engl. *loss of heterozygosity*, gubitak heterozigotnosti

MDB – engl. *methyl-DNA-binding protein*, metil-DNA-vezujućih proteina

MS-HRM – engl. *methylation specific high resolution melting*, metoda analize krivulje mekšanja visoke rezolucije osjetljive na metilaciju

NHEJ – engl. *non-homologous end joining*, nehomologna rekombinacija

OSE – engl. *ovarian epithelial surface*, površinskog epitela jajnika

PBS – engl. *phosphate-buffered saline*, fosfatni pufer

PCR – engl. *polymerase chain reaction*, lančana reakcija polimerazom

qRT-PCR – engl. *real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*,
lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

RCLB – engl. *red cell lysis bufer*, pufer za lizu crvenih krvnih stanica

SSA – engl. *single-stranded annealing*, sparivanje jednolačanih lomova

ZEB – engl. *zebularine*, zebularin

1. UVOD

1.1. Rak jajnika

Rak jajnika predstavlja jedan od većih kliničkih izazova u ginekološkoj onkologiji i peti je najsmrtonosniji rak u razvijenim zemljama i zemljama zapadnog svijeta (Siegel i sur. 2013). Rizik nastanka raka jajnika povećava se sa starosnom dobi te je primijećeno da je zastupljeniji kod žena u perimenopauzi ili postmenopauzi nakon 40. godine života. Manje od 1% se javlja prije 20 godine života, a ukoliko se i pojavi, u dvije trećine slučajeva je riječ o nasljednom raku jajnika (Sowter i Ashworth 2005). Prema posljednje dostupnim podacima, u Hrvatskoj je 2017. godine rak jajnika zauzeo sedmo mjesto po učestalosti, odmah nakon karcinoma dojke, respiratornog sustava, kolona, tijela maternice i štitnjače. U Hrvatskoj je zabilježeno 449 novooboljelih od karcinoma jajnika 2017. godine (Šekerija i sur. 2020).

Problem velike smrtnosti od karcinoma jajnika leži u zakašnjoj pojavi prvih simptoma te nedostatku dijagnostičkih i prognostičkih specifičnih biomarkera, zbog čega se dijagnoza uspostavlja relativno kasno kad se bolest već proširila izvan jajnika i kada primjena metoda liječenja kao što su kemoterapija i kirurško odstranjenje više nisu učinkoviti. Unatoč velikim naporima, još uvijek nije razvijen učinkovit program probira s ciljem ranog otkrivanja bolesti kao i terapijski pristupi u liječenju koji bi doveli do smanjenja stope mortaliteta. Razlog leži u kompleksnosti same bolesti. Naime, karcinom jajnika uključuje različite histološke tipove, stupnjeve zrelosti te brojne genske i okolišne čimbenike, što vodi ka različitim odgovorima na kemoterapijska liječenja te u konačnici ima različite ishode (Babarovi i sur. 2016). Pet je najučestalijih histoloških tipova karcinoma jajnika: serozni karcinom visokog gradusa (ili stupnja malignosti), klarocelularni, endometrioidni, mucinozni i serozni niskog gradusa. Na temelju novog dvojnog modela patogeneze karcinoma jajnika pokazalo se da je karcinom jajnika heterogena bolest koja se razlikuje ne samo po histološkim tipovima već i po svojim kliničko-patološkim karakteristikama i biološkom ponašanju (Kurman i Shih 2008). Prema tom modelu epitelni tumori jajnika se na temelju kliničko-patoloških karakteristika te molekularnih i genetičkih promjena, dijele na tumore tipa 1 i tumore tipa 2. Tumori tipa 1 su najčešće tumori niskog gradusa i karakterizira ih sporiji razvoj bolesti, ali pokazuju postepeni razvoj zloćudnog potencijala. U ovu skupinu spadaju serozni i endometrioidni karcinom niskog gradusa, mucinozni karcinom i klarocelularni karcinom (karcinom svijetlih stanica) (Kurman i Shih 2008). Tumori tipa 2 su agresivni tumori visokog gradusa koji se gotovo uvijek nalaze u već uznapredovanoj fazi što rezultira i lošijom stopom preživljenja. U ovu skupinu spadaju serozni

i endometrioidni karcinom visokog gradusa, nediferencirani karcinom i karcino-sarkom (Güth i sur. 2007). Serozni karcinom jajnika visokog gradusa (engl. *high-grade serous ovarian cancer*, HGSOC) je najčešći i čini 70% svih karcinoma jajnika te je odgovoran za 70-80% smrtnosti u odnosu na sve ostale tipove karcinoma jajnika (Bowtell i sur. 2015).

1.1.1. Serozni karcinom jajnika visokog gradusa

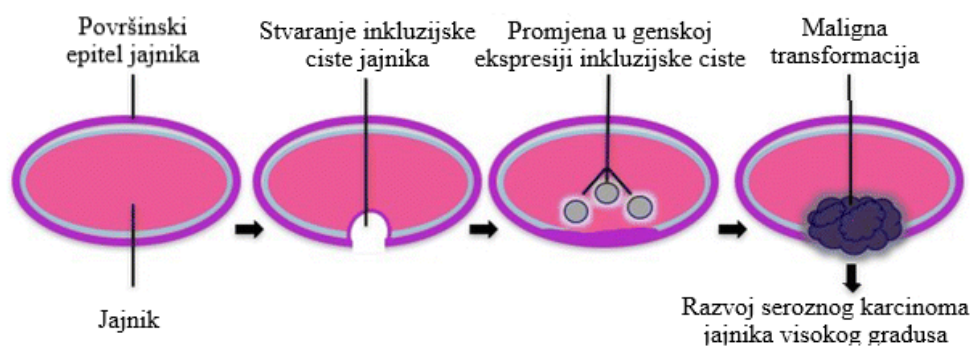
HGSOC karakterizira visoka genomska nestabilnost, promjena u broju kopija molekule DNA, gubitak heterozigotnosti (engl. *loss of heterozygosity*, LOH) te mutacija i disfunkcija proteina p53 s vrlo visokim postotkom od gotovo 100% (Kohn i Ivy 2017). Protein p53 djeluje kao tumorski supresor i ima kritičnu ulogu u kontroli staničnog rasta i održavanju genetske stabilnosti. Druge najčešće mutacije koje su prisutne kod gotovo svakog seroznog karcinoma jajnika visokog gradusa su mutacije u genima *BRCA1* (engl. *breast cancer gene 1*) i *BRCA2* (engl. *breast cancer gene 2*) (Jayson i sur. 2014). Njihovi proteinski produkti neophodni su u popravcima dvolančanih lomova molekule DNA procesom koji se naziva homologna rekombinacija (engl. *homologous recombination*, HR). Istraživanja su pokazala da u stanicama s nefunkcionalnim genima *BRCA1/2* ne dolazi do popravka dvolančanih lomova pomoću HR, već se popravci odvijaju alternativnim putevima, a to vodi ka genomskoj nestabilnosti i posljedično povećanju rizika za malignu transformaciju (Hoeijmakers 2001). Pokazano je da je nefunkcionalna HR prisutna u gotovo 50% slučajeva HGSOC (Konstantinopoulos i sur. 2015). Naslijeđene mutacije gena *BRCA1* i *BRCA2* prisutne su u 22% slučajeva HGSOC-a, dok su somatske mutacije gena *BRCA1/2* zabilježene u 7% slučajeva (Konstantinopoulos i sur. 2015). Osim naslijeđenih mutacija u genima *BRCA1/2* te somatskih mutacija koje u sporadičnom obliku raka jajnika nisu tako česte, treći događaj koji može dovesti do smanjene ekspresije ovih gena, su epigenetičke modifikacije. Istraživanja su pokazala da epigenetičko utišavanje putem hipermetilacije promotora gena *BRCA1* rezultira njegovom smanjenom ekspresijom u uzorcima HGSOC (Esteller i sur. 2000), dok je metilacija gena *BRCA2* relativno rijetka (Gras i sur. 2001).

1.1.2. Epitel jajovoda kao izvorni organ seroznog raka jajnika visokog gradusa

Ishodišno mjesto nastanka karcinoma jajnika ni dandanas nije do kraja razjašnjeno. Postavljena su dva modela, jedan koji tvrdi da on nastaje iz površinskog epitela jajnika (engl. *ovarian epithelial surface*, OSE), a drugi da nastaje iz jajovoda (Klotz i Wimberger 2017). Prvi model se bazira na pro-upalnom okolišu uzrokovanom ovulacijskim ciklusima, ekspresijskim obrascima inkluzijskih cisti jajnika i biomarkerima koji su zajednički površinskom epitelu

jajnika i malignoj tvorbi. Model koji govori da je izvorni organ jajovod, bazira se na prisutnosti prekursorskih lezija, prisutnosti mutacija u genima *BRCA1* i *BRCA2*, a sva novija istraživanja na animalnim modelima potvrđuju nastanak karcinoma jajnika upravo iz epitela jajovoda (Klotz i Wimberger 2017).

Model nastanka karcinoma iz površinskog epitela jajnika prvi je predstavio Fathalla (1971). Naime, vjeruje se da ukupni broj ovulacija doprinosi tumorigenezi tako što se stvara pro-upalni okoliš te aktivacija dvolančanih lomova molekule DNA (engl. *DNA double-stranded breaks*, DDB). Smanjeni rizik za razvoj HGSOE povezuje se, primjerice, s uzimanjem kontracepcijskih pilula na bazi estrogena, pri čemu se smanjuje broj ovulacija te ukoliko su proteini *BRCA1* i *BRCA2* funkcionalni, potencijalno nastali dvolančani lomovi bit će popravljivi homolognom rekombinacijom. Mutacijama u njihovim genima smanjuje se učinkovitost popravka nastalih lomova na molekuli DNA, što može rezultirati tumorskim rastom. Smatra se da inkluzijske ciste koje su prisutne na površinskom epitelu jajnika, imaju maligni potencijal u odnosu na okolno, normalno tkivo jajnika (Slika 1.). Ipak, potvrđeno je da prisutnost inkluzijskih cisti ne povećava vjerojatnost razvijanja epitelnog karcinoma jajnika te je primijećeno da u jajniku nisu prisutne inkluzijske ciste, pri čemu onda ova teorija ne vrijedi (Auersperg 2013; Sharma i sur. 2012).

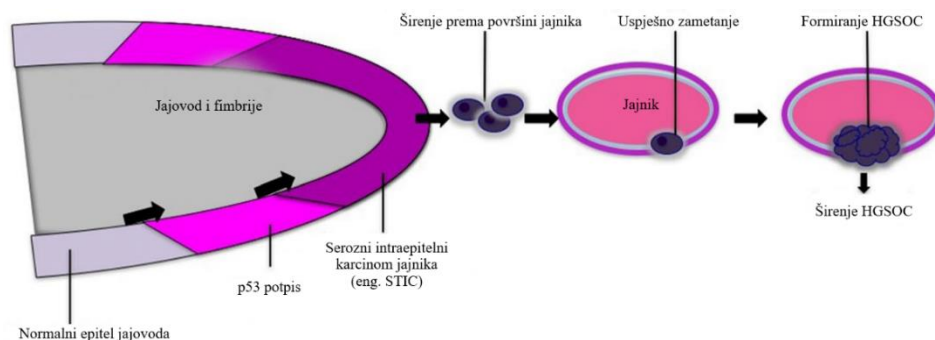


Slika 1. Shema prikazuje postepeni razvoj karcinoma jajnika. Prvo dolazi do formiranja inkluzijskih cisti, zatim u njima nastupaju promjene u genskoj ekspresiji i na kraju maligna transformacija kao rezultat genotoksičnog stresa uzrokovanog ovulacijskim ciklusima. Posljedica je nastanak seroznog karcinoma jajnika visokog gradusa (slika preuzeta i prilagođena iz Klotz i Wimberger 2017).

Unatoč tome što se već vidljiva tumorska masa nalazi i dijagnosticira na jajniku, smatra se da je izvorni organ nastanka i razvoja tumorskih stanica zapravo jajovod (engl. *fallopian tube*, FT). Taj model nastanka karcinoma jajnika iz jajovoda postavio je Dubaeu (1999). Jajovod se sastoji od jednog sloja stanica kojeg čine cilijarne i sekretorne stanice i koje su izložene upalnim citokinima povezanim s ovulacijskim ciklusima. Ovakva ponavljajuća

izloženost genotoksičnom stresu uzrokuje oštećenja molekule DNA i inducira mutacije u genu *TP53*, što ima za posljedicu klonalnu ekspanziju fiziološki normalnih, epitelnih stanica koje nose tzv. p53–potpis. Dodatno nakupljanje mutacija doprinosi proliferaciji i nastanku seroznog intraepitelnog karcinoma jajovoda (engl. *serous tubal intraepithelial carcinoma*, STIC). Kako se ovaj karcinom razvija, invazivne tumorske stanice se ljušte iz fimbrija jajovoda te se prenose do površine jajnika i tamo uspostavljaju tumorsku masu i transformaciju u serozni karcinom jajnika visokog gradusa (Slika 2.). Model nastanka HGSOE iz jajovoda osobito se može potvrditi kod skupine pacijentica kojima je dijagnosticiran HGSOE i koje su nositeljice mutacija u genima *BRCA1* i *BRCA2* te imaju prisutnu mutaciju gena *TP53* u epitelnim stanicama jajovoda (Klotz i Wimberger 2017).

Poznavanje ishodišne stanice za razvoj seroznog raka jajnika visokog gradusa od velike je važnosti jer predstavlja temelje za bolji razvoj *in vitro* i *in vivo* modela rane karcinogeneze i pomaže u proučavanju ranog otkrivanja bolesti, što bi moglo doprinijeti razvoju preciznijih pristupa u liječenju.



Slika 2. Epitel jajovoda građen je od jednog sloja cilijarnih i sekretornih stanica koje su izložene upalnim citokinima povezanim s procesom ovulacije. Taj ponavljajući genotoksični stres uzrokuje oštećenja molekule DNA i inducira mutaciju proteina p53, što dovodi do klonalne ekspanzije fiziološki normalnih epitelnih stanica, što se naziva „p53-potpis“. Nakupljanje mutacija omogućuje stanicama stjecanje sposobnosti proliferacije, što dovodi do razvoja seroznog intraepitelnog karcinoma jajovoda (STIC). Kako STIC napreduje, dolazi do ljuštenja invazivnih stanica raka iz fimbrija jajovoda nakon čega se one mogu brzo proširiti na površinu jajnika, uspostaviti stvaranje tumorskih nakupina koje se zatim transformiraju u serozni rak jajnika visokog stupnja malignosti (slika preuzeta i prilagođena iz Klotz i Wimberger 2017).

1.2. Uloga dvolančanih lomova molekule DNA i nedostatak homologne rekombinacije u nastanku tumora

Molekula DNA se svakodnevno oštećuje zbog različitih okolišnih i endogenih utjecaja. Kako bi se očuvala cjelovitost genoma, stanica ima nekoliko kompleksnih molekularnih puteva uključenih u popravak različitih oštećenja kao što su dvolančani lomovi (engl. *double-strand breaks*, DBS), jednolančani lomovi (engl. *single-strand breaks*, SSB), modifikacije jednog nukleotida te nastanak međulančanih veza (engl. *interstrand cross links*, ICL) (Hoeijmakers 2001). Nastala oštećenja se popravljaju preko različitih mehanizama kao što su: popravak izrezivanjem nukleotida, popravak izrezivanjem baze, a dva ključna mehanizma za popravak dvolančanih lomova su homologna (HR) i nehomologna rekombinacija (engl. *non-homologous end joining*, NHEJ) (Lindahl i Wood 1999).

Dvolančani lomovi zahvaćaju oba komplementarna lanca molekule DNA, a najčešće su inducirani egzogenim čimbenicima (ionizirajuće zračenje, kemikalije, anti-tumorski lijekovi) i endogenim (stvaranje reaktivnih kisikovih radikala ili prilikom procesa replikacije molekule DNA) (Momparker 2005). Dvolančani lomovi se smatraju najopasnijim oblikom oštećenja molekule DNA, obzirom da je cjelovitost oba lanca molekule DNA narušena (Roy i sur. 2012). Popravci dvolančanih lomova vezani su uz stanični ciklus. Tijekom faze G1 staničnog ciklusa dominira popravak nehomolognom rekombinacijom, a tijekom faza S i G2 popravak se odvija putem homologne rekombinacije zbog dostupnosti sestrinskih kromatida koje djeluju kao kalup za popravak nastalih lomova (Lupo i Trusolino 2014). Tijekom procesa NHEJ dolazi do procesiranja krajeva DNA i njihove ligacije, pri čemu može doći do adicije ili delecije pojedinog nukleotida, što može dovesti do promjene slijeda DNA i narušavanja genomske stabilnosti i cjelovitosti (Van Gent i sur. 2001). S druge pak strane, HR je potencijalni proces popravka molekule DNA bez pogreške jer netaknuta sestrinska kromatida služi kao kalup za popravak nastalog oštećenja i tako ujedno osigurava očuvanje genomske cjelovitosti (Roy i sur. 2012). Ukoliko ne dođe do popravka nastalih lomova molekule DNA, dolazi do nakupljanja mutacija i nekontroliranog staničnog dijeljenja, što na kraju može rezultirati potencijalnom razvoju tumora (Hoeijmakers 2001). Nefunkcionalna homologna rekombinacija (engl. *homologous recombination defect*, HRD) može biti rezultat nasljednih mutacija, somatskih mutacija ili posljedica epigenetičkih mehanizama inaktivacije gena čiji proteinski produkti sudjeluju u procesu homologne rekombinacije. Među tim genima nužno je izdvojiti gene *BRCA1* i *BRCA2* koji su izuzetno važni u procesu homologne rekombinacije.

1.2.1. Geni *BRCA1* i *BRCA2* i njihovi proteinski produkti

Geni *BRCA1* i *BRCA2* su tumorski supresori čiji proteinski produkti igraju važnu ulogu u regulaciji transkripcije te u procesima popravka oštećenja molekule DNA. Mutacija tih gena povećava rizik za razvoj tumora dojke, jajnika, gušterače i prostate (Bertwistle i Ashworth 1998).

Miki i suradnici (1994) klonirali su i identificirali gen *BRCA1* 1994. godine. Smješten je na kromosomu 17q12.21 i sastoji se od 24 kodirajuća eksona te kodira za protein od 1863 aminokiseline. Na N-terminalnom kraju proteina BRCA1 nalazi se N-terminalna cink-vezujuća prstenasta domena (engl. *RING zinc finger domain*), jezgrin lokalizacijski signal (engl. *nucleus localization signal*, NLS) na 11 eksonu te dvije C-terminalne domene BRCT (engl. *BRCA1 carboxyl terminus*). Prstenaste vezujuće domene prisutne su u velikom broju proteina i mogu biti uključene u proteinskim međureakcijama. Domene BRCT pronađene su u proteinima koji su uključeni u popravcima oštećenja molekule DNA ili održavanju staničnog metabolizma, kao što su RAD9 ili XRCC1 (Bertwistle i Ashworth 1998). BRCA1 ostvaruje međureakcije s proteinima uključenima u napredovanje staničnog ciklusa, regulaciju genske transkripcije, odgovoru na oštećenje molekule DNA te ubikvitinaciju. Istraživanja na miševima kojima je uklonjen gen *BRCA1* („*knock-out*“) su potvrdila da BRCA1, slično kao i p53, sudjeluje u održavanju genomske cjelovitosti (Zhang i sur. 1998). Identificirano je preko 1600 mutacija koje rezultiraju u pomaku okvira čitanja i shodno tome nefunkcionalnom proteinu (Rosen i sur. 2006). Gubitak njegove funkcije rezultira pogreškama u popravku oštećenja molekule DNA i transkripciji, nenormalnom duplikacijom centrosoma, neispravnom regulacijom kontrolne točke G2/M staničnog ciklusa, oštećenjem kromosoma i neispravnom regulacijom diobenog vretena (Petrucci i sur. 2010).

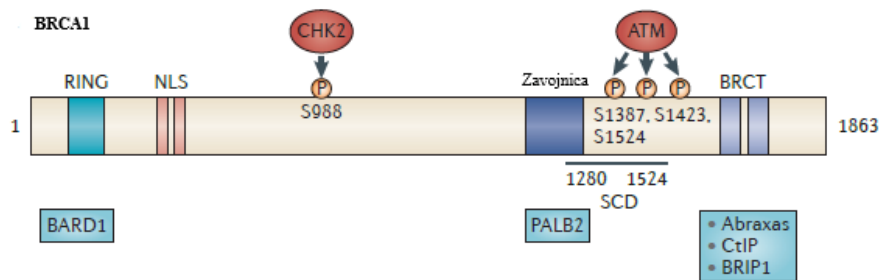
Godine 1995. otkriven je i drugi gen, *BRCA2* (Wooster i sur. 1995). Gen *BRCA2* smješten je na 13q12.3 kromosomu i sadrži 27 kodirajućih eksona, a njegov proteinski produkt sadrži 3.418 aminokiselina. Protein BRCA2 nema prepoznatljivih proteinskih motiva kao ni očitu povezanost s proteinom BRCA1, međutim, kao i BRCA1, također je uključen u procesima popravka oštećenja molekule DNA (Petrucci i sur. 2010). Istraživanja na miševima kojima je uklonjen gen *BRCA2* su potvrdila su da je i BRCA2 uključen u održavanje genomske cjelovitosti (Zhang i sur. 1998). Identificirano je oko 1800 mutacija, a najčešće je riječ o delecijama, insercijama ili besmislenim mutacijama koje vode ka pogrešnoj transkripciji te rezultiraju nefunkcionalnim proteinom (Petrucci i sur. 2010).

1.2.1.1. Uloga proteina BRCA1 u popravku oštećenja molekule DNA

BRCA1 je svestrani protein koji zahvaljujući svojim raznolikim funkcionalnim domenama sudjeluje u mnogim procesima, prvenstveno popravcima molekule DNA (proces HR, NHEJ i SSA) te djeluje kao regulator staničnog ciklusa. Tako da BRCA1 sudjeluje u međureakciji s proteinima koji djeluju kao efektori nastalog oštećenja na molekuli DNA, zatim s tumorskim supresorima i regulatorima staničnog ciklusa (Deng i Brodie 2000). BRCA1 sadrži amino-terminalnu RING domenu koja ima E3 ubikvitin-ligaznu aktivnost i domenu BRCT koja olakšava vezanje fosfoproteina. Mnoge naslijeđene mutacije gena *BRCA1* koje su povezane s nastankom karcinoma nađene su upravo u ove dvije domene, što pokazuje da su obje domene uključene u supresiji razvoja karcinoma dojke i jajnika (Friedman i sur. 1994). E3 ubikvitin-ligazna aktivnost proteina BRCA1 je pojačana kada je u međureakciji s domenom RING svojeg vezujućeg partnera, proteina BARD1 (engl. *BRCA1-associated RING domain protein 1*). Motiv BRCT konzerviran je u mnogim proteinima uključenim u prepoznavanje oštećenja molekule DNA i odgovoran je za povezivanje BRCA1 s proteinima fosforiliranim kinazom ATM, kao što su abraxas, CtIP (engl. *CtBP-interacting protein*) i BRIP1 (engl. *BRCA1-interacting protein C-terminal helicase 1*) (Slika 3.).

Kao odgovor na oštećenje molekule DNA, protein BRCA1 veže i fosforilira razne kinaze uključene u prepoznavanje oštećenja molekule DNA (engl. *DNA damage response kinases*, DDR) kao što su kinaza ataksija teleangiektazija (engl. *ataxia telangiectasia mutated*, ATM) i kinaza povezana s ATM (engl. *ataxia telangiectasia RAD51-related*, ATR) te kontrolna kinaza G2/M (engl. *G2/M control kinase*, CHK2). Inicijalni korak u procesu homologne rekombinacije je vezanje kompleksa MRN (MRE11-RAD50-NSB1) za nastali dvolančani lom. Komplex MRN stvara jednolančane 3' krajeve, a BRCA1 izlaže nastale jednolančane regije molekule DNA (engl. *single-strand DNA*, ssDNA) sa svake strane loma. Nastali jednolančani krajevi omotaju se replikacijskim proteinom A (engl. *replication protein A*, RPA) koji ih štiti od cijepanja nukleazama i formiranja ukosnica (Fradet-Turcotte i sur. 2016). Protein BRCA1 preko međureakcije s BRCA2 i PALB2 (engl. *partner and localizer of BRCA2*) dovodi na mjesto oštećenja protein RAD51. Kolokalizacija proteina BRCA1 i BRCA2 s RAD51 na mjestima rekombinacije i popravka molekule DNA pokazuje kako proteini BRCA1 i BRCA2 imaju ulogu i u detekciji i u popravku dvolančanih lomova. Osim toga, protein BRCA1 možda ima ulogu i u popravku lomova u drugim alternativnim procesima kao što su proces NHEJ ili SSA (Roy i sur. 2012). Ono što je zajedničko svim trima procesima popravka molekule DNA

je međureakcija proteina BRCA1 s kompleksom MRN koji je nužan za resekciju krajeva molekule DNA (Paull i sur. 2001).

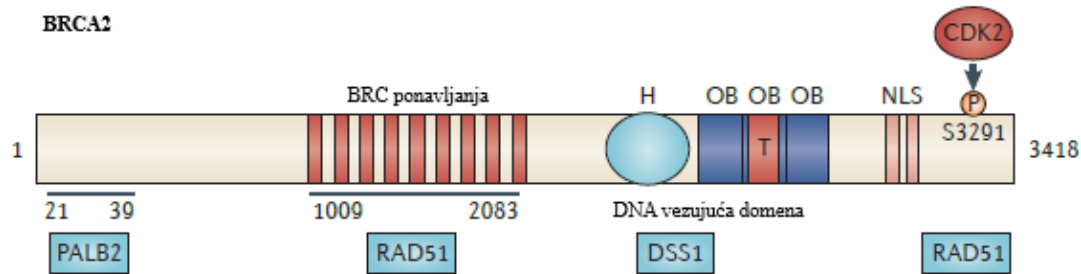


Slika 3. Protein BRCA1 sadrži amino-terminalnu domenu RING koja ima E3 ubikvitin-ligaznu aktivnost i koja ulazi u međureakciju s proteinom BARD1 te jezgrinu lokalizacijsku sekvencu (NLS). Središnja regija proteina BRCA1 sadrži fosforilacijsko mjesto za CHK2 na poziciji S988. Karboksiterminalni kraj sadrži zavojnicu koja ulazi u međureakciju s PALB2, zatim domenu SQ/TQ koja sadrži oko deset potencijalnih fosforilacijskih mjesta za protein ATM te domenu BRCT koja veže proteine kao što su abraxas, CtIP i BRIP1 (slika preuzeta i prilagođena iz Roy i sur. 2012).

1.2.1.2. Uloga proteina BRCA2 u popravku oštećenja molekule DNA

Za razliku od proteina BRCA1 koji ima mnogobrojnu ulogu u različitim staničnim procesima, primarna uloga proteina BRCA2 upravo je u procesu homologne rekombinacije. BRCA2 sadrži DNA-vezujuću domenu (engl. *DNA-binding domain*, DBD) koja veže ssDNA i dsDNA i osam ponavljanja BRC koja vežu protein RAD51. DBD sadrži pet komponenti: α -helikalnu domenu, tri regije koje vežu oligonukleotide (engl. *oligonukleotid binding folds*, OB) za koje se veže ssDNA i domenu „tower“ (TD) koja strši iz OB2 i veže dsDNA (Slika 4.) (Yang i sur. 2002). BRCA2 regulira unutarstaničnu lokalizaciju i funkciju RAD51 tako što premješta RAD51 s mjesta sinteze na mjesto obrade oštećenja molekule DNA. Na tom mjestu dolazi do stvaranja filameta koji se sparuje s homolognom regijom i tako omogućuje izmjenu lanaca molekule DNA (Powell i sur. 2002; Yoshida i Miki 2004). Stoga je međureakcija između BRCA2 i RAD51 neophodna za održavanje stanične diobe i kromosomske strukture. Otkrivanje međureakcije proteina BRCA2 i RAD51 te njihova kolokalizacija u jezgri nakon nastanka oštećenja DNA bili su jedan od prvih dokaza koji su potvrdili ulogu BRCA2 u procesu HR (Sharan i sur. 1997). RAD51 se veže na C-terminalni kraj BRCA2 i u području ponavljanja BRC koji se nalaze u sredini proteina. Od ukupno osam ponavljanja BRC, RAD51 se veže za BRC1-4, BRC7 i BRC8 (Wong i sur. 1997). Za olakšano novačenje proteina RAD51, njegovo vezanje za ssDNA i formiranje nukleoproteinskog filameta na ssDNA, ponavljanja BRC potiču uklanjanje proteina RPA sa ssDNA (Carreira i sur. 2009). Venkitaraman i sur. (2009) su

pokazali da prisutnost točkastih mutacija unutar ponavljanja BRC narušava međureakciju s proteinom RAD51 u pojedinih s nasljednim sindromom karcinoma dojke i jajnika (engl. *hereditary breast and ovarian cancer syndrome*, HBOC).



Slika 4. Protein BRCA2 sadrži osam ponavljanja BRC koja vežu protein RAD51. DNA-vezujuća domena sadrži α -helikalnu domenu (H), tri regije koje vežu oligonukleotide (OB) i domenu „tower“ (T) koja strši iz OB2 i veže dsDNA (slika preuzeta i prilagođena iz Roy i sur. 2012).

1.2.2. Fenotip „*BRCAness*“ kao karakteristika HGSOC

Nasljedne mutacije gena *BRCA1* i *BRCA2* nose povećani rizik za razvoj karcinoma dojke i jajnika, ali i drugih tipova karcinoma (Wooster i Weber 2003). *BRCA1* ima raznoliku staničnu ulogu, uključujući popravak dvolančanih lomova, regulacija transkripcije, kontrola staničnog ciklusa te remodeliranje kromatina. S druge strane, *BRCA2* je usko vezan uz procese popravka molekule DNA i rekombinacije, tako što regulira aktivnost proteina RAD51 (Tutt i Ashworth 2002; Venkitaraman 2002). Iz ovoga je jasno da nefunkcionalni geni *BRCA1* i *BRCA2* vode ka nefunkcionalnom popravku dvolančanih lomova na molekuli DNA, tj. nefunkcionalnoj homolognoj rekombinaciji. HRD rezultira da se popravci nastalih lezija na molekuli DNA odvijaju putem alternativnih i potencijalno, mutagenih procesa kao što je NHEJ ili sparivanjem jednolančanih lomova (engl. *single strand annealing*, SSA). Iz toga se može zaključiti da gubitak funkcije proteina *BRCA1* i *BRCA2* vodi ka genomske nestabilnosti i predispoziciji za razvoj tumora. Iako naslijeđene mutacije ovih gena povećavaju rizik za nastanak karcinoma, mutacije u ovim genima nisu toliko česte u sporadičnim tumorima. Stoga se u ovakvim slučajevima govori o konceptu nazvanom „*BRCAness*“ (Moscheta i George 2016; Turner i sur. 2004).

Fenotip „*BRCAness*“ opisuje stanje gdje je prisutna nefunkcionalna homologna rekombinacija, ali bez nasljednih mutacija u genima *BRCA1/2* (Turner i sur. 2004). Naime, sve veći broj istraživanja potvrđuje da u sporadičnim oblicima tumora postoje slična patološka i klinička obilježja kao i kod nasljednih oblika, iako nisu prisutne nasljedne mutacije u genima

BRCA1/2. Osim nasljednih i somatskih mutacija, treći mehanizam koji može dovesti do inaktivacije ovih gena su epigenetičke modifikacije, a jedan od tih mehanizama svakako je metilacija molekule DNA (Jones i Baylin 2002). Metilacija gena često je povezana s gubitkom heterozigotnosti, a osobito može biti značajno ukoliko je jedan alel deletiran, a drugi se inaktivira metilacijom, što na kraju rezultira nefunkcionalnim genom (Catteau i sur. 1999). Nekoliko istraživanje je potvrdilo hipermetilaciju promotora gena *BRCA1* u 5-31% slučajeva sporadičnih oblika raka dojke i jajnika (Baldwin i sur. 2000; Catteau i sur. 1999; Esteller i sur. 2000). Međutim, još nije u potpunosti jasno je li epigenetičko utišavanje gena značajan događaj za razvoj tumora ili se zapravo javlja kao sekundarni fenomen u tumorigenezi. No uzimajući u obzir da gubitak funkcije gena *BRCA1* vodi ka genomskoj nestabilnosti te tako doprinosi tumorigenezi, metilacija promotora tog gena mogla bi biti značajan rani događaj u razvoju tumora (Turner i sur. 2004). S druge pak strane, kad je riječ o genu *BRCA2*, hipermetilacija njegovog promotora u sporadičnom obliku karcinoma jajnika je rijetko zastupljena (Hilton i sur. 2002). Potencijalni mehanizam kojim se objašnjava inaktivacija gena *BRCA2* vezan je uz amplifikaciju gena *EMSY* (Hughes-Davies i sur. 2003). Naime, protein EMSY ulazi u međureakciju s genom *BRCA2* u području trećeg eksona koji je uključen u transkripcijskog regulaciji. Osim toga EMSY ulazi u međureakciju i s kromatin-remodelirajućim proteinima i kada je prekomjerno eksprimiran, EMSY inhibira aktivnost proteina BRCA2. U uzorcima HGSOZ zabilježena je amplifikacija gen *EMSY* u 17% slučajeva (Hughes-Davies i sur. 2003). Međutim, nije još u potpunosti razjašnjeno utječe li amplifikacija gena *EMSY* na ulogu gena *BRCA2* u održavanju genomske stabilnosti.

1.3. Epigenetika

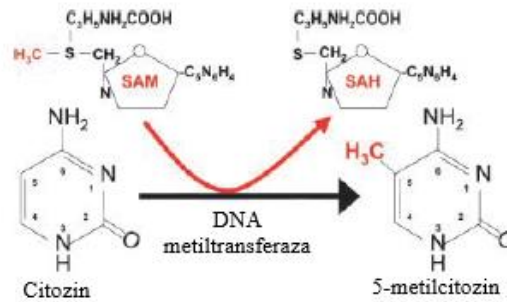
Epigenetika se definira kao nasljedne promjene u aktivnosti i ekspresiji gena bez promjena unutar sekvence molekule DNA (Momparker 2003). Smatra se da epigenetski procesi utječu na gensku ekspresiju prvenstveno na razini transkripcije, iako i translacija također može biti epigenetički regulirana (Gibney i Nolan 2010). Većina epigenetskih promjena uspostavlja se tijekom diferencijacije i održava stabilnima kroz mnogostruke cikluse dioba, što osigurava da stanice imaju različitu morfologiju i funkciju, a da pritom sadrže istu genetsku informaciju. Stoga je kontrola ekspresije gena ključna za diferencijaciju i razvoj (Gibney i Nolan 2010). Obrazac ekspresije gena koji karakterizira diferencirane stanice utvrđen za vrijeme razvoja, zadržava se i nakon mitoze. Prema tome, osim što stanice nasljeđuju genetičku informaciju, isto tako nasljeđuju i informaciju koja nije dio slijeda nukleotida DNA. Ta vrsta informacija nazvana je epigenetikom. Waterland (2006) je definirao epigenetiku kao znanstvenu disciplinu

o mitotičkim i potencijalno mejotičkim promjenama u genskoj ekspresiji koje nisu uzrokovane promjenama u sekvenci DNA. Epigenetički procesi koji stabilno mijenjaju obrazac ekspresije gena i/ili prenose te promjene i prilikom diobe stanica obuhvaćaju: metiliranje citozinske baze na molekuli DNA, post-translacijske modifikacije histona, remodeliranje kromatina i interferenciju RNA (Gibney i Nolan 2010). Osim genske ekspresije, epigenetski mehanizmi igraju važnu ulogu u ostalim staničnim procesima, uključujući staničnu diferencijaciju, apoptozu, popravak DNA te regulaciju matičnosti stanica (engl. *stemness*) (Feinberg i Tycko 2004). S obzirom na njihovu ulogu u ključnim staničnim procesima, epigenetski događaji vrlo su usko povezani s brojnim bolestima u ljudi od kojih je najznačajniji svakako karcinom (Jones i Baylin 2007). Epigenetske promjene su prisutne u većini, ako ne i u svim zloćudnim novotvorinama (Sinčić i Herceg 2011). Stoga i ne iznenađuje činjenica da sve više istraživanja ide u smjeru razumijevanja epigenetskih mehanizama i događaja koji vode ka nastanku tumora. Takva saznanja mogu imati veliki značaj u klinici kod uspostavljanja dijagnoze te pogodne terapije za liječenje karcinoma, ali i drugih bolesti.

1.3.1. Metilacija molekule DNA

Metilacija je reverzibilna kovalentna modifikacija molekule DNA, gdje dolazi do dodavanja metilne skupine (-CH₃) na peti ugljikov atom citozina, pri čemu nastaje 5-metilcitozin (5-mC) (Slika 5.). Nafee i sur. (2008) su utvrdili da je metilirano oko 3% citozina na ljudskoj molekuli DNA. Kod sisavaca, metilacija se događa na citozinima koji su dio dinukleotida citozin-gvanin, takozvanim CpG-otocima. CpG-otoci, odnosno regije bogate CG bazama, smješteni su na 5' kraju većine ljudskih gena, a oko pola transkripcijski aktivnih gena sadrži CpG-otoke (Nafee i sur. 2008). CpG-otoci u pravilu nisu metilirani ili ako jesu, imaju vrlo nisku razinu metilacije. Ostatak CG dinukleotida koji su smješteni izvan regije CpG-otoka, uglavnom su metilirani. Abnormalna metilacija CpG-otoka povezana je s utišavanjem inače transkripcijski aktivnog gena. Vjeruje se da promjene u stupnju metiliranosti CpG-otoka igra važnu ulogu u regulaciji aktivnosti promotora putem utjecaja na vezanje transkripcijskih čimbenika i različitih metil-DNA-vezujućih proteina (engl. *methyl-DNA-binding protein*, MDB) (Bird 2002). Proteini MDB su obitelj metil-CpG-vezujućih proteina koji se vežu za metiliranu molekulu DNA. Metil-CpG-vezujući protein 2 (MeCP2) prepoznaje i veže se za metilirane dinukleotide CpG te je uključen u remodeliranje kromatina i utišavanju gena (Bird 2002).

Proces metilacije kataliziran je enzimima poznatim kao metiltransferaze DNA (engl. *DNA methyltransferases*, DNMTs), a u sisavaca su prisutne 3 metiltransferaze: DNMT1, DNMT3A i DNMT3B. DNMT1 održava metilaciju DNA tijekom replikacije tako što kopira obrasce metilacije s roditeljskog lanca DNA na novosintetizirani lanac. DNMT3a i DNMT3b kataliziraju *de novo* metilaciju dodavajući metilnu skupinu na nemetilirane dinukleotide CpG te zajedno s DNMT1 pomažu u održavanju metilacijskih obrazaca tijekom replikacije DNA.



Slika 5. Nastanak 5-metilcitozina. Enzim metiltransferaza DNA katalizira prijenos metilne skupine ($-CH_3$) sa S-adenozilmetionina (SAM) na deoksicitozin, pri čemu nastaje 5-deoksimetilcitozin i S-adenozilhomocitozin (SAH) (slika preuzeta i prilagođena Attwood i sur. 2002).

1.3.2. Regulacija genske ekspresije putem metilacije DNA

Metilacija se najčešće događa u promotorskoj regiji gena, stoga metilacija CpG-otoka u promotorskoj regiji utišava gensku ekspresiju te se na taj način održava regulacija ekspresije gena u stanicama. Ukoliko je promotor gena metilirani, pokreće se mašinerija ostalih epigenetskih modifikacija koje dovode do „zatvorene“ strukture kromatina, odnosno heterokromatinizacije. Takva struktura kromatina onemogućuje pristup transkripcijskim čimbenicima molekuli DNA te ne dolazi do formiranja inicijacijskog transkripcijskog kompleksa (De Carvalho i sur. 2010). Stoga, ukoliko se metilacija DNA dogodi u promotorskim regijama tumorskih supresora, može doći do neoplastične transformacije. Takav događaj se najčešće javlja u ranom tumorskom razvoju, a na kraju rezultira malignim fenotipom (Momparler 2003). Prema modelu kojeg je postavio Knudsen, da bi došlo do razvoja tumora oba alela gena tumorskih supresora moraju biti inaktivirana te su kromosomske analize pokazale da je u mnogim tumorskim supresorima zabilježen gubitak heterozigotnosti (Alfred i Knudson 1971). Iako nije uvijek u potpunosti bilo jasno kako dolazi do inaktivacije drugog alela, danas se zna da uzrok leži upravo u metilaciji promotora gena (Jones i Laird 1999).

Postavljena su dva modela koja navode ulogu metilacije DNA u nastanku tumora. Jedan se odnosi na nastanak tumora modulacijom genske ekspresije, a prema drugom metilacija DNA doprinosi nastanku somatskih mutacija (McMahon i sur. 2017). Hipermetilacija promotorske regije gena za tumorski supresor vodi ka utišavanju tog gena i gubitku njegove funkcije, dok hipometilacija u regiji protoonkogeno povećava onkogenu aktivnost. Stoga genska regulacija putem metilacije DNA može biti jedan od ranih događaja u tumorskoj patofiziologiji.

Metilacijski status DNA koji ovisno o ravnoteži između metilacijskih i demetilacijskih aktivnosti, uvelike ovisi o regulaciji ekspresije gena. Obrazac metilacije DNA u normalnih stanica je tkivno specifičan, no u tumorskim stanicama uzorak je izmijenjen u dva smjera: ukupni gubitak 5mC-a (globalna hipometilacija) i hipermetilacija promotora određenih gena (Feinberg i Tycko 2004; Jones i Baylin 2007). Globalna demetilacija postignuta je demetilacijom uglavnom ponavljajućih sekvenci, transpozona te ostalih nekodirajućih regija genoma. U tumorskim stanicama hipometilirano DNA nalazimo također unutar promotora gena matičnosti, protoonkogeno/onkogeno, gena staničnog ciklusa, gena inhibitora apoptoze, a hipermetilirano u promotorima gena supresora tumora, proapoptotičkih gena, gena negativnih regulatora staničnog ciklusa i diferencijacijskih gena (Eden i sur. 2003).

1.3.2.1. Hipermetilacija molekule DNA

Hipermetilacija molekule DNA je česta pojava u tumorskim stanicama, a definira se kao hipermetilacija promotorske regije gena supresora tumora te se smatra pokretačem inaktivacije gena (Jones i Baylin 2007). Hipermetilacija DNA obično se odvija u području CpG-otoka. To su područja koja se nalaze oko i u blizini početnog mjesta transkripcije u promotorskim regijama većine ljudskih gena. Međutim, posljednja istraživanja su pokazala da se metilacija DNA češće odvija oko, nego unutar samih CpG-otoka (Irizarry i sur. 2009). Hipermetilacija promotora gena za tumorski supresor jedan je od najčešćih epigenetskih događaja u malignim stanicama i jedan od najčešćih mehanizama inaktivacije gena supresora tumora. Inaktivacija gena, osobito ako je riječ o tumorskim supresorima, doprinosi tumorskom razvoju, tako što dolazi do promoviranja klonalne selekcije stanice s potencijalom rasta. Osim tumorskih supresora, inaktivacija gena hipermetilacijom zahvaća i neke druge gene, primjerice gene uključene u kontrolu staničnog ciklusa, popravka molekule DNA, apoptoze, adhezije stanice i angiogeneze (Sinčić i Herceg 2011).

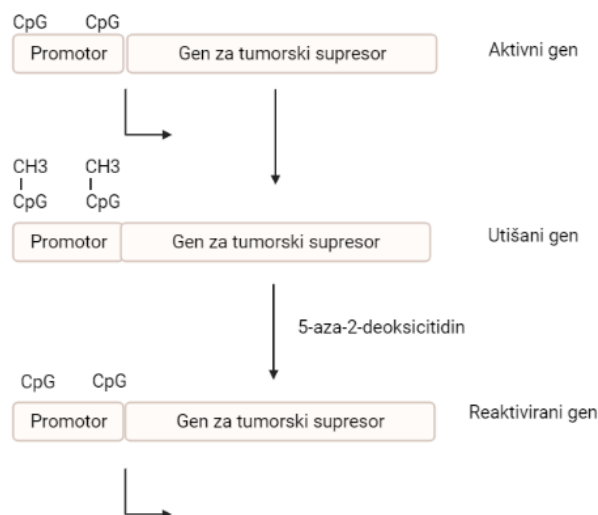
1.3.2.2. Globalna demetilacija

Iako se mnogo toga već zna o ulozi hipermetilacije molekule DNA u utišavanju gena, puno manje se zna o povezanosti nastanka tumora i aberantnoj hipometilaciji molekule DNA. Hipometilacija je prva epimutacija zamijećena u karcinomima prije više od četvrt stoljeća te je dokazana u gotovo svim karcinomima, no unatoč tome, njena uloga ostaje i dalje slabo poznata (Feinberg i Tycko 2004; Feinberg i Vogelstein 1983). Smatra se da globalni gubitak 5mC može rezultirati aktivacijom i ekspresijom gena povezanih s tumorskom invazijom i metastaziranjem te nestabilnosti kromatina (Ateeq i sur. 2008). Slično kao i hipermetilacija DNA, gubitak metilacije može biti tumor-specifičan, odnosno u različitim tumorima mogu specifično biti hipometilirane različite regije genoma (Wermann i sur. 2010). Zanimljivo je da se hipometilacija čini ranim događajem u karcinogenezi, iako globalne razine metilacije DNA mogu proći daljnje promjene tijekom tumorske progresije. Globalna razina metilacije u genomskoj DNA pokazala se korisnim biomarkerom rizika za razvoj pojedinog tipa tumora te može biti iskorištena u prediktivnom testiranju rizika i molekularnoj epidemiologiji (Sinčić i Herceg 2011).

1.3.3. Demetilacijski agensi kao antitumorski lijekovi

Proces metilacije citozina je reverzibilan proces te se kao takav može iskoristiti za biološke i biokemijske manipulacije u svrhu razvoja novih terapijskih pristupa (Palii i sur. 2008). Danas se sve više ide u smjeru razvoja i primjene lijekova koji potiču demetilaciju i ponovnu aktivaciju gena za tumorske supresore. Trenutno dostupni lijekovi su inhibitori metiltransferaza DNA: 5-azacitidin (5-azaC), 5-aza-2'-deoksicitidin (5-azadC), poznatiji kao decitabin te zebularin (ZEB) (Christman 2002; Stresemann i sur. 2006). Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) odobrila je lijekove 5-azaC i 5-azadC za liječenje mijelodisplastičnog sindroma te drugih tipova leukemije (Issa 2005). Ovi spojevi djeluju kao analozi citozina, metabolički su aktivni *in vivo* te se tijekom replikacije ugrađuju na mjesto 5-metilcitozina u molekuli DNA. Kao rezultat te reakcije, DNMT se kovalentno veže za DNA stvarajući tako međuveze DNA-protein širom genoma (Christman 2002). U konačnici, ovo rezultira snižavanju razine topljive forme proteina DNMT, što vodi ka globalnoj demetilaciji i reaktivaciji tumorskih supresora (Slika 6.) (Weisenberger i sur. 2004). Njihovom reaktivacijom može doći do stvaranja termalne diferencijacije stanica, senescencije, inhibicije rasta te gubitak klonogenosti (Jones i Taylor 1980).

Ulazak 5-azaC i 5-azadC u stanicu odvija se preko membranskih prijenosnika nukleozida: humani koncentrativni nukleozidni prijenosnik 1 (engl. *human concentrative nucleoside transporter 1*, hCNT1) i ekvibrativni nukleozidni prijenosnik (engl. *equilibrative nucleoside transporter 1*, hENT1) (Rius i sur. 2009). Nakon što uđu u stanicu, prolaze kroz tri koraka fosforilacije kako bi postigli svoj aktivni oblik. Azacitidin se fosforilira do difosfatnog oblika pomoću kinaze uridin-citidin, dok se azadeoksicitidin fosforilira pomoću deoksicitidin-kinaze. 5-azacitidin zbog svoje ribonukleozidne strukture nije specifični inhibitor metiltransferaze DNA te se najvećim djelom ugrađuje u RNA i tako interferira s transkripcijom i translacijom proteina (Cihak 1974). Taj problem se riješio razvojem deoksiribonukleozidnog analoga, 5-azadC, koja se ugrađuje u DNA uzrokujući tako demetilaciju CpG-otoka i kromosomsku nestabilnost te puno učinkovitije inhibira metiltransferazu DNA (Jones i Taylor 1980). Problem koji se veže uz 5-azadC je izrazita citotoksičnost pri visokim dozama. No, u slučaju decitabina pokazano je da ukoliko se primjeni u niskim dozama kroz dulji vremenski period, ili pak u kombinaciji s nekim drugim lijekovima, učinkovitost u inhibiranju DNMT je povećana, dok je citotoksičnost smanjena (Issa i sur. 2004). Spoj zebularin se pokazao u usporedbi s druga dva spoja puno stabilniji i manje toksičan (Cheng i sur. 2003).



Slika 6. Reaktivacija ekspresije gena tumorskog supresora djelovanjem 5-aza-2'-deoksicitidina. Tijekom replikacije, 5azadC, zahvaljujući svojoj strukturi, ugrađuje na mjesto 5-metilcitozina i inhibira metilaciju DNA tako što dolazi do stvaranja kovalentne veze između 5azadC i metiltransferaze DNA (DNMT). U konačnici, dolazi do snižavanja razine topljive forme proteina DNMT, što vodi ka globalnoj demetilaciji i reaktivaciji tumorskih supresora (slika preuzeta i prilagođena iz Momparler 2005).

1.3.4. Detekcija metilacije DNA pomoću metode analize krivulje mekšanja visoke rezolucije osjetljive na metilaciju

Obrasci metilacije DNA sve više postaju od velikog interesa za istraživanje i otkrivanje specifičnih biomarkera određenih tipova tumora. Detekcija metilirane DNA u tumorskim stanicama ili čak DNA iz krvi ili plazme pacijenata oboljelih od karcinoma mogu predstavljati značajan alat u dijagnostici tumora (Sinčić i Herceg 2011). Stoga je jasna potreba za razvojem nove dostupnije i preciznije tehnologije koja bi osigurala uvođenje metilacijskih testova u dijagnostici. Jedna od relativno novijih metoda za otkrivanje obrazaca metilacije je metoda analize krivulje mekšanja visoke rezolucije osjetljive na metilaciju (engl. *methylation-specific high resolution melting curve analysis*, MS-HRM). MS-HRM metoda je bazirana na lančanoj reakciji polimerazom (PCR) s mogućnošću detekcije razine metilacije specifične regije gena od interesa. Ova metoda je prvenstveno bila namijenjena u genotipizacijskim istraživanjima, primjerice u istraživanju polimorfizama jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP), a princip je kasnije prenesen i na istraživanje statusa metilacije genske regije od interesa (Wittwer i sur. 2003). Guldborg i suradnici prvi su započeli korištenje analize krivulje mekšanja u istraživanjima metilacije (Worm i sur. 2001). Nedavni razvoj uređaja nove generacije, napredak u razumijevanju kemije fluorescentnih boja, novi pristup u dizajniranju početnica te razvoj računalnih programa za analizu krivulje mekšanja visoke rezolucije doveli su do razvoja metode MS-HRM (Wojdacz i Dobrovic 2007).

Tijekom umnažanja molekule DNA metodom PCR-a, metilne skupine se uklanjaju s citozina pomoću polimeraze DNA. Stoga je potrebno molekulu DNA, prije same reakcije PCR-a, prvo kemijski obraditi pomoću natrijeva bisulfita (NaHSO_3) kako bi se očuvala metilacijska informacija. Taj postupak se naziva bisulfitna konverzija (Wojdacz i sur. 2008). Natrijev bisulfit mijenja nemetilirane citozine u uracil, dok 5-metilcitozini ostaju nepromijenjeni (Slika 7.). Rezultat bisulfitne reakcije su amplikoni nastali iz metiliranog kalupa bogatog bazama CG kod kojih su citozini očuvani i amplikoni nastali iz nemetiliranih kalupa gdje su citozini prešli u uracil.

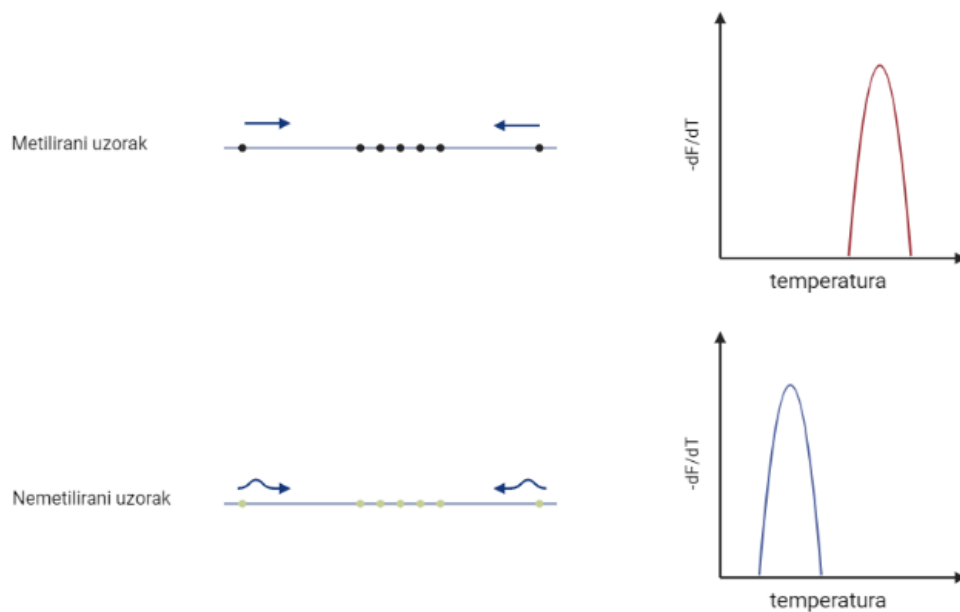
Prije bisulfitne konverzije: 5' – CATGCGAAGGCTATCCTAGAACCGCGTTCA – 3'
3' – GTACGCTTCCGATAGGATCTTGCACAAGT – 5'

Nakon bisulfitne konverzije: 5' – TATGCGAAGGTTATTTTAGAACCGCGTTTA – 3'
3' – GTATGCAATTGATAGGATTTTGCCTTGT – 5'

Slika 7. Prikaz određene regije prije i nakon bisulfitne konverzije. Metilirani citozini koji su dio dinukleotida CpG, tijekom bisulfitne konverzije ostaju očuvani i na slici su podcrtani i prikazani crvenom bojom. Nemetilirani citozini se bisulfitnom konverzijom pretvaraju u uracil koji se tijekom reakcije PCR zamjenjuju timinom, a na slici su prikazani plavom bojom (slika preuzeta i prilagođena iz protokola EpiMelt BRCA1 tvrtke Methyl Detect).

Nakon bisulfitne konverzije, DNA ulazi u reakciju umnažanja u kojoj je prisutna fluorescencijska boja kao što je npr. SYBR Green I koja se veže za dvolančanu molekulu DNA, omogućujući tako praćenje umnažanja molekule DNA tijekom reakcije PCR u stvarnom vremenu (engl. *real-time*). Nakon određenog broja ciklusa, kad proces amplifikacije DNA dođe u plato fazu, dolazi do povećanja temperature kako bi se produkti reakcije PCR razdvojili u jednolančanu DNA. Kako se temperatura povećava svakih 0,1°C/s, lanci novonastalih produkata PCR-a se razdvajaju, interkalirana boja se oslobađa i tako dolazi do pada fluorescencije. Softver aparata za PCR formira krivulje mekšanja koje pokazuju odnos između temperature i razine fluorescencije. Amplikoni nastali iz kalupa bogatog metiliranim regijama sadrže mnogo baza CG između kojih djeluju trostruke vodikove veze te će se oni razdvojiti pri višoj temperaturi, za razliku od amplikona nastalih iz nemetiliranih kalupa bogatih baznim parovima AT između kojih su dvostruke vodikove veze (Slika 8.). Stoga se metilirani aleli razdvajaju od nemetiliranih na osnovi količine toplinske energije potrebne da se lanci molekule DNA razdvoje (Wojdacz i sur. 2008). Visoka osjetljivost ove metode rezultat je specifičnog dizajna početnica koje su dizajnirane tako da su komplementarne s metiliranom regijom od interesa te mogu detektirati razinu metilacije između 0,1% i 1% (Wojdacz i sur. 2009). Rezultati dobiveni analizom MS-HRM su semikvantitativni, a dobivaju se usporedbom dobivenog profila mekšanja (krivulje) testnih uzoraka i standarda poznatog stupnja metilacije DNA koji se pripremaju razrjeđivanjem potpuno metilirane DNA u nemetiliranoj DNA (Wojdacz i sur. 2008).

MS-HRM je relativno brza i ne toliko skupa metoda koja se može koristiti za detekciju i analizu razine metilacije u testnim uzorcima te kao takva bi mogla naći svoje mjesto u istraživačkim laboratorijima, ali i u dijagnostici (Wojdacz i Dobrovic 2007).



Slika 8. Shematski prikaz principa metode MS-HRM. Početnice (plave strelice) su dizajnirane tako da su komplementarne s metiliranom regijom od interesa, a temperatura vezanja početnica je prilagođena tako da se može vezati i na metilirani i na nemetiliranu regiju. Slika pokazuje rezultat krivulje mekšanja kod potpuno metiliranog uzorka (crvena krivulja) i kod nemetiliranog uzorka (plava krivulja). S obzirom na to da kod metiliranog uzorka postoje snažne trostruke vodikove veze između parova baza CG, potrebna je veća temperatura da dođe do razdvajanja lanaca te je zato krivulja pomaknuta u desno, u odnosu na nemetilirani uzorak, odn. ima višu temperaturu mekšanja (slika preuzeta i prilagođena iz Hussmann i Hansen 2018).

2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Hipoteza ovog rada je da metilacija promotora gena *BRCA1* i *BRCA2* utječe na njihovu razinu ekspresije u uzorcima tumorskog tkiva seroznog raka jajnika visokog stupnja malignosti.

SPECIFIČNI CILJEVI

- 1) Na setu svježih uzoraka tkiva HGSOC i zdravih jajovoda metodom qRT-PCR odrediti razinu ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2* u uzrocima tkiva HGSOC i kontrolnog tkiva zdravih jajovoda.
- 2) Uhodati metodu analize krivulje mekšanja visoke rezolucije osjetljive na metilaciju (MS-HRM).
- 3) Odrediti razinu metilacije promotora gena *BRCA1* i *BRCA2* u uzrocima tkiva i pune krvi HGSOC te kontrolnog tkiva zdravih jajovoda.
- 4) Povezati ekspresiju gena *BRCA1* i *BRCA2* sa stupanjem metilacije njihovih promotora u uzorcima tkiva HGSOC i kontrolnog tkiva zdravih jajovoda.
- 5) Istražiti utjecaj globalne demetilacije DNA na razinu ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2* te posljedično na stvaranje dvolančanih lomova molekule DNA u staničnoj liniji raka jajnika visokog gradusa OVCAR-3.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Za izradu ovog rada korišteni su svježi uzorci tkiva seroznog raka jajnika visokog gradusa i zdravih jajovoda te uzorci pune krvi pacijentica s rakom jajnika, prikupljeni u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb u sklopu projekta HRZZ-a IP-2016-06-1268. Obradeno je 41 uzorak seroznog raka jajnika visokog gradusa, 22 uzorka zdravih jajovoda te 17 uzoraka pune krvi pacijentica s rakom jajnika.

Također, istraživanje je provedeno i na staničnoj liniji karcinoma jajnika čovjeka OVCAR-3 (ATCC® HTB-161™) koja predstavlja stanični model seroznog raka jajnika visokog gradusa. Riječ je o komercijalno dostupnoj staničnoj liniji koja se uzgaja kao adherentna kultura u Petrijevim zdjelicama uz dodatak medija DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) s 20% fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS) i 0,01 mg/mL inzulina (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, SAD). Stanična linija je uzgajana u inkubatoru u kontroliranim uvjetima, na temperaturi od 37 °C i 5% CO₂. Stanice su održavane u eksponencijalnoj fazi rasta u kulturi, uz redovito mijenjanje medija i presađivanje.

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija molekula RNA iz tkiva

Uzorci tumorskog tkiva su bili pohranjeni u krio-ampulama na -80 °C, u otopini za stabilizaciju molekula RNA, RNAlater (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, SAD). Netom prije same izolacije RNA, uzorke sam izvadila iz zamrzivača i stavila ih u posudu s ledom.

Izolaciju molekula RNA iz tkiva radila sam pomoću komercijalnog seta za izdvajanje RNA, Absolutely RNA miRNA Kit (Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD). Tkivo sam izvadila iz krio-ampule te ga stavila u Petrijevu zdjelicu koja se nalazila na ledu. Pomoću sterilnih škarica i pincete sam odrezala komadić tkiva i izvagala približno 25 mg tkiva. Komadić tkiva sam prebacila u mikroeprijetu te dodala 600 µL pufera za lizu i 4,2 µL β-merkaptoetanol. Služeći se škaricama, tkivo sam jako dobro usitnila, a potom sam dodala 600 µL 1:1 (v/v) mješavine neutralnog fenola i kloroforma. Mikroeprijetu sam nakratko vorteksirala te centrifugirala 4 minute, na najvećoj brzini od 16000 rcf (engl. *relative centrifugal force*; hrv. relativna centrifugalna sila) (centrifuga 5415D Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Gornju vodenu fazu sam prebacila u novu mikroeprijetu i dodala 600 µL 24:1 (v/v) mješavine kloroforma i izoamilnog alkohola. Smjesu sam protresla 10 sekundi, a zatim

centrifugirala 2-3 minute, na najvećoj brzini. Gornju vodenu fazu (600 μ L) sam prebacila na predfiltarsku kolonu koja se nalazila u mikroepruveti od 2 mL i centrifugirala 3 minute na najvećoj brzini. Predfiltarsku kolonu sam bacila, a filtrat sam prebacila u čistu mikroepruvetu od 2 mL. Na filtrat sam dodala 1,25 volumena apsolutnog etanola i protresla 15 sekundi. Zatim sam 600 μ L smjese prebacila u RNA-vezujuću kolonu koja se nalazi u mikroepruveti od 2 mL i centrifugirala na najvećoj brzini 1 minutu. Filtrat sam bacila, a RNA-vezujuću kolonu sam vratila u mikroepruvetu te ostatak preostale smjese lizata i etanola prebacila na RNA-vezujuću kolonu i ponovila korak centrifugiranja. Preostali filtrat sam bacila te dodala 600 μ L nisko zasoljenog pufera za ispiranje i centrifugirala 1 minutu na najvećoj brzini. Dobiveni filtrat sam bacila, a RNA-vezujuću kolonu prebacila natrag u mikroepruvetu od 2 mL te ponovila korak centrifugiranja od 2 minute kako bi se matriks na koji je vezana RNA dodatno osušio. Nakon toga pripremila sam otopinu DNaze, tako što sam pomiješala 50 μ L digestijskog pufera DNaze i 5 μ L DNaze I. DNaza I je jako osjetljiva pa sam smjesu samo lagano protresla, a zatim dodala 55 μ L pripremljene smjese na matriks RNA-vezujuće kolone i inkubirala na 15 minuta na 37 °C. Potom sam dodala 600 μ L visoko zasoljenog pufera za ispiranje i centrifugirala 1 minutu na najvećoj brzini. Dobiveni filtrat sam bacila, a RNA-vezujuću kolonu sam vratila natrag u mikroepruvetu od 2 mL. Ponovno sam dodala 600 μ L nisko zasoljenog pufera za ispiranje i centrifugirala 1 minutu na najvećoj brzini. Filtrat sam bacila i ponovila prethodni korak ispiranja s nisko zasoljenim puferom. Nakon što sam bacila filtrat, ponovila sam korak centrifugiranja kako bi se matriks dodatno osušio. RNA-vezujuću kolonu sam prebacila u čistu mikroepruvetu od 1,5 mL te dodala 50 μ L pufera za eluiranje direktno na matriks. Kako bi eluiranje RNA bilo što učinkovitije, inkubirala sam 1 minutu, a potom centrifugirala 1 minutu na najvećoj brzini. Izoliranoj RNA sam potom odredila koncentraciju i čistoću na spektrofotometaru NanoPhotometer N50/N60 (Implen, München, Njemačka), koji mjeri apsorbanaciju na valnim duljinama 230 nm, 260 nm i 280 nm. Prije samog mjerenja, kalibrirala sam uređaj tako što sam dodala 1 μ L pufera u kojem je RNA otopljena, a nakon toga sam nanijela 1 μ L uzorka i očitala izmjerenu koncentraciju i čistoću. Između svakog nanošenja uzorka, bilo je potrebno očistiti mjesto na koje se nanosio uzorak. Nakon mjerenja koncentracije, RNA sam pospremila na -80 °C.

Drugi način kojim je izolirana molekula RNA je pomoću reagensa za izolaciju ukupne RNA NukleoZOL (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka). Pomoću tog protokola izolirala sam RNA iz taloga stanica stanične linije OVCAR-3. Na talog sam dodala 500 μ L NukleoZOL-a i dobro resuspendirala. Potom sam dodala 200 μ L vode očišćene od RNaza, i smjesu dobro protresla 15 sekundi. Nakon toga je uslijedila inkubacija na sobnoj temperaturi 15 minuta.

Nakon inkubacije, uzorke sam centrifugirala na 12000 x g 15 minuta. Nakon centrifugiranja na dnu mikroepruvete je vidljiv pelet koji sadrži DNA, proteine i polisaharide, dok se RNA nalazi u supernatantu. Stoga sam 500 µL supernatanta prebacila u čistu, prethodno označenu mikroepruvetu od 1,5 mL. Na prebačeni supernatant sam dodala 500 µL izopropanola kako bi se RNA precipitirala. Uzorke sam inkubirala na sobnoj temperaturi 10 minuta, a nakon toga centrifugirala 10 minuta na 12000 x g. Dobiveni supernatant sam bacila, a na talog sam dodala 500 µL 75%-tnog etanola i centrifugirala 3 minute na 8000 x g. Nakon centrifugiranja, uklonila sam etanol te ponovila još jednom prethodni korak. Nakon ispiranja s etanolom, na pelet RNA sam dodala 1X pufera TE (Tris-HCl i EDTA, pH = 8,0) i protresla 3 minute kako bi se RNA otopila. Nakon toga sam izmjerila koncentraciju na spektrofotometru i pospremila uzorke na -80 °C.

3.2.2. Izolacija molekula DNA iz tkiva i pune krvi

Iz uzoraka tkiva karcinoma jajnika, zdravih jajovoda i stanica OVCAR-3 izolirala sam DNA pomoću komercijalnog seta za izolaciju DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Njemačka). Uzorke tkiva koji su se nalazili u zamrzivaču na -80 °C stavila sam u posudu napunjenu ledom. Služeći se sterilnim škarcicama i pincetom komadić tkiva izvadila sam iz krio-ampule i stavila ga na Petrijevu zdjelicu te izrezala manji komadić i izvagala da masa bude približno 25 mg. Izrezani komadić tkiva sam prebacila u mikroepruvetu od 1,5 mL i još ga dodatno usitnila kako bi liza tkiva bila uspješnija. Potom sam dodala 180 µL pufera ATL i 20 µL Proteinaze K. Smjesu sam dobro protresla i stavila u termoblok (Biosan TS-100) na 56 °C na 300 rpm i ostavila preko noći da se tkivo razgradi. Idući dan sam tkivo prvo protresla i kratko centrifugirala a zatim dodala 200 µL pufera AL i protresla 15 sekundi i zatim stavila na termoblok na 70 °C, na 300 rpm, 10 minuta. Nakon inkubacije, uzorke sam kratko centrifugirala i dodala 200 µL 96%-tni etanola, protresla 15 sekundi i ponovno kratko centrifugirala. Cijeli sadržaj iz mikroepruvete od 1,5 mL prebacila sam u sabirnu mikroepruvetu od 2 mL u koju je položena QIAamp Mini spin kolona s membranom i potom centrifugirala 1 minutu na 8000 rpm. Kolonu sa membranom sam prebacila u novu mikroepruvetu za sakupljanje i dodala 500 µL pufera AW1 i centrifugirala 1 minutu na 8000 rpm. Ponovno sam kolonu sa membranom stavila u čistu sabirnu mikroepruvetu i dodala 500 µL pufera AW2 i centrifugirala 3 minute na 13200 rpm. Dobiveni filtrat sam bacila te kolonu s membranom vratila u istu sabirnu mikroepruvetu te ponovila korak centrifugiranja 1 minutu na najvećoj brzini kako bi eliminirala potencijalni zaostatak pufera AW2. Kolonu s membranom sam potom stavila u čistu

mikroeprevetu od 1,5 mL i dodala 100 μ L pufera AE direktno na membranu. Uzorke sam inkubirala 1 minutu i potom centrifugirala 1 minutu na 8000 rpm. Prethodni korak sam ponovila tako da sam tih 100 μ L dobivenog filtrata ponovno nanijela na membranu kako bi se DNA dodatno eluirala. Nakon inkubacije i centrifugiranja, kolonu s membranom sam bacila, a mikroeprevete u kojima se nalazi DNA stavila na termoblok na 37 °C 10 minuta. Izoliranoj DNA sam izmjerila koncentraciju na spektrofotometru i pospremila u zamrzivač na -20 °C.

Iz uzoraka krvi pacijentica oboljelih od seroznog raka jajnika visokog gradusa izolirala sam molekulu DNA pomoću metode izoliranja. Postupak izoliranja se odvija u dvije faze: u prvoj fazi se razgrađuju eritrociti osmotskom lizom te leukociti iz kojih se oslobađa DNA molekula, a u drugoj fazi dodatkom NaCl dolazi do izoliranja proteina.

Krvi su se nalazile u epruvetama s antikoagulansom EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) pospremljene u zamrzivač na -20 °C. Neposredno prije izolacije, krvi sam izvadila iz zamrzivača, pobrisala alkoholom i stavila u posudu napunjenu ledom da se otope. Nakon otapanja, krv sam iz epruvete prelila u prethodno pripremljenu i označenu čistu, nezračenu epruvetu (Falcon) od 50 mL. Epruvetu u kojoj se krv nalazila sam dobro isprala s puferom RCLB (engl. *red cell lysis bufer*; hrv. pufer za lizu crvenih krvnih stanica) i cijeli sadržaj prelila u epruvetu od 50 mL koju sam onda na kraju još nadopunila do 40 mL puferom RCLB. Epruvetu sam potom dobro protresla i stavila na led 15 minuta. Nakon inkubacije na ledu, epruvete sam centrifugirala 10 minuta na 5000 rpm na 4 °C. Dobiveni supernatant sam odlila i na talog dodala 10 mL pufera RCLB i protresla na vorteksu da se razbije cijeli talog. Zatim sam u epruvetu dodala pufer RCLB do ukupnog volumena od 25 mL i centrifugirala 10 min na 5000 rpm, na 4 °C. Supernatant sam odlila, a ukoliko je talog i dalje bio crven, ponovila sam korak dodavanja pufera RCLB i centrifugiranja. Kada je talog postao žute boje, supernatant sam odlila, a epruvete s talogom sam okrenula naopako i stavila na papirnati ubrus da se što bolje ocijedi. Potom sam na talog dodala 2 mL pufera SE (NaCl i Na₂-EDTA, pH = 8,0), malo protresla i zatim dodala 200 μ L 10%-tnog SDS-a (engl. *sodium dodecyl sulphate*, hrv; natrij dodecil sulfat) i 15 μ L proteinaze K. Na kraju sam epruvete pospremila u vodenu kupelj na 37 °C i ostavila preko noći. Idući dan, epruvete sam izvadila iz vodene kupelji te sadržaj prelila u plastične epruvete od 13 mL i zatim dodala 750 μ L 5 M NaCl i protresla dok ne postane mliječno-bijele boje. Epruvete sam potom centrifugirala 15 minuta na 5000 rpm na sobnoj temperaturi. Sadržaj sam prelila u nove epruvete i ponovila centrifugiranje s istim uvjetima. Potom sam sadržaj ponovno prebacila u nove epruvete i dodala 3,5 mL izopropanola i lagano sam miješala okretanjem epruvete gore-dolje, sve dok DNA nije postala vidljiva. U međuvremenu sam pripremila i označila mikroeprevete od 2 mL i u svaku dodala 100-500 μ L

pufera TE (ovisno o količini vidljive DNA). Pomoću sterilne staklene Pasteurove pipete koja je prethodno isprana u apsolutnom etanolu, molekulu DNA sam namotala na vrh pipete i isprala je u hladnom etanolu, a zatim je stavila u odgovarajuću mikroepruvetu s puferom TE. Mikroepruvete sam preko noći stavila na termoblok na 37°C da se DNA što bolje otopi. Slijedeći dan izmjerila sam koncentraciju i čistoću uzoraka DNA na spektrofotometru i potom ih čuvala na sobnoj temperaturi.

3.2.3. Reverzna transkripcija

Prije analize ekspresije gena lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*, qRT-PCR), izoliranu RNA je potrebno prepisati u komplementarnu DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA), obzirom da je cDNA puno stabilnija molekula. Enzim odgovoran za prepisivanje molekule RNA u cDNA je reverzna transkriptaza. Postupak reverzne transkripcije sam provela pomoću komercijalnog seta za reverznu transkripciju (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts SAD). Unutar seta nalazi se enzim reverzna transkriptaza, pufer RT, deoksinukleotidi (dalje u tekstu dNTP) te nasumične heksanukleotidne početnice. Prije samog rada očistila sam radnu površinu alkoholom te izvadila sve komponente potrebne za reakciju da se otope. Nakon otapanja sve sam lagano protresla i kratko centrifugirala. Pripremila sam i označila mikroepruvete od 0,2 mL te u njih dodala 500 ng odgovarajuće molekule RNA i nadopunila vodom oslobođenu od nukleaza (engl. *water-free RNase*) do volumena od 16,5 µL. Potom sam pripremila reakcijsku smjesu (tzv. master mix) koja je uključivala komponente komercijalnog seta. Pripremljenu reakcijsku smjesu sam kratko protresla i centrifugirala, te u svaku pripremljenu mikroepruvetu dodala 8,5 µL, tako da je ukupni volumen u mikroepruveti bio 25 µL (Tablica 1.).

Tablica 1. Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju.

KOMPONENTA	POČETNA KONCENTRACIJA	KONAČNA KONCENTRACIJA	VOLUMEN
pufer RT	10X	1X	2,5 µL
dNTP	100 mM	5 mM	1 µL
Nasumične početnice	10X	1X	2,5 µL
Reverzna transkriptaza	50 U/µL	2,5 U/µL	1,25 µL

Reakcija reverzne transkripcije odvijala se u uređaju za PCR GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD) prema programu navedenom u Tablici 2. Nakon završetka reakcije, dobivenu cDNA sam pospremila na -20 °C do daljnjeg korištenja.

Tablica 2. Uvjeti reakcije reverzne transkripcije.

Temperatura (°C)	25	37	85	4
Vrijeme (min)	10	120	5	∞

3.2.4. Određivanje relativne ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2* metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu je pouzdana i precizna metoda za kvantifikaciju umnažanja specifičnih molekula nukleinskih kiselina u stvarnom vremenu. Za svaki uzorak tkiva karcinoma jajnika te zdravih jajovoda analizirala sam ekspresiju gena *BRCA1* i *BRCA2*, a kao referentni gen sam koristila gen *RPLP0* (engl. *ribosomal protein lateral stalk subunit P0*) koji kodira za ribosomalni protein PO te je njegova ekspresija u stanici stalno prisutna. Relativnu ekspresiju gena *BRCA1* i *BRCA2* u odnosu na referentni gen *RPLP0* sam izračunala pomoću formule $2^{-\Delta Ct}$, gdje je ΔCt razlika u ekspresiji gena od interesa (u ovom slučaju geni *BRCA1* i *BRCA2*) i referentnog gena, odnosno razlika u Ct-vrijednostima gena *BRCA1* i *BRCA2* i gena *RPLP0*. qRT-PCR se radi u pojedinačnim mikropruветama ili u pločicama s 96 bunarčića.

Prvo sam pripremila reakcijsku smjesu za svaki gen zasebno, a reakcijska smjesa je sadržavala Supermix IQ SYBR GREEN (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD) 2x (50% v/v), početnice F (0,3 mM), početnice R (0,3 mM) te vode do ukupnog volumena od 9 μ L po reakciji. Po 9 μ L reakcijske smjese sam dodala u svaki bunarčić, a na kraju po 1 μ L cDNA svakog uzorka u duplikatu (Tablica 3.). Osim toga za svaki gen sam imala i reakcijsku smjesu bez NTC (engl. *no-template control*) u koji nisam dodavala cDNA i to mi je služilo kao negativna kontrola, odn. pokazatelj da nije došlo do kontaminacije reakcijske smjese. Tablica 4 prikazuje nukleotidne sljedove korištenih početnica te njihove pripadajuće reference.

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za qRT-PCR.

KOMPONENTA	VOLUMEN
Supermix IQ SYBR GREEN	5 μ L
Početnice F	0,3 μ L
Početnice R	0,3 μ L
Voda	3,4 μ L
UKUPNI VOLUMEN	9 μL

Tablica 4. Slijedovi početnica korišteni za kvantitativni PCR. Oznaka F označava „*forward*“ odnosno 5'→3' smjer sekvence gena, dok su R „*reverse*“, odnosno u 3'→5' smjeru.

GEN	SMJER	NUKLEOTIDNI SLIJED (5'-3')	VELIČINA AMPLIKONA (bp)	REFERENCA
<i>RPLP0</i>	F	GGCACCATTGAAATCCTGAGTGATGTG	215	(Eichberger i sur. 2006)
	R	TTGCGGACACCCTCCAGGAAGC		
<i>BRCA1</i>	F	GATTTGACGGAAACATCTTAC	236	(Williamson i sur. 2002)
	R	CCAGCAGTATCAGTAGTATGA		
<i>BRCA2</i>	F	GCAGTGAAGAATGCAGCAGA	205	(Wu i sur. 2000)
	R	CAATACGCAACTTCCACACG		

Nakon toga sam na pločicu stavila zaštitnu foliju i centrifugirala 1 minutu na 1200 rpm. Potom sam pločicu stavila u PCR uređaj za qRT-PCR CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD) uređaj i namjestila uvjete reakcije koji su se sastojali od početne denaturacije na 95 °C, 30 sekundi, zatim 40 ciklusa na 95 °C tijekom 10 sekundi pa potom na 61 °C tijekom 30 sekundi i na kraju je određena krivulja mekšanja zagrijavanjem sa 60 °C na 95 °C. Krivulja mekšanja služi provjeri specifičnosti produkta jer svaki set početnica umnaža poznati amplikon čiji oblik krivulje mekšanja mora biti specifičan.

3.2.5. Bisulfitna konverzija

Neposredno prije određivanja metilacijskog statusa odsječka DNA, DNA je potrebno obraditi bisulfitnom konverzijom, pri čemu se nemetilirani citozini konvertiraju u uracile pomoću natrijevog bisulfitna, dok 5-mC ostaju nepromijenjeni. Na ovaj način se očuva metilacijski obrazac na molekuli DNA i omogućuje razlikovanje metilirane od nemetilirane DNA.

U svom istraživanju koristila sam komercijalni set za bisulfitnu konverziju EpiTect DNA Bisulfite Conversion Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka). Set sadrži visoko koncentriranu bisulfitnu otopinu (engl. *bisulfite solution*) i pufer za zaštitu DNA (engl. *DNA protect buffer*), koji sprječava fragmentaciju DNA tijekom bisulfitne konverzije. Druge komponente seta su različiti puferi potrebni za izolaciju i pročišćavanje bisulfitno-konvertirane DNA. Pufer BL potiče vezanje jednolančane konvertirane DNA na membranu kolone MinElute DNA spin. Nakon što se DNA vezala na membranu, membrana se zatim ispiru pomoću pufera BW jer se na taj način uklanjaju ostaci bisulfitne otopine. Pufer BD postiže desulfonaciju, a pufer EB eluira DNA s membrane te na kraju dobijemo otopljenu čistu bisulfitno-konvertiranu DNA. Da bi određivanje metilacijskih obrazaca bilo što uspješnije i točnije, jako je bitno da se bisulfitna konverzija DNA odvije u potpunosti. To se postiže tako što se DNA inkubira u visokoj bisulfitnoj koncentraciji soli, na visokoj temperaturi i pri niskom pH.

Uzorke DNA sam prvo kratko protresla i centrifugirala. Bisulfitnu otopinu sam stavila na termoblok na 60 °C da se otope precipitati koji mogu biti prisutni. U međuvremenu sam pripremila mikropruvete za PCR od 200 µL i svaku odgovarajuće označila. Količina DNA koja je ulazila u reakciju bisulfitne konverzije je 1500 ng, te sam na temelju koncentracija izoliranih DNA iz uzorka tkiva ili stanica, izračunala potrebni volumen otopine DNA koji ulazi u reakciju, a ostatak sam nadopunila vodom do ukupnog volumena od 20 µL. Ostale komponente dodala sam prema Tablici 5.

Tablica 5. Sastav reakcijske smjese za bisulfitnu konverziju.

KOMPONENTA	VOLUMEN PO REAKCIJI
1500 ng DNA	Maksimalni volumen 20 μ L
Voda	20 μ L - volumen otopine DNA
Bisulfitna otopina	85 μ L
DNA protect buffer	35 μ L
UKUPNI VOLUMEN	140 μL

Pripremljenu smjesu sam kratko protresla i centrifugirala te stavila u uređaj za PCR GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD) i namjestila uvjete prema tablici 6.

Tablica 6. Uvjeti reakcije za bisulfitnu konverziju.

KORACI	TEMPERATURA (°C)	VRIJEME (min)
Denaturacija	95	5
Inkubacija	60	20
Denaturacija	95	5
Inkubacija	60	20
Zadržavanje	20	∞

Nakon što je reakcija završila, uslijedila je druga faza gdje se odvija izolacija bisulfitno-konvertirane DNA (bcDNA). Prije samog početka druge faze, u pufer BW sam dodala 30 mL, a u pufer BD 27 mL apsolutnog etanola te bočice dobro protresla. Mikroeprovete s bcDNA sam kratko centrifugirala i sadržaj prebacila u čiste, označene mikroeprovete od 1,5 mL. Zatim sam dodala 310 μ L pufera BL, kratko protresla i centrifugirala. Nakon toga dodala sam 250 μ L 96%-tnog etanola i protresla 15 sekundi te kratko centrifugirala. Potom sam pripremila sabirne mikroeprovete od 2 mL u koje sam položila kolone MinElute DNA spin s membranom te u njih prebacila cijeli sadržaj iz mikroeproveta od 1,5 mL i centrifugirala 1 minutu na najvećoj brzini. Filtrat sam bacila, a kolone s membranom sam vratila natrag u sabirne mikroeprovete. Potom sam dodala 500 μ L pufera BW i centrifugirala 1 minutu. Filtrat sam bacila, a kolone s membranom sam vratila natrag u sabirnu mikroeprovetu te dodala 500 μ L pufera BD i ostavila

da se uzorci inkubiraju 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, uslijedilo je centrifugiranje 1 minutu, a dobiveni filtrat sam bacila. Zatim sam dodala 500 μ L pufera BD, centrifugirala 1 minutu i bacila dobiveni filtrat. Prethodni korak s puferom BW sam još jednom ponovila. Nakon toga sam dodala 250 μ L 96%-tnog etanola i centrifugirala 1 minutu na najvećoj brzini. Kolone s membranom, sam prebacila potom u nove sabirne mikroeprevete od 2 mL i centrifugirala 1 minutu kako bi se uklonili potencijalni zaostaci tekućine. Potom sam kolone s membranom prebacila u označene mikroeprevete od 1,5 mL i dodala 15 μ L pufera EB, ostavila da se inkubira 1 minutu na sobnoj temperaturi te potom centrifugirala 1 minutu da se DNA eluira. Dobivenu bcDNA sam potom pospremila i čuvala u zamrzivaču na -20 °C.

3.2.6. Analiza krivulje mekšanja visoke rezolucije osjetljiva na metilaciju (MS-HRM)

Za svaki uzorak tumorskog i zdravog tkiva jajnika te pune krvi pacijentica oboljelih od HGSOV, analizirala sam stupanj metilacije gena *BRCA1* i *BRCA2* pomoću metode MS-HRM. MS-HRM metodu sam radila pomoću komercijalnih setova EpiMelt *BRCA1* i EpiMelt *BRCA2* (Methyl Detect, Aalborg, Danska). Svaki komercijalni set sadrži mješavinu početnica za umnažanje dijelova gena *BRCA1* i *BRCA2* (dio promotorske regije i prvog eksona) koji pokrivaju različiti broj CpG-otoka (Tablica 7.). U svakom setu su još prisutna i tri standarda, odn. pozitivna, negativna i kalibracijska kontrola. Pozitivnu kontrolu čini u potpunosti (100%) metilirana sekvenca DNA na svim istraživanim CpG-otocima, negativnu kontrolu čini nemetilirana (0%) sekvenca DNA od interesa, a kalibracijska kontrola služi kao pokazatelj osjetljivosti testa jer detektira samo 1% metilacije. Važna komponenta metode je i odabir fluorescencijske boje, a ja sam koristila LightCycler 480 High Resolution Melting Master mix (Roche, Basel, Švicarska) koji sadrži boju ResoLight čija fluorescencija se mjeri na istim valnim duljinama kao i SYBR Green I.

Tablica 7. Prikaz broja i pozicije CpG-otoka (numerirano prema sekvenci ljudskog genoma verzije GRCh37/hg19) koje pokrivaju komercijalni setovi za MS-HRM EpiMelt BRCA1 i EpiMelt BRCA2 tvrtke Methyl Detect.

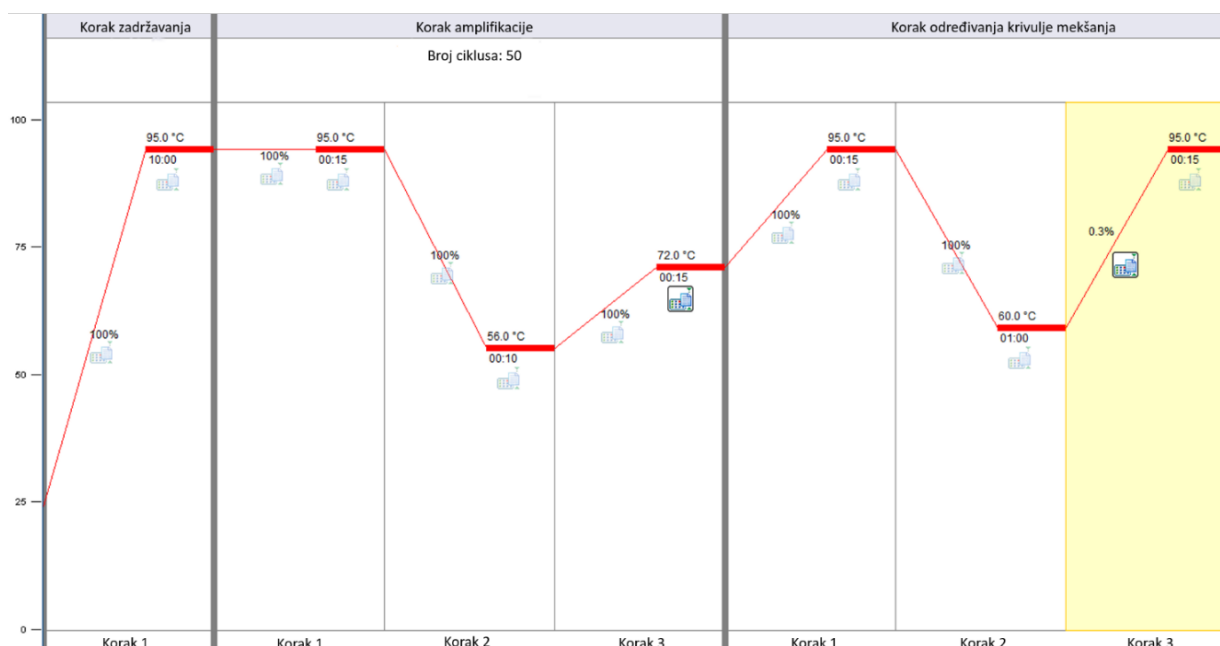
Gen	Kromosom	Oznaka sekvence gena (GenBank)	Broj analiziranih CpG-otoka	Pozicije CpG-otoka unutar genske sekvence
<i>BRCA1</i>	17.	NG_005905.2	6	41277364, 41277381, 41277389, 41277392, 41277394, 41277400
<i>BRCA2</i>	13.	NG_012772.3	9	32889861, 32889866, 32889874, 32889876, 32889881, 32889886, 32889891, 32889897, 32889899

Prije samog početka, radnu površinu i pipete sam očistila alkoholom. Bisulfitno-konvertirane uzorke i sve ostale komponente komercijalnog seta izvadila sam iz frižidera (-20 °C) i ostavila da se otope na sobnoj temperaturi, a nakon otapanja, sve sam kratko centrifugirala. Nakon toga, sam pripremila reakcijsku smjesu prema Tablici 8, zasebno za gen *BRCA1* i zasebno za gen *BRCA2*. Reakcijsku smjesu sam kratko centrifugirala te razdijelila po 14 µL u svaku mikroeprijetu od 100 µL, a netom prije svakog dodavanja, smjesu bi resuspendirala pipetom. Nakon toga bih u svaku mikroeprijetu dodala 5,5 µL H₂O te 0,5 µL odgovarajuće bisulfitno-konvertirane DNA, tako da je ukupni volumen u svakom bunarčiću 20 µL. Također, u bunarčiće koji su predviđeni za standarde, dodala sam 14 µL pripremljene reakcijske smjese i zatim 6 µL svakog odgovarajućeg standarda. Uz pozitivnu, koja čini 100% i negativnu kontrolu koja čini 0% metilirane DNA, pripremila sam razrjeđenje od 50% tako što sam u bunarčić dodala jednaki volumen pozitivne i negativne kontrole. Svaku reakciju sam radila ili u triplikatu (prilikom uhadavanja metode) ili u duplikatu, a za svaki gen sam još napravila i jednu negativnu kontrolu, tj. NTC u koju se ne dodaje bcdDNA.

Tablica 8. Sastav reakcijske smjese za MS-HRM.

KOMPONENTA	VOLUMEN PO REAKCIJI
HRM Master Mix 2X	10 μ L
EpiMelt primer mix	1 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	2,4 μ L
H ₂ O	0,6 μ L
50 ng bcDNA (uzorak ili standard)	6 mL
UKUPNI VOLUMEN	20 μL

Na kraju sam na mikropruvete stavila poklopac te ga dobro pritisnula kako ne bi došlo do isparavanja uzoraka. Potom sam mikropruvete centrifugirala 2 minute na 1500 rcf i stavila ih u uređaj za qRT-PCR StepOnePlus (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD) te u programu za upravljanje aparatom StepOne Software v2.3 (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, SAD) podesila postavke koje zahtjeva reakcija (Slika 9.). Nakon reakcije u istom programu sam analizirala krivulje mekšanja.



Slika 9. Uvjeti reakcije za MS-HRM. Program se sastoji od 3 koraka: Prvi korak je pre-inkubacija gdje se temperatura povećava na 95 °C, pri čemu dolazi do denaturacije i razdvajanja lanaca. Idući korak je amplifikacija i odvija se u 50 ciklusa. U ovom koraku se nakon razdvajanja lanaca na temperaturi od 95 °C, temperatura spušta na 56 °C i tu dolazi do vezanja početnica, a potom se temperatura povećava na 72 °C i dolazi do produljenja lanaca. Zadnji korak je određivanje krivulje mekšanja visoke rezolucije i tu se temperatura ponovno povećava na 95 °C, kako bi se razdvojili nastali amplikoni. Daljnji pad temperature rezultira nastanku heterodupleksa, a nakon toga, kako temperatura raste za 0,001 °C/sec, lanci se razdvajaju i oslobađaju boju koja se ugradila pri čemu dolazi do pada fluorescencije.

3.2.7. Rad na staničnoj kulturi

Rad na staničnoj kulturi sam obavljala u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima sa laminarnim protokom zraka, pri tom uvijek koristeći sterilno posuđe, pribor, medij i pufere. Prije svakog rada na stanicama i odmah nakon završetka rada, radnu površinu sam očistila etanolom i sterilizirala ultraljubičastim svjetlom.

3.2.7.1. Odmrzavanje stanica

Stanična linija karcinoma jajnika čovjeka OVCAR-3 nalazila se u krio-ampuli zamrznuta na -80 °C, u mediju za zamrzavanje (50% serum, 40% medij DMEM, 10% DMSO (dimetil sulfoksid)). Dimetil sulfoksid djeluje kao krioprotektant, ali ima citotoksičan učinak pa je bitno da se postupak odmrzavanja obavi u što kraćem roku. Odmah po vađenju krio-ampule iz zamrzivača, stavila sam ju na led kako bi se stanice odmrznule. U međuvremenu sam u staklenu epruvetu dodala 5 mL medija DMEM (Gibco, Waltham, Massachusetts, SAD) za rast stanica, sa dodatkom 20% fetalnog goveđeg seruma (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD). Nakon

što su se stanice odvojile od stjenke krio-ampule, sadržaj sam prelila u staklenu epruvetu s medijem i potom centrifugirala 5 minuta na 4 °C na 1200 rcf. Nakon centrifugiranja, uklonila sam supernatant te na talog dodala 10 mL medija DMEM i dobro resuspendirala. Cijeli sadržaj iz staklene epruvete sam prenijela u unaprijed označenu Petrijevu zdjelicu promjera 10 cm (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka). Petrijevu zdjelicu sam lagano protresla kako bi se stanice ravnomjerno rasporedile i potom spremila u inkubator (Kambič, Semič, Slovenija) s kontroliranim uvjetima (5% CO₂ i temperatura od 37 °C).

3.2.7.2. Presađivanje i održavanje stanica u kulturi

Nakon što se uspostavila adherentna stanična kultura u Petrijevoj zdjelici, stanicama sam mijenjala medij otprilike svaka dva do tri dana. Medij sam mijenjala na način da sam sadržaj iz Petrijeve zdjelice uklonila pomoću sterilne pipete, a čistom sterilnom pipetom, bih dodala 10 mL svježeg medija. Kada stanice postanu konfluentne, tj, kada prekriju površinu Petrijeve zdjelice, tada bih stanica presadila.

Presadivanje stanica sam radila na način da bih prvo uklonila medij sterilnom pipetom, te bih drugom sterilnom pipetom lagano uz stjenku zdjelice, dodala 5 mL pufera PBS (engl. *Phosphate-Buffered Saline*; 1,7 mM KH₂PO₄, 136 mM NaCl, 1 mM Na₂HPO₄, KH₂PO₄, pH 7,2). Potom bih pufer ravnomjerno rasporedila po površini kako bi se isprao zaostali medij i zatim bi ga uklonila. Korak ispiranja s PBS-om je dosta važan jer se na taj način uklanja zaostali medij koji može deaktivirati djelovanje tripsina. Nakon ispiranja s puferom PBS, dodala sam 1 mL tripsina s dodatkom 1mM EDTA te inkubirala oko 5 minuta uz lagano protresanje zdjelice kako bi se stanice podigle. Kako bih bila sigurna da su se stanice odvojile od podloge, pregledala sam ih pod inverznim svjetlosnim mikroskopom BIB-10 (Boeco, Hamburg, Njemačka). Nakon tripsinizacije, na stanice sam dodala 5 mL medija DMEM te ih nekoliko puta resuspendirala uvlačenjem sadržaja u sterilnu pipetu i naglim ispuštanjem po podlozi Petrijeve zdjelice. Zatim sam 1 mL stanične suspenzije prenijela u novu Petrijevu zdjelicu te nadodala još 10 mL svježeg medija.

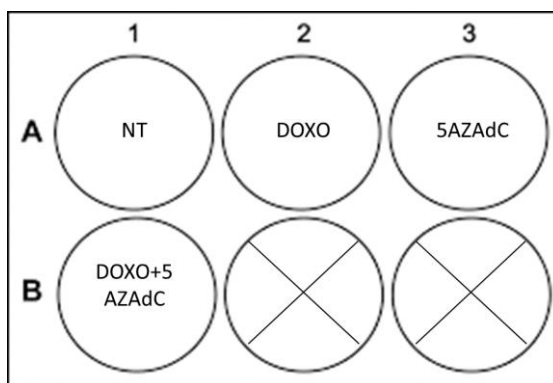
3.2.7.3. Tretman stanica 5-aza-2'-deoksicitidinom i doksorubicinom

Kako bi provjerila učinak demetilirajućeg agensa na nastanak oštećenja molekule DNA te razinu metilacije, stanice sam tretirala spojevima 5-aza-2'-deoksicitidinom i doksorubicinom. Doksorubicin je vrlo agresivan tip kemoterapeutika i koristi se u liječenju leukemija, neuroblastoma, karcinoma dojki te većina metastatskih karcinoma. S obzirom da doksorubicin izaziva dvolančane lomove na molekuli DNA, u ovom eksperimentu je služio kao pozitivna

kontrola. Stanice sam tretirala doksorubicinom u koncentraciji od 0,5 mM (podatak preuzet iz literature (Patankar i sur. 2013)). 5-az-2'-deoksicitidin je demetilirajući spoj koji djeluje na globalnoj razini, uzrokujući demetilaciju molekule DNA. Prema preporuci kolega iz Laboratorija za staničnu biologiju i prijenos signala staničnu liniju OVCAR-3 tretirala sam koncentracijom od 1 μ M.

Stanice nasadene u Petrijevoj zdjelici sam izvadila iz inkubatora te im uklonila medij, isprala s 5 mL PBS-a i tripsinizirala s 1 mL tripsina s dodatkom 1 mM EDTA. Nakon toga sam stanice resuspendirala u 5 mL medija DMEM i prebacila u prethodno pripremljenu sterilnu staklenu epruvetu. Zatim sam uzela 20 μ L stanične suspenzije i resuspendirala u 80 μ L metilenskog modrila (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD), a potom sam 20 μ L nanijela na Neubauerovu komoricu za brojanje stanica. Stanice sam izbrojala u sva četiri velika kvadratna polja komorice, od kojih se svaki sastoji od 16 manjih kvadrata, te pomoću formule $(\text{broj stanica} / 0,4) \times 5 \times 10^3$ izračunala potreban broj stanica po mililitru medija. Iz dobivenog ukupnog broja stanica po mililitru suspenzije preračunala sam potreban volumen suspenzije stanica. Stanice sam nasadila u pločice za uzgoj sa šest bunarčića (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka), tako da u svakom bunarčiću bude 50×10^3 stanica. S obzirom da sam trebala vidjeti učinak tretmana na ekspresiju gena *BRCA1* i *BRCA2* (qRT-PCR), status metilacije (MS-HRM) te nastanak DNA lomova (protočna citometrija), stanice sam nasadila na tri pločice sa šest bunarčića (Slika 10.). Stanice sam nasadivala na način da sam u svaki bunarčić dodala izračunati volumen suspenzije stanica te isti zatim nadopunila s odgovarajućim volumenom medija za rast stanica do 2 mL. Pločicu sam spremila u inkubator i ostavila na 24 sata. Idući dan, iz svakog bunarčića sam uklonila medij i isprala s 1 mL PBS-a. Pripremila sam potrebna razrjeđenja spojeva, tako da koncentracija doksorubicina u svakom bunarčiću bude 0,5 μ M, a 5-aza-2-deoksicitidina 1 μ M u 1 mL medija DMEM. Nakon tretmana, pločicu sam lagano protresla kako bi se reakcijska smjesa jednako raspodijelila po cijelom bunarčiću, a potom sam ju pospremila u inkubator i iduća dva dana ponovila tretman. Peti dan stanice sam sakupila na način da sam uklonila medij, isprala s 1 mL pufera PBS, te tripsinizirala s 200 μ L tripsina s dodatkom 1 mM EDTA. Nakon tripsinizacije, stanice sam resuspendirala u 1 mL PBS-a te sadržaj iz bunarčića prenijela u prethodno pripremljenu i označenu mikroeprevetu od 2 mL. Mikroeprevete sam potom centrifugirala na 5 minuta, na 4 °C, pri 1200 rcf. Nakon centrifugiranja, uklonila sam supernatant, a na talog ponovno dodala 1 mL PBS-a i ponovila postupak centrifugiranja. Zatim sam ponovno uklonila supernatant. Taloge stanica predviđene za izolaciju DNA i RNA, pospremila sam na -20 °C, a taloge stanica koji su predviđeni za

protočnu citometriju, sam ostavila kako bih dalje mogla nastaviti protokol za analizu oštećenja molekule DNA.



Slika 10. Raspored bunarčića za tretman stanica OVCAR-3. NT – kontrola, netretirane stanice; DOXO – stanice tretirane doksorubicinom; 5AZAdC – stanice tretirane 5-aza-2'-deoksicitidinom; DOXO+5AZAdC – stanice tretirane doksorubicinom i 5-aza-2'-deoksicitidinom.

3.2.8. Protočna citometrija

Metoda protočne citometrije, pomoću lasera i mikrokapilarne tehnologije, omogućuje kvantifikaciju određene subpopulacije stanica u suspenziji koristeći različite vrste fluorokroma. Guava Muse stolni protočni citometar (Luminex, Austin, Teksas, SAD) je instrument koji uz pomoć komercijalnih setova istovremeno kvantificira do tri stanična parametra poput vijabilnosti stanica, proliferacije, apoptoze, oksidativnog stresa, oštećenja stanica, zatim faza staničnog ciklusa i aktivacije određenih signalnih puteva. U svrhu ovog diplomskog rada koristila sam komercijalni set za analizu oštećenja molekule DNA.

3.2.8.1. Analiza oštećenja molekule DNA

Za analizu oštećenja molekule DNA koristila sam komercijalni set Muse Multi-Color DNA Damage (MCH200107, Luminex, Austin, Teksas, SAD) koji omogućuje prikaz količine jednolančanih i dvolančanih lomova DNA. Oštećenje se detektira pomoću dva antitijela koja se nalaze u setu: anti-fosfo-ATM (Ser1981)-PE i anti-fosfo-histon H2A.X (Ser139)-PECy5. Aktivirana antitijela na ATM ili H2A.X ukazuju na količinu jednolančanih lomova DNA, dok njihova zajednička aktivacija pokazuje količinu dvolančanih lomova DNA.

Nakon nasađivanja stanica i tretmana od tri uzastopna dana, peti dan sam stanice sakupila i dobivene taloge resuspendirala u 50 µL pufera za ispitivanje te još dodala isti volumen fiksacijskog pufera i dobro promiješala pipetom. Uzorke sam inkubirala 10 minuta na ledu. Nakon inkubacije, uzorke sam centrifugirala 5 minuta na 300 x g. Supernatant sam bacila, a na

talog dodala 100 μL permeabilizacijskog pufera i ponovno inkubirala na ledu 10 minuta. Dok su se uzorci inkubirali, pripremila sam smjesu antitijela na ATM i H2A.X. Za svaki uzorak potrebno je dodati 5 μL svakog antitijela, tako da sam smjesu antitijela pripremila za 4 uzorka. Potom je uslijedilo centrifugiranje 5 minuta, nakon kojeg sam uklonila supernatant. Talog sam resuspendirala u 90 μL pufera za ispitivanje i dodala u svaki uzorak 10 μL smjese antitijela. Svaku mikroeprevetu sam zamotala u aluminijsku foliju i stavila na rotex na 30 minuta. Nakon inkubacije, dodala sam 100 μL pufera za ispitivanje i centrifugirala 5 minuta te uklonila supernatant. Dobiveni talog stanica resuspendirala sam u 200 μL pufera za ispitivanje. Neposredno prije očitavanja, uređaj je potrebno očistiti odabirom opcije „*System clean*“. Nakon čišćenja, odabrala sam opciju „*DNA damage*“, a nakon toga slijedi kalibracija sustava. Kalibriranje sustava sam napravila tako da sam dodala prvi uzorak (netretirane stanice) u instrument i prema njegovom očitavanju se postave parametri za dimenzije stanica koje će se istraživati. Nakon kalibracije, započinje testiranje, gdje se svaki uzorak se analizira tri puta (po 1000 stanica), a prije svakog stavljanja, uzorak je potrebno resuspendirati kako bi se stanice što bolje raspršile. Završetkom analize, dobivene rezultate sam prebacila na USB memoriju, a instrument ponovno očistila opcijom „*System clean*“.

3.2.9. Statistička obrada podataka

Genska ekspresija za svaki uzorak tkiva i stupanj metilacije za svaki uzorak tkiva i krvi određena je u tehničkom duplikatu, a za kemijske tretmane stanične linije OVCAR-3 u triplikatu. Analiza oštećenja molekule DNA za svaki kemijski tretman stanične linije OVCAR-3 određena je u triplikatu. Normalnost distribucije kontinuiranih varijabli (vrijednosti genske ekspresije i postotka dvolančanih lomova molekule DNA) testirana je pomoću D'Agostino-Pearsonovog testa. Za analizu varijabli koje su slijedile normalnu distribuciju korišteni su parametrijski testovi: nezavisni t-test za ispitivanje razlika između dvije grupe te jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) s Tukey-Kramerovim *post hoc* testom za više od dvije grupe. Za analizu varijabli koje nisu slijedile normalnu distribuciju korišteni su neparametrijski testovi: Mann-Whitneyev test za ispitivanje razlika između dvije grupe te Kruskal–Wallisov test i Conoverov *post-hoc* test za više od dvije grupe.

Korelacija (povezanost) između ekspresija gena *BRCA1* i *BRCA2* određena je računanjem neparametrijskog Spearmanovog koeficijenta korelacije rangova (ρ), zajedno za tumorsko i zdravo kontrolno tkivo. Za tumačenje jačine korelacije prema iznosu statistički značajnog koeficijenta korelacije ρ korištena je skala prema Schoberu i sur. (2018): 0,00–0,10 neznatna

korelacija, 0,10–0,39 slaba korelacija, 0,40–0,69 umjerena korelacija, 0,70–0,89 jaka korelacija i 0,90–1,00 vrlo jaka korelacija.

Razlika u kategoričkim varijablama (stupanj metilacije) testirana je pomoću χ -kvadrat testa.

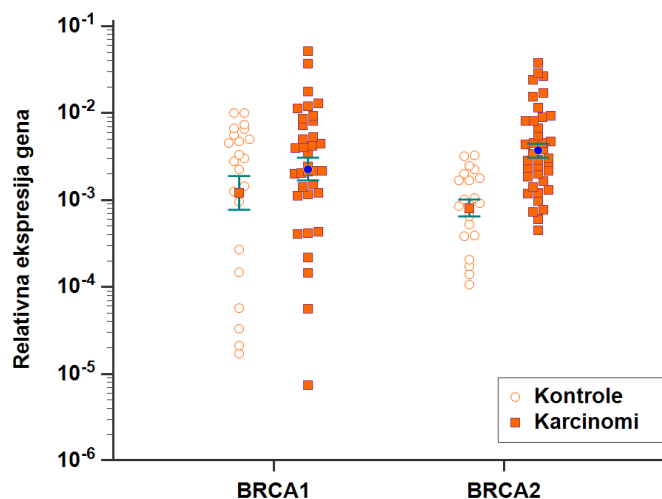
Sirovi eksperimentalni rezultati su obrađeni u programu Microsoft Excel for Microsoft 365 (Microsoft, Redmond, Washington, SAD), a statistička analiza je rađena pomoću programa MedCalc v20 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgija). Sve dvosmjerne *P*-vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima.

4. Rezultati

4.1. Ekspresija gena *BRCA1* i *BRCA2* u uzorcima tkiva seroznog raka jajnika visokog gradusa i zdravih jajovoda

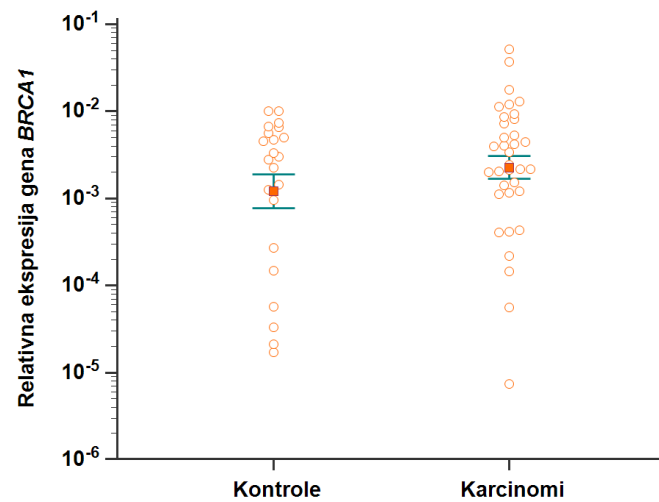
Metodom qRT-PCR određena je relativna razina ekspresije gena (mRNA) *BRCA1* i *BRCA2* u 40 uzoraka tkiva raka jajnika visokog gradusa (u daljnjem tekstu karcinomi) i 22 uzoraka tkiva zdravih jajovoda (u daljnjem tekstu kontrole). Za usporedbu razina ekspresije gena korištene su vrijednosti ΔCt , odnosno Ct-vrijednosti za svaki gen normalizirane prema Ct-vrijednosti referentnog gena *RPLP0*. Relativna razina ekspresije izražena je pomoću formule $2^{-\Delta Ct}$.

Gen *BRCA1* bio je eksprimiran u 100% uzoraka kontrola i 87,5% (35/40) uzoraka karcinoma, a gen *BRCA2* u 95,5% (21/22) kontrolnih uzoraka i 97,5% (39/40) uzoraka karcinoma. Usporedba apsolutnih vrijednosti relativnih ekspresija pokazala je da je ekspresija oba gena jača u uzorcima karcinoma u usporedbi s zdravim kontrolama, pri čemu je ekspresija gena *BRCA1* jača oko 2 puta, a ekspresija gena *BRCA2* čak oko 6 puta, što je vidljivo na Slici 11. Usporedba apsolutnih vrijednosti relativnih ekspresija gena *BRCA1* i *BRCA2* pokazala je da nema razlike u ekspresiji između ta dva gena, niti u kontrolnim uzorcima ($P = 0,058$) niti u uzorcima karcinoma ($P = 0,354$) (Slika 11.).



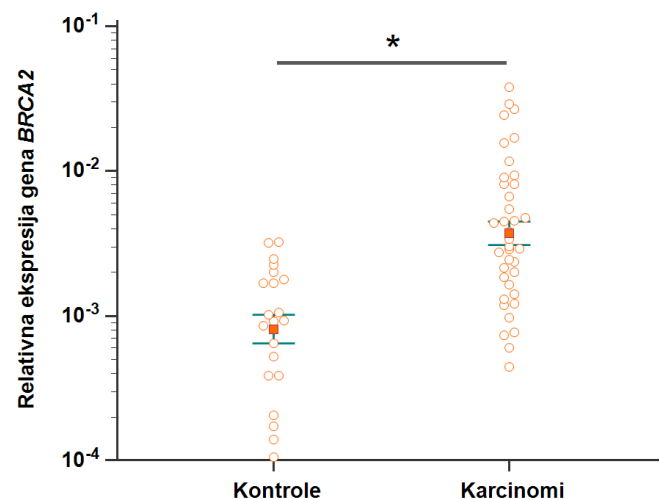
Slika 11. Usporedba apsolutnih vrijednosti relativnih ekspresija gena *BRCA1* i *BRCA2* u kontrolnim uzorcima zdravih jajovoda i karcinoma jajnika. Na grafu su označene srednje vrijednosti \pm standardna pogreška srednje vrijednosti.

Međutim, statistička analiza je pokazala da nema statistički značajne razlike u ekspresiji gena *BRCA1* između kontrolnih uzoraka i uzoraka karcinoma ($P = 0,451$) (Slika 12.).



Slika 12. Usporedba relativne ekspresije gena *BRCA1* u kontrolnim uzorcima zdravih jajovoda ($n=22$) i karcinoma jajnika ($n=35$). Između skupina nije utvrđena statistički značajna razlika. Na grafu su označene srednje vrijednosti \pm standardna pogreška srednje vrijednosti. Genska ekspresija za svaki uzorak određena je u tehničkom duplikatu.

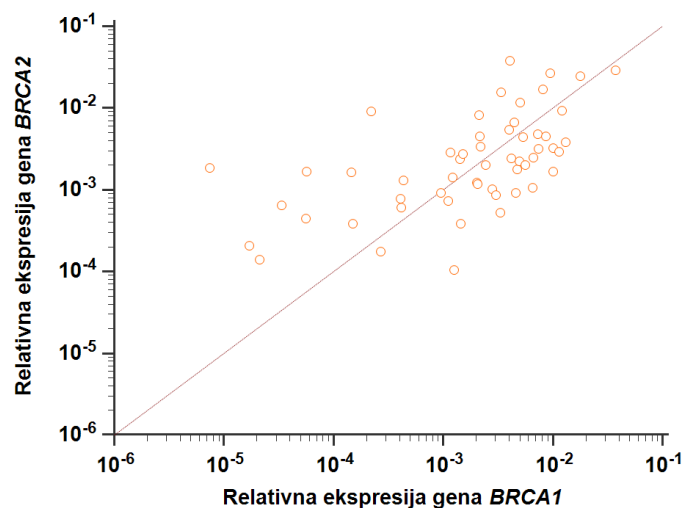
S druge strane, usporedba razina ekspresije gena *BRCA2* u kontrolnim uzorcima i karcinomima je pokazala da je gen *BRCA2* statistički značajno jače eksprimiran u uzorcima raka jajnika ($P < 0,0001$) (Slika 13.).



Slika 13. Usporedba relativne ekspresije gena *BRCA2* u kontrolnim uzorcima zdravih jajovoda ($n=21$) i karcinoma jajnika ($n=39$). Ekspresija gena *BRCA2* značajno je jača u uzorcima raka jajnika. Na grafu su označene srednje vrijednosti \pm standardna pogreška srednje vrijednosti. * označava statistički značajnu razliku $P < 0,05$. Genska ekspresija za svaki uzorak određena je u tehničkom duplikatu.

4.1.1. Korelacija između ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2*

Analiza povezanosti ekspresija oba gena pokazala je da je prisutna umjerena pozitivna korelacija između ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2* ($\rho = 0,64$, $P < 0,0001$) (Slika 14.).

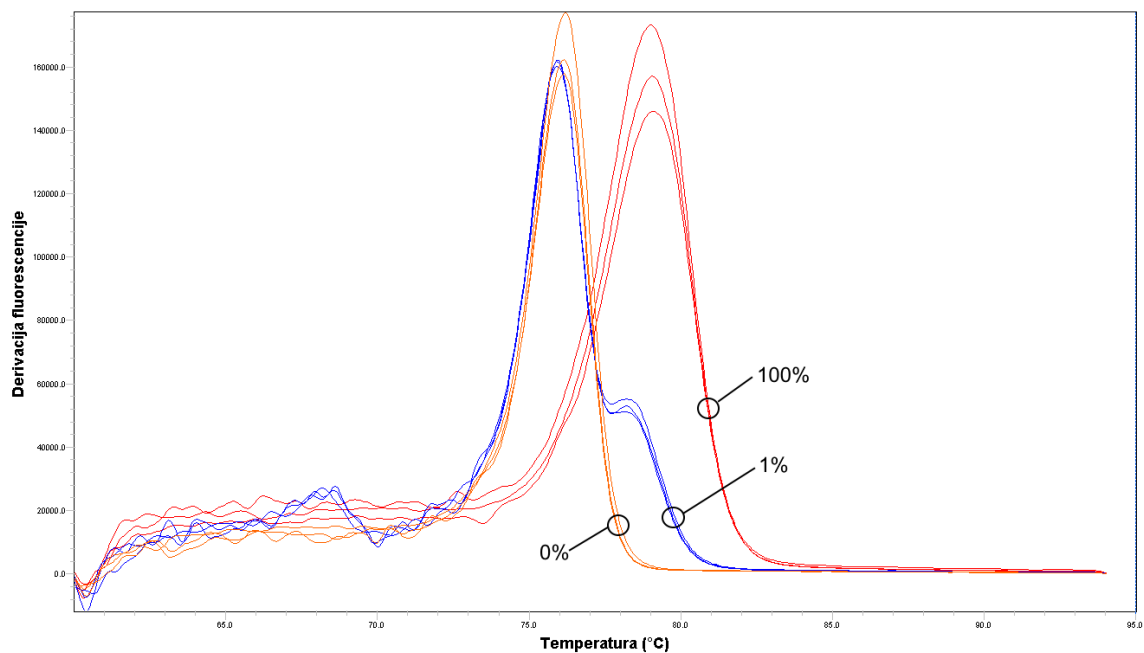


Slika 14. Korelacija između ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2* u kontrolnim uzorcima zdravih jajovoda i karcinoma jajnika. Prisutna je umjerena pozitivna korelacija ($\rho = 0,64$, $P < 0,0001$).

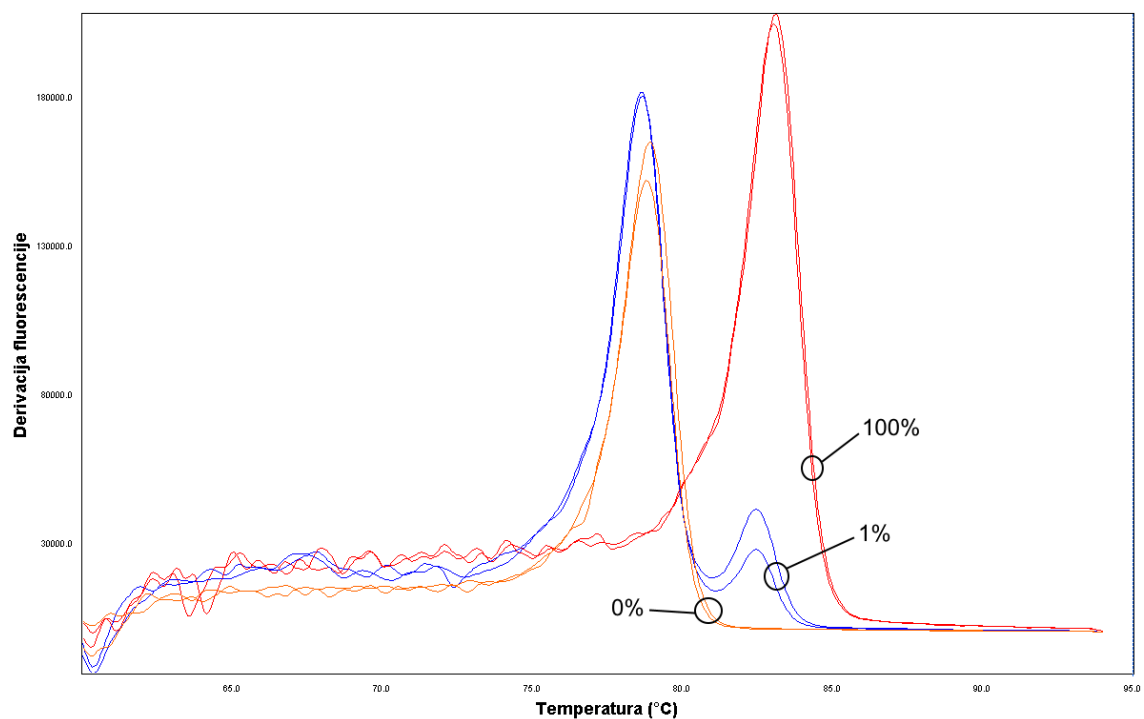
4.2. Metilacija gena *BRCA1* i *BRCA2* u uzorcima tkiva i krvi seroznog raka jajnika visokog gradusa i tkiva zdravih jajovoda

4.2.1. Rezultati uhođavanja metode MS-HRM

Prije određivanja stupnja metilacije promotora gena *BRCA1* i *BRCA2* u uzorcima, bilo je potrebno uhođati metodu MS-HRM. Korištenjem standarda, uz sastav reakcijske smjese naveden u Tablici 8 te uz uvjete reakcije PCR prikazane na Slici 9 uspješno sam uhođala metodu MS-HRM za određivanje stupnja metilacije DNA promotora gena *BRCA1* i *BRCA2*. Uspješnost metode utvrđuje se mogućnošću razlikovanja krivulja mekšanja koje predstavljaju stupanj metilacije DNA od 0% i 1%, što sam postigla i za gen *BRCA1* (Slika 15.) i za gen *BRCA2* (Slika 16.).



Slika 15. Rezultati uhodavanja metode analize krivulje mekšanja visoke rezolucije ovisne o metilaciji (MS-HRM) odsječaka DNA gena *BRCA1* različitih stupnjeva metilacije (0%, 1% i 100%). Odsječci DNA pokrivaju 6 CpG-otoka u promotorskoj regiji gena *BRCA1* (Tablica 7.).



Slika 16. Rezultati uhodavanja metode analize krivulje mekšanja visoke rezolucije ovisne o metilaciji (MS-HRM) odsječaka DNA gena *BRCA2* različitih stupnjeva metilacije (0%, 1% i 100%). Odsječci DNA pokrivaju 9 CpG-otoka u promotorskoj regiji gena *BRCA2* (Tablica 7.).

4.2.2. Rezultati analize metilacije promotora gena *BRCA1* i *BRCA2*

Nakon uspješnog uhadavanja, metodom MS-HRM odredila sam stupanj metilacije promotora gena *BRCA1* i *BRCA2* u uzorcima karcinoma jajnika i kontrolnih uzoraka zdravih jajovoda. Stupanj metilacije sam grupirala u pet kategorija prema postotku metiliranih CpG-otoka (0%, 0-50%, 50%, 50-100 % i 100%). Analizirala sam 21 uzorak DNA izolirane iz tkiva raka jajnika i 8 uzoraka DNA izoliranih iz tkiva zdravih jajovoda. Zbirni rezultati su prikazani u Tablici 9.

Tablica 9. Rezultati analize metilacije gena *BRCA1* i *BRCA2* u uzorcima DNA izoliranim iz kontrolnih uzorka zdravih jajovoda i karcinoma jajnika.

Geni	<i>BRCA1</i>		<i>BRCA2</i>	
	Kontrole	Karcinomi	Kontrole	Karcinomi
0%	0 (0%)	1 (4,8%)	8 (100%)	21 (100%)
0-50%	7 (87,5%)	13 (61,9%)	0 (0%)	0 (0%)
50%	1 (12,5%)	3 (14,3%)	0 (0%)	0 (0%)
50-100%	0 (0%)	4 (19%)	0 (0%)	0 (0%)
100%	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Iako je u uzorcima karcinoma bio veći postotak uzoraka s višim stupnjem metilacije gena *BRCA1*, statistička analiza je pokazala da nema značajne razlike ($P = 0,481$). Zanimljivo je da su svi analizirani uzorci i zdravih jajovoda i karcinoma jajnika pokazali kompletnu hipometilaciju promotora gena *BRCA2*.

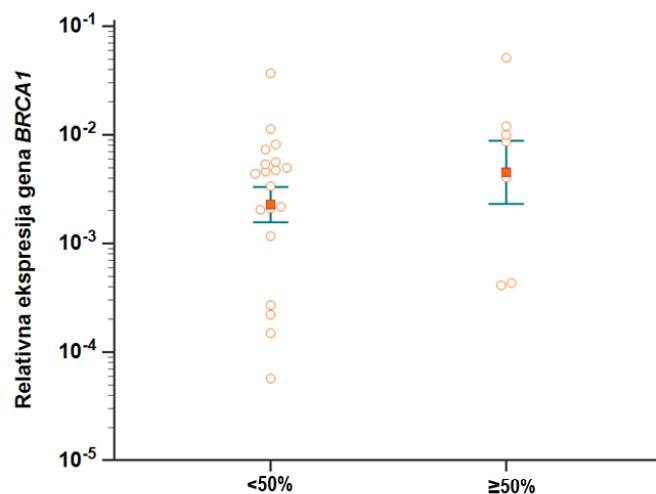
Usporedba stupnja metilacije gena *BRCA1* u uzorcima DNA koji su izolirani iz tkiva karcinoma jajnika i uzorcima DNA koja je izolirana iz pune krvi pacijenata od kojih su uzeti ti uzorci tkiva (16 uparenih uzoraka), pokazala je da se stupanj metilacije u najvećem broju slučajeva poklapa, dok samo manji broj uzoraka u krvi pokazuje niži stupanj metilacije gena *BRCA1* (Tablica 10.). Svi analizirani uzorci DNA izolirane iz krvi su jednako kao i DNA izolirana iz tkiva pokazali hipometilaciju gena *BRCA2* (rezultati nisu prikazani).

Tablica 10. Usporedba stupnja metilacije gena *BRCA1* u uparenim uzorcima DNA izoliranih iz tkiva i krvi istih pacijentica s rakom jajnika.

		Metilacija gena <i>BRCA1</i> (krv)				
		0%	0-50%	50%	50-100%	100%
Metilacija gena <i>BRCA1</i> (tkivo)	0%	0	1	0	0	0
	0-50%	0	9	0	0	0
	50%	0	3	0	0	0
	50-100%	0	3	0	0	0
	100%	0	0	0	0	0

4.2.3. Povezanost genske ekspresije sa stupnjem metilacije gena *BRCA1* i *BRCA2*

Zbog malog broja uzoraka s određenim stupnjem metilacije gena *BRCA1* (Tablica 10.), uzorke sam prema stupnju metilacije podijelila u samo dvije kategorije: $<50\%$ i $\geq 50\%$. Analiza povezanosti genske ekspresije sa stupnjem metilacije gena je pokazala da je ekspresija gena *BRCA1* viša u uzorcima koji imaju $\geq 50\%$ metilacije u usporedbi s onim koji imaju $<50\%$ metilacije, ali ta razlika nije statistički značajna ($P = 0,214$) (Slika 17.).



Slika 17. Povezanost relativne ekspresije gena *BRCA1* sa stupnjem metilacije promotora gena *BRCA1* u kontrolnim uzorcima zdravih jajovoda ($n=7$) i karcinoma jajnika ($n=19$). Između skupina nije utvrđena statistički značajna razlika. Na grafu su označene srednje vrijednosti \pm standardna pogreška srednje vrijednosti. Genska ekspresija i stupanj metilacije za svaki uzorak određeni su tehničkim duplikatima.

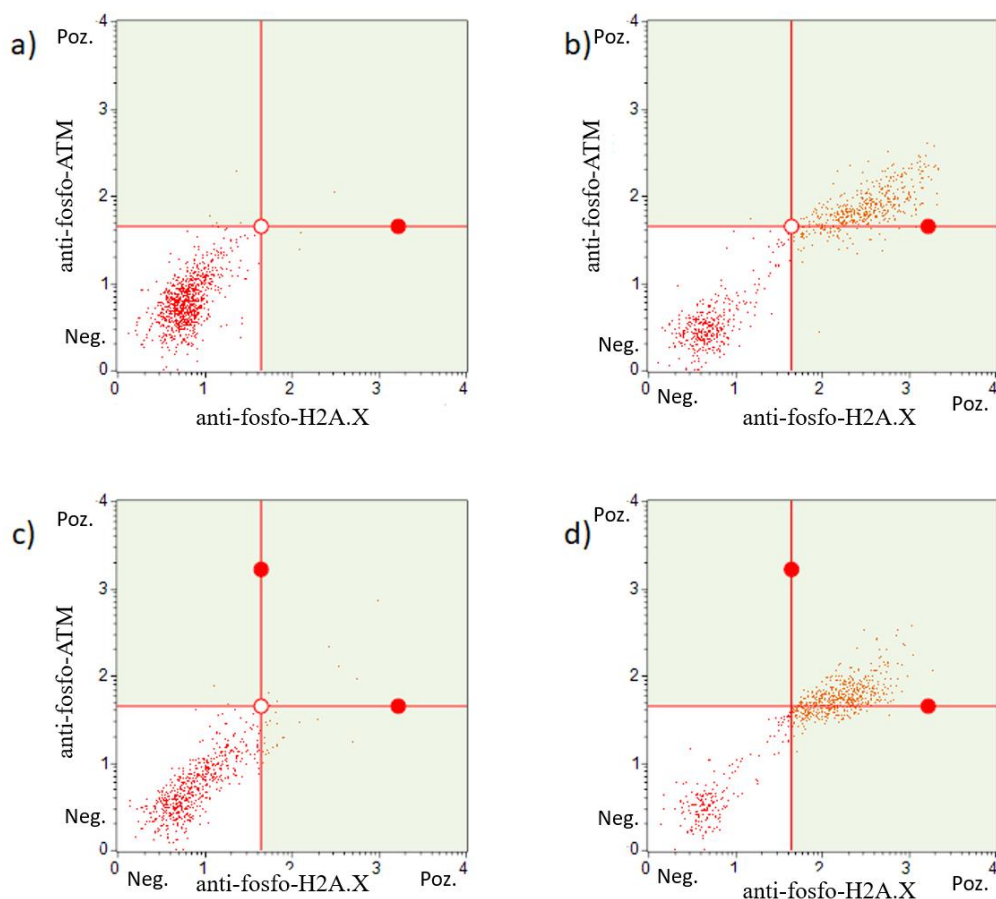
S obzirom na to da je gen *BRCA2* bio hipometiliran u svim analiziranim uzorcima tkiva, nije bilo moguće analizirati povezanost ekspresiju gena *BRCA2* sa stupnjem metilacije. Jednako tako, s obzirom na to da baš svi uzorci DNA izolirane iz krvi pokazuju isti stupanj metilacije i za gen *BRCA1* (0-50%) i gen *BRCA2* (0%), nije bilo moguće analizirati povezanost ekspresiju gena u tkivu sa stupnjem metilacije DNA u krvi.

4.3. Analiza oštećenja molekule DNA

Kvantitativno mjerenje oštećenja DNA napravljeno je pomoću komercijalnog seta za određivanje oštećenja DNA Muse Multi-Color DNA Damage kit (Luminex, Austin, Teksas, SAD). Upotrebom kombinacije antitijela specifičnih na fosforilirani protein ATM i fosforilirani histon H2A.X koja su obilježena različitim bojama moguće je pouzdano pratiti stupanj oštećenja DNA u stanicama. Aktivirana antitijela na proteine ATM ili H2A.X nam pokazuju količinu jednostrukih lomova unutar DNA, dok njihova zajednička aktivacija pokazuje količinu dvolančanih lomova unutar DNA. Programski modul korištenog protočnog citometra Muse 1.8 Analysis Software automatski izračunava postotak stanica koje nemaju oštećenje DNA, stanica koje imaju aktivirani ATM, stanica koje imaju aktivirani H2A.X te stanica koje imaju dvolančani lom DNA.

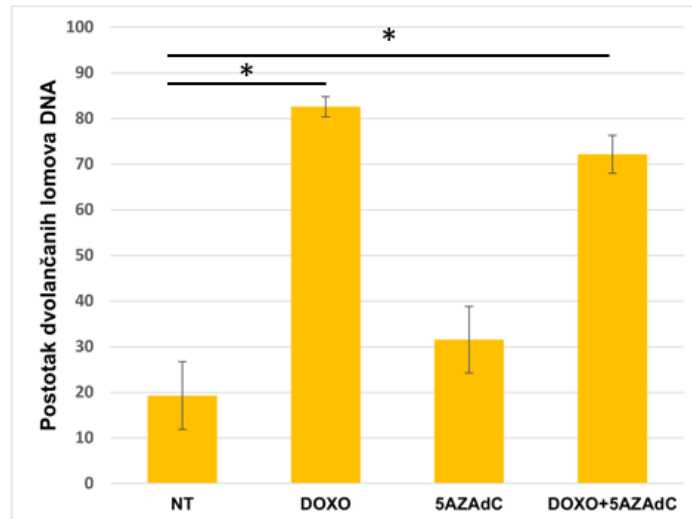
4.3.1. Utjecaj tretmana na pojavu dvolančanih lomova DNA

Metodom protočne citometrije utvrdila sam djelovanje spojeva doksorubicina, 5-aza-2'-deoksicitidina te njihove kombinacije na nastanak dvolančanih lomova molekule DNA u staničnoj liniji raka jajnika OVCAR-3 (Slika 18.). Ovom metodom dobiva se numerički podatak o postotku oštećenja DNA koji se odnosi na dvolančane lomove.



Slika 18. Prikaz nastalih oštećenja molekule DNA na temelju aktivacije antitijela protiv fosforiliranih proteina ATM i H2A.X. Netretirane stanice (a), stanice tretirane doxorubicinom (b), stanice tretirane 5-aza-2'-deoksicitidinom (c), stanice tretirane doxorubicinom i 5-aza-2'-deoksicitidinom (d). Svaki graf prikazuje stanice bez oštećenja DNA (dolje lijevo), stanice pozitivne na fosforilirani ATM (gore desno), stanice pozitivne na fosforilirani H2A.X (dolje desno) i stanice s aktivacijom oba antitijela (gore desno). Analiza oštećenja molekule DNA rađena je u tehničkom triplikatu.

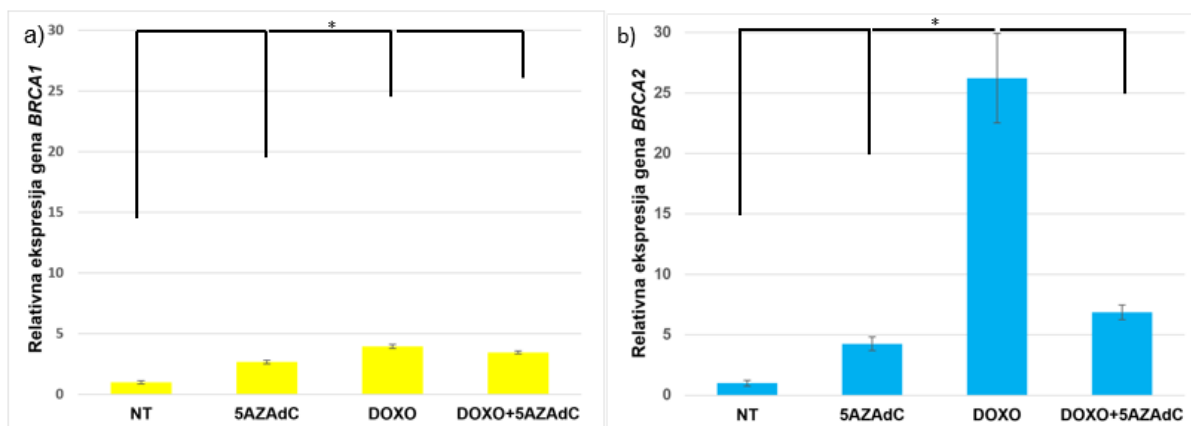
Statistička analiza je pokazala da tretman stanica dovodi do statistički značajne razlike u postotku dvolančanih lomova DNA ($P < 0,001$). *Post hoc* analiza je pokazala da, u usporedbi s netretiranim stanicama, tretman stanica doxorubicinom te kombinacijom doxorubicina i 5-aza-2'-deoksicitidina dovodi do značajnog smanjenja broja neoštećenih stanica, odnosno do povećanja količine dvolančanih lomova DNA, dok tretman samo 5-aza-2'-deoksicitidinom nema statistički značajan utjecaj (Slika 19.).



Slika 19. Postotak dvolančanih lomova molekule DNA nakon tretmana stanične linije raka jajnika OVCAR-3 doksorubicinom (DOXO), 5-aza-2'-deoksicitidinom (5AZAdC) te njihovom kombinacijom (DOXO+5AZAdC). Tretman doksorubicinom i kombinacijom doksorubicin i 5-aza-2'-deoksicitidin uzrokuje statistički značajno povećanje nastanka dvolančanih lomova DNA u usporedbi s netretiranim stanicama (NT). Na grafu su označene srednje vrijednosti \pm standardna devijacija. * označava statistički značajnu razliku $P < 0,05$. Genska ekspresija za svaki tretman određena je u tehničkom triplikatu.

4.3.2. Utjecaj tretmana na ekspresiju gena *BRCA1* i *BRCA2*

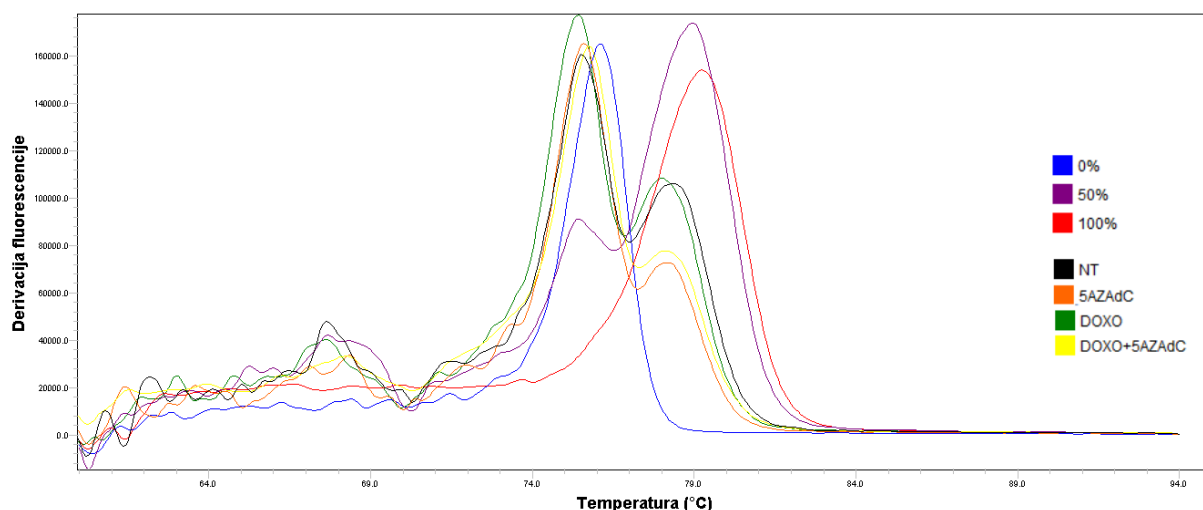
Tretiranje stanica OVCAR-3 sa spojevima doksorubicinom, 5-aza-2'-deoksicitidinom te kombinacijom ta dva spoja imalo je statistički značajan utjecaj na ekspresiju gena *BRCA1* i *BRCA2* ($P < 0,0001$ za oba gena). *Post hoc* analiza je pokazala da sva tri tretmana dovode do značajno pojačane ekspresije i gena *BRCA1* i gena *BRCA2* u usporedbi s netretiranim stanicama. Interesantno je primijetiti da navedeni tretmani imaju snažniji učinak na povećanje ekspresije gena *BRCA2*, posebno tretman doksorubicinom. (Slika 20.).



Slika 20. Relativna ekspresija gena *BRCA1* (a) i *BRCA2* (b) u stanicama OVCAR-3 nakon tretiranja 5-aza-2'-deoksicitidinom (5AZAdC), doksorubicinom (DOXO) te kombinacijom oba spoja (DOXO+5AZAdC). Na grafu su označene srednje vrijednosti \pm standardana devijacija. Genska ekspresija za svaki tretman određena je u tehničkom triplikatu.

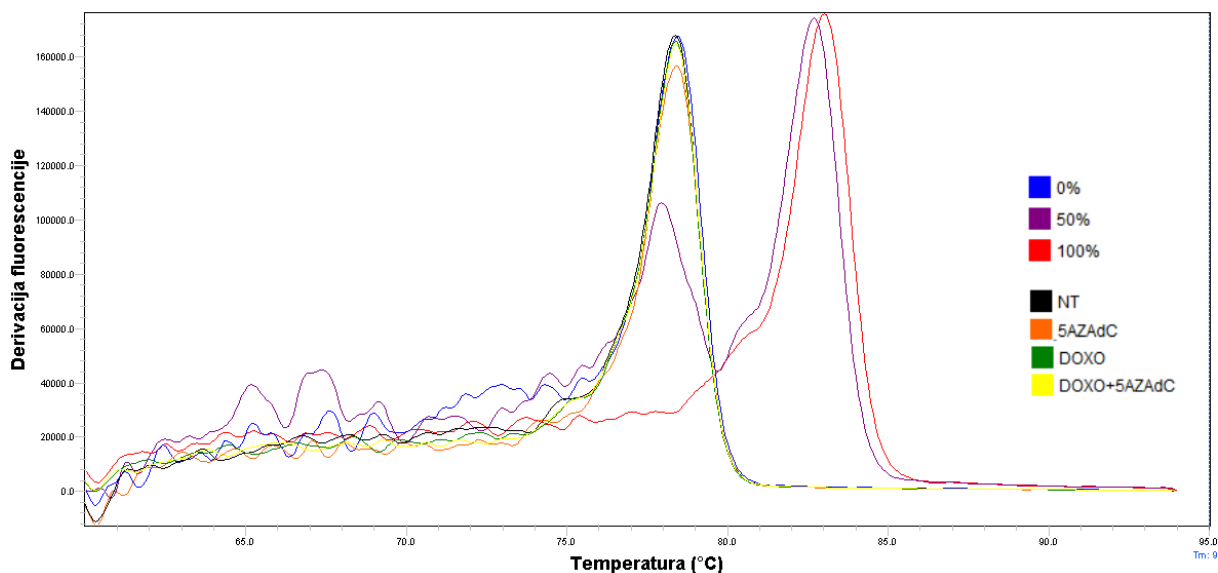
4.4. Utjecaj tretmana na metilaciju DNA

Nakon što je utvrđeno povećanje količine dvolančanih lomova molekule DNA te pojačane ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2* nakon tretmana stanične linije karcinoma jajnika OVCAR-3 doksorubicinom, 5-aza-2'-deoksicitidinom i njihovom kombinacijom, odredila sam stupanj metilacije promotora gena *BRCA1* i *BRCA2* nakon istih tretmana. Metoda MS-HRM je pokazala da tretman stanica OVCAR-3 5-aza-2'-deoksicitidinom, samostalno ili u kombinaciji s doksorubicinom, dovodi do smanjenja stupnja metilacije u usporedbi s netretiranim stanicama, dok tretman samo doksorubicinom nema utjecaj (Slika 21.). DNA netretiranih stanica OVCAR-3 inače pokazuje stupanj metilacije DNA promotora gena *BRCA1* od 0-50%.



Slika 21. Krivulje mekšanja visoke rezolucije ovisne o metilaciji (MS-HRM) odsječaka DNA promotora gena *BRCA1* izolirane iz stanica karcinoma jajnika OVCAR-3 nakon tretmana doksorubicinom (DOXO), 5-aza-2'-deoksicitidinom (5AZAdC) te njihovom kombinacijom (DOXO+5AZAdC). Tretmani 5-aza-2'-deoksicitidinom, samostalno i u kombinaciji, dovode do smanjenja metilacije u usporedbi s netretiranim stanicama (NT). Stupanj metilacije za svaki uzorak određen je u tehničkom duplikatu.

S druge strane, isti tretmani nisu pokazali nikakav utjecaj na stupanj metilacije DNA promotora gena *BRCA2*, odnosno DNA tretiranih stanica pokazuje već primijećenu kompletnu hipometilaciju promotora gena *BRCA2* (Slika 22.).

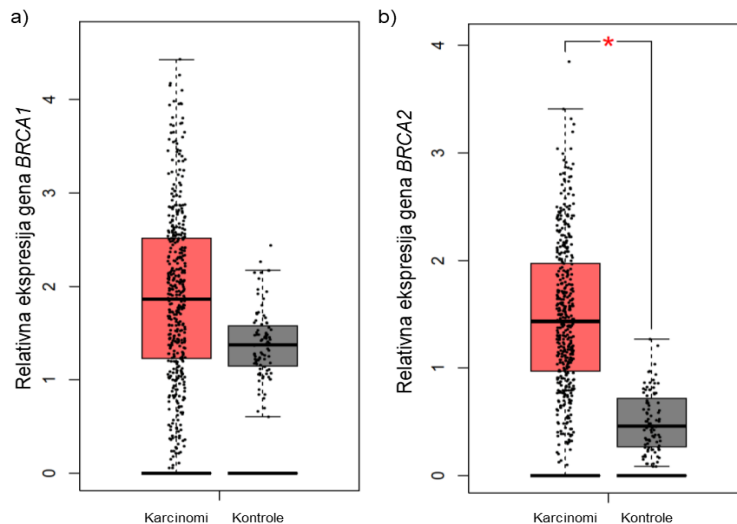


Slika 22. Krivulje mekšanja visoke rezolucije ovisne o metilaciji (MS-HRM) odsječaka DNA promotora gena *BRCA2* izolirane iz stanica karcinoma jajnika OVCAR-3 nakon tretmana doksorubicinom (DOXO), 5-aza-2'-deoksicitidinom (5AZAdC) te njihovom kombinacijom (DOXO+5AZAdC). Tretmani nemaju utjecaj na metilaciju u usporedbi s netretiranim stanicama (NT), odn. uvijek je vidljiva hipometilacija promotora gena *BRCA2*. Stupanj metilacije za svaki uzorak određen je u tehničkom duplikatu.

5. Rasprava

Serozni karcinom jajnika visokog gradusa jedan je od najčešćih tipova karcinoma jajnika te ujedno i jedan od najsmrtonosnijih (Bowtell i sur. 2015). Karakterizira ga vrlo visoka stopa mutacija u različitim genima, među kojima su i geni *BRCA1* i *BRCA2*. Osim mutacija, inaktivacija ovih gena može biti rezultat različitih epigenetskih mehanizama, među kojima je i hipermetilacija promotora. Proteinski produkti ovih gena, igraju važnu ulogu u procesu popravaka molekule DNA, procesom homologne rekombinacije. Stoga njihova disfunkcija može dovesti do nepravilnog popravka molekule DNA, genomske nestabilnosti i u konačnici do razvoja tumora.

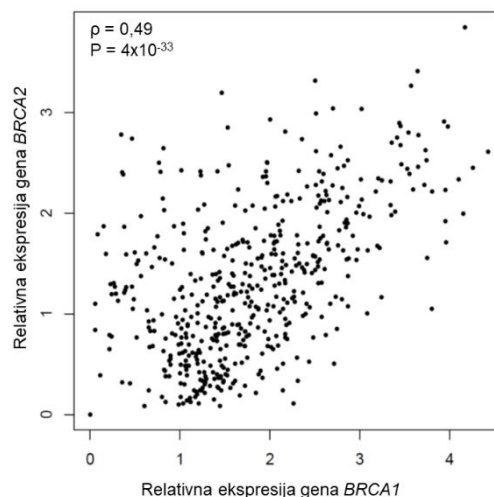
Naglasak ovog rada je bilo istražiti prisutnost metilacije gena *BRCA1* i *BRCA2* u uzorcima tkiva seroznog raka jajnika visokog gradusa te dobivene rezultate povezati s razinom ekspresije tih gena. Na setu od 40 uzoraka tkiva HGSOE (*karcinomi*) i 22 uzorka zdravih jajovoda (*kontrola*), usporedbom apsolutnih vrijednosti relativnih ekspresija, pokazala sam da je samo ekspresija gena *BRCA2* statistički značajno bila jača u karcinomima u odnosu na kontrole ($P < 0,0001$) (Slika 13.). Iako je gen *BRCA1* bio jače eksprimiran u karcinomima u odnosu na kontrole, ta razlika nije bila statistički značajna (Slika 12.). No, ukoliko uzmemo u obzir omjer razina ekspresija između tumorskog i zdravog tkiva, koji se dobije dijeljenjem srednje vrijednosti ekspresije gena u karcinomima sa srednjom vrijednosti ekspresije u kontrolnom tkivu (engl. *fold change*), vidljivo je da je gen *BRCA1* skoro 2 puta (1,88) jače eksprimiran u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo. To je vrlo blizu vrijednosti 2 što se često koristi kao granična vrijednost razlika u genskoj ekspresiji koja bi mogla imati biološki značaj (Mccarthy i Smyth 2009). Nasuprot toga, gen *BRCA2* gotovo 6 puta (5,76) je bio jače eksprimiran u tumorskom tkivu (Slika 11.). Interesantno je da se potpuno identični rezultati dobiju korištenjem web aplikacije za analizu genomske i transkriptomskih podataka GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>) (Slika 23.) (Tang i sur. 2019).



Slika 23. Ekspresija gena *BRCA1* (a) i *BRCA2* (b) u karcinomima ovarija i zdravim kontrolnim uzorcima dobivena na osnovu analize cjelokupnog transkriptoma (RNA-seq) velikog broja uzoraka. Statistička analiza potvrđuje moje rezultate da je samo gen *BRCA2* statistički značajno jače eksprimiran u karcinomima ovarija. * označava statistički značajnu razliku $P < 0,05$. (slike su preuzete i prilagođene s <http://gepia2.cancer-pku.cn/>)

Razlog povišene ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2* u tumoru može biti rezultat visoke stope proliferacije malignih stanica koje zajedno uz genomsku nestabilnost, zahtjeva veću potrebu za popravkom molekule DNA (Tsibulak i sur. 2018).

Analiza mojih rezultata je pokazala i da je ekspresija ova dva gena međusobno statistički značajno povezana, odnosno prisutna je umjerena pozitivna korelacija između ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2* ($\rho = 0,64$, $P < 0,0001$) (Slika 14.). Jednaki rezultati dobiveni su i analizom transkriptomskih podataka pomoću spomenute aplikacije GEPIA2 (Slika 24.).



Slika 24. Analiza cjelokupnog transkriptoma (RNA-seq) velikog broja uzoraka karcinoma jajnika i kontrolnog zdravog tkiva pokazala je pozitivnu korelaciju između ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2* (slika je preuzeta i prilagođena s <http://gepia2.cancer-pku.cn/>).

Takvi rezultati su također u skladu s literaturnim podacima jer je primijećeno da su tijekom epitelne proliferacije i diferencijacije stanica dojke, ekspresija gena *BRCA1* i *BRCA2* kontrolirane sličnim regulatornim putevima koji su uključeni u kontrolu stanične proliferacije i diferencijacije (Rajan i sur. 1996).

Na osnovu tih rezultata može se zaključiti da bi određivanje razine ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2* može poslužiti kao potencijalni alat u dijagnostici i liječenju karcinoma (Wang i sur. 2018). Primjerice, Taron i sur. (2008) su pokazali kako genska ekspresija gena *BRCA1* može poslužiti kao pokazatelj kemorezistencije te se vraćanjem njegove funkcije u tumorske stanice pluća, povećava osjetljivost na kemoterapeutike, paklitaksel i vinorelbin. Nadalje, jedno pretkliničko istraživanje navodi kako ekspresija gena *BRCA1* i *BRCA2* ima potencijalnu ulogu u predviđanju odgovora na terapiju karcinoma dojke (Farmer i sur. 2005).

Razumijevajući funkcije *BRCA1* i *BRCA2*, jasno je da mutacije u njihovim genima uvelike povećavaju rizik za razvoj raka jajnika. Međutim, nisu samo mutacije te koje će dovesti do narušavanja genomske cjelovitosti i procesa uključenih u popravak oštećenja molekule DNA. Epigenetičke promjene, među koje spada i metilacija molekule DNA, predstavljaju također jedan od rizika za razvoj raka jajnika (Holschneider i Berek 2000). Metilacija gena u području CpG-otoka koji su inače smješteni u blizini promotorskih regija, onemogućuje vezanje transkripcijskih čimbenika i početak transkripcije. *BRCA1* i *BRCA2* kodiraju za tumorske supresore i ukoliko se ovakav slučaj dogodi u njihovim promotorskim regijama, to rezultira njihovom smanjenom ekspresijom. Stoga se epigenetički mehanizmi smatraju jednim od ranih događaja u tumorigenezi (Turner i sur. 2004). U svom istraživanju, analizirala sam 21 uzorak DNA izolirane iz tkiva raka jajnika i 8 uzoraka DNA izoliranih iz zdravih jajovoda. Metodom MS-HRM sam odredila stupanj metilacije promotora gena *BRCA1* i *BRCA2*. Na temelju pripremljenih standarda (0%, 50% i 100%), dobivene su krivulje pomoću kojih je određeno u koju kategoriju po stupnju metilacije spada svaki određeni uzorak kontrole i tumora (Slika 15. i 16.). Kada je riječ o genu *BRCA1*, od ukupno 21 uzorak tumora, samo 1 uzorak nije bio metiliran (0%), dok su svi ostali uzorci bili metilirani u određenom postotku. Ipak, statistička analiza je pokazala da nema značajne razlike između karcinoma i kontrola ($P = 0,481$). Zanimljivo je i da od ukupno 8 kontrolnih uzoraka niti jedan nije bio 0%, već su imali određeni postotak metilacije, što bi moglo dodatno potvrditi tvrdnje da se rak jajnika razvija iz jajovoda te da bi metilacija, kao rani događaj u razvoju tumora, mogla doprinijeti njegovom nastanku (Dubeau 1999; Turner i sur. 2004). Naravno, važno je naglasiti da se eksperiment provodio na relativno malom broju uzoraka te da bi se mogli donositi konkretniji zaključci svakako je potrebno povećati broj uzoraka i za svaki tumor uzeti njemu pripadajuće kontrolno

tkivo (zdravi jajovod). Mnoga istraživanja su potvrdila metilaciju promotora gena *BRCA1*, a postotak metilacije značajno varira – od 10% do 89% (Pradjatmo 2016; Ruscito i sur. 2014; Yang i sur. 2002). No, kod većine istraživanja postotak se kreće između 10% i 35%. Razlog ovako raznolikih podataka ovisi u broju testiranih uzoraka, histologiji tumora koji je korišten u istraživanju, broju analiziranih CpG-otoka te metodi koja se koristila za određivanje postotka metilacije (Prieske i sur. 2017).

Kod gena *BRCA2*, u ovom eksperimentu se pokazalo da je u svih 21 uzoraka tumora i 8 uzoraka kontrola bio hipometiliran, što se poklapa s literaturnim navodima da je metilacija u genu *BRCA2* vrlo rijetko zastupljena (Dhillon i sur. 2004; Gras i sur. 2001). Međutim, zanimljivo je da je jedno istraživanje potvrdilo metilaciju u genu *BRCA2* u čak 98,6% (68/69) uzoraka karcinoma jajnika. No, ovdje se mora naglasiti kako su uzorci bili epitelni karcinomi jajnika koji uključuje mnoge tipove i podtipove karcinoma jajnika te je u ovom istraživanju riječ o indonezijskoj populaciji (Pradjatmo 2016). Darehdori i sur. (2012) su u svom istraživanju potvrdili metilaciju u genu *BRCA2* u 7 slučajeva od 60 (11,6%). Hipermetilacija promotora gena *BRCA2* u karcinomu jajnika uvelike varira u različitim populacijama, ovisno o prehrani, načinu života, okolišnim čimbenicima i izloženosti različitim kemijskim spojevima (Pradjatmo 2016).

Analiza povezanosti genske ekspresije sa stupnjem metilacije gena je pokazala da nema povezanosti razine ekspresije gena *BRCA1* sa stupnjem njegove metilacije ($P = 0,214$) (Slika 17.). Za gen *BRCA2* nije bilo moguće povezati razinu ekspresije sa postotkom metilacije s obzirom na to da su svi uzorci pokazali hipometilaciju. Pradjatmo i sur. (2016) potvrdili su kako metilacija gena *BRCA2* ne korelira s njegovom razinom ekspresije, što bi moglo značiti da su vjerojatno uključeni neki drugi epigenetski mehanizmi u regulaciju ekspresije gena *BRCA2*. Pretpostavlja se da stupanj metilacije ne mora nužno biti povezan s razinom genske ekspresije jer očito postoje i drugi mehanizmi koji mogu utjecati na gensku ekspresiju. Isto tako, gen može imati više promotora i ukoliko je jedan od promotora metiliran, a gen ovisi o nekom drugom promotoru, onda metilacija prvog promotora neće utjecati na ekspresiju tog gena jer će se on svakako prepisati i dati funkcionalni proteinski produkt. Osim toga, tu mogu biti uključeni i neki drugi genetski i epigenetski mehanizmi, kao što su duge nekodirajuće molekule RNA, mikroRNA te strukturne promjene molekule DNA koje također mogu utjecati na gensku ekspresiju i njenu regulaciju (Reyes i sur. 2019).

Detekcija metilacije gena *BRCA1* i *BRCA2* u uzorcima krvi mogla bi biti koristan prognostički i dijagnostički biomarker tumora (Tang i sur. 2016). Stoga smo htjeli ispitati podudara li se status metilacije gena *BRCA1* i *BRCA2* u uzorcima tkiva karcinoma jajnika sa

statusom metilacije tih gena u uzorcima pune krvi istih pacijentica. Od ukupno 16 uzoraka pune krvi i isto toliko uzoraka tumora, pokazano je da se kod 9 uzoraka poklapa postotak metilacije (0-50%), dok su ostali pokazali niži stupanj metilacije gena *BRCA1* u krvi u odnosu na tumor (Tablica 11.). Kad je riječ o genu *BRCA2*, svi analizirani uzorci DNA izolirane iz krvi su također pokazali hipometilaciju gena. Kako bi mogli donijeti zaključak o mogućnosti detekcije metilacije gena *BRCA1* u uzorcima krvi, svakako bi morali povećati broj uzoraka te za svaki uzorak tumora imati i pripadajuću krv.

Metilacija je reverzibilan proces te se biokemijskim i molekularnim manipulacijama može iskoristiti kao jedan od terapijskih pristupa u liječenju karcinoma. Globalna demetilacija i reaktivacija gena za tumorske supresore su jedan od pristupa u liječenju karcinoma (Issa 2005; Issa i sur. 2005). Jedan od takvih lijekova je i 5-aza-2'-deoksicitidin, poznat i pod imenom decitabin koji se pokazao jako uspješan u liječenju mijelodisplastičnog sindroma i akutne mijeloidne leukemije (Issa 2005). U ovom radu htjeli smo provjeriti kako tretman 5-aza-2'-deoksicitidinom djeluje na staničnu liniju karcinoma ovarija visokog gradusa OVCAR-3, s ciljem pojačavanja ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2*, radi pojačanog popravka oštećenja molekule DNA te metodom MS-HRM provjeriti je li došlo do pada u stupnju metilacije gena *BRCA1* i *BRCA2* nakon tretmana. Doksorubicin je poznati kemoterapeutik koji se koristi u liječenju leukemija, neuroblastoma, karcinoma dojki te većina metastatskih karcinoma (Renu i sur. 2018; Shafei i sur. 2017). Doksorubicin je dosta agresivan te je za njega poznato da izaziva velika oštećenja na molekuli DNA, osobito dvolančane lomove (Soleimani i sur. 2011). Nakon tri dana uzastopnog tretiranja stanica OVCAR-3 ovim spojevima, pokazano je da tretman stanica doksorubicinom dovodi do statistički značajnog smanjenja neoštećenih stanica i značajnog povećanja stanica s oštećenjem DNA ($P < 0,001$) i to najviše dvolančanih lomovima DNA u odnosu na netretirane stanice, što je u skladu sa spoznajama o djelovanju tog spoja na molekularnoj razini. Kombinirani tretman stanica s doksorubicinom i 5-aza-2'-deoksicitidinom također dovodi do statistički značajnog povećanja stanica s oštećenjem DNA. Tretman stanica samo s 5-aza-2'-deoksicitidinom ne pokazuje statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane stanice, iako se na Slici 19 vidi da je postotak oštećenja malo veći u odnosu na netretirane stanice. Također, Pali i sur. (2008) su na stanicama karcinoma kolona pokazali da 5-aza-2'-deoksicitidin izaziva oštećenja na molekuli DNA, osobito dvolančane lomove.

Metodom qRT-PCR potvrđeno je da i jedan i drugi spoj te njihova kombinacija povećavaju ekspresiju gena *BRCA1* i *BRCA2* u odnosu na netretirane stanice, osobito tretman doksorubicinom na ekspresiju gena *BRCA2* (Slika 20.). Takvi rezultati su u skladu s literaturnim navodima, gdje se navodi i da doksorubicin i 5-aza-2'-deoksicitidin potiču aktivaciju gena

uključenih u popravke molekule DNA, u ovom slučaju gene *BRCA1* i *BRCA2* (Palii i sur. 2008; Renu i sur. 2018).

Metodom MS-HRM, htjeli smo provjeriti kako se mijenja stupanj metilacije gena *BRCA1* i *BRCA2* nakon tretmana stanica doksorubicinom i 5-aza-2'-deoksicitidinom u odnosu na netretirane stanice. Tretman doksorubicinom nije imao značajan učinak na metilaciju gena *BRCA1*, što je i očekivano, s obzirom da ne djeluje kao demetilirajući spoj. Međutim, tretman 5-aza-2'-deoksicitidinom i kotretman s doksorubicinom je smanjio metiliranost, odnosno preciznije, krivulje mekšanja pokazuju da je stupanj metilacije gena *BRCA1* nešto niži u odnosu na netretirane stanice (kategorija 0-50%) (Slika 21.), dok je gen *BRCA2* i kod netretiranih i kod tretiranih stanica pokazao hipometilaciju (Slika 22).

Rezultati mog istraživanja pokazuju da je ekspresija gena *BRCA1* i osobito *BRCA2* jača u tumoru, u odnosu na kontrolu, što bi moglo značiti da bi razina mRNA gena *BRCA1* i *BRCA2* mogla služiti kao potencijalni dijagnostički biomarker razlikovanje zdravog i tumorskog tkiva. Također, iako se nije pokazalo statistički značajno vidljivo je da je metilacija gena *BRCA1* prisutna u uzorcima tkiva seroznog raka jajnika visokog gradusa, što je u skladu dosadašnjim istraživanjima (Baldwin i sur. 2000). Daljnji korak u istraživanju stupnja metilacije gena *BRCA1* bi svakako trebao obuhvatiti puno veći broj uzoraka i primjerice, kliničke podatke o preživljenju, kako bi vidjeli na koji način je hipermetilacija promotora gena *BRCA1* vezana uz preživljenje pacijentica oboljelih od HGSOc-a. Također bi bilo korisno za svaki uzorak tkiva tumora, odmah prikupiti i pripadajuću krv, kako bi se moglo vidjeti poklapa li se razina metilacije u tumoru s razinom metilacije u krvi, što bi bio puno pristupačniji i manje invazivni izvor potencijalnih dijagnostičkih tumorskih biljega. Što se tiče demetilirajućeg agensa, 5-aza-2'-deoksicitidina koji se inače pokazao jako učinkovit u liječenju mijelodisplastičnog sindroma, još se ne može donijeti zaključak bi li mogao imati potencijal u liječenju karcinoma jajnika.

6. Zaključak

Na temelju provedenog istraživanja doneseni su sljedeći zaključci:

1. Analiza genske ekspresije pomoću metode qRT-PCR-a na setu uzoraka svježeg tkiva seroznog raka jajnika visokog gradusa (HGSOC) i kontrolnih uzoraka zdravih jajovoda pokazala je statistički značajnu pojačanu ekspresiju gena *BRCA2* u uzorcima tumora.
2. Pokazano je da su ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2* međusobno u pozitivnoj korelaciji što ukazuje moguću povezanost u regulaciji njihove ekspresije.
3. Utvrđena je prisutnost određenog stupnja hipermetilacije promotora gena *BRCA1* u uzorcima tumorskog tkiva i krvi pacijentica s HGSOC, dok je kod gena *BRCA2* prisutna hipometilacija promotora.
4. Metilacija promotora gena *BRCA1* i *BRCA2* i razina genske ekspresije se nisu pokazale povezane u uzorcima HGSOC.
5. Stupanj metilacije DNA u krvi se pokazao na određenom broju uzoraka podudarnim sa stupnjem metilacije u tumoru, no na temelju toga se ne može zaključiti bi li krv mogla poslužiti kao potencijalni izvor biomarkera za dijagnostiku raka jajnika.
6. Tretman stanica demetilirajućim agensom 5-aza-2'-deoksicitidinom pojačava ekspresiju gena *BRCA1* i *BRCA2* te snižava stupanj metilacije gena *BRCA1* u uzorcima HGSOC.

7. Literatura

- Alfred G., Knudson J. (1971): Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **68**: 820–823.
- Ateeq B., Unterberger A., Szyf M., Rabbani S.A. (2008): Pharmacological inhibition of DNA methylation induces proinvasive and prometastatic genes in vitro and in vivo. Neoplasia **10**: 266–278.
- Attwood J.T., Yung R.L., Richardson B.C. (2002): DNA methylation and the regulation of gene transcription. Cell. Mol. Life Sci. **59**: 241–257.
- Auersperg N. (2013): Ovarian surface epithelium as a source of ovarian cancers: Unwarranted speculation or evidence-based hypothesis? Gynecol. Oncol. **130**: 246–251.
- Babarovi E., Kra M., Eminovi S. (2016): Recent concepts of ovarian cancer pathogenesis. Med. Flum. **52**: 362–369.
- Baldwin R.L., Nemeth E., Tran H., Shvartsman H., Cass I., Narod S., Karlan B.Y. (2000): BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: A population-based study. Cancer Res. **60**: 5329–5333.
- Bertwistle D., Ashworth A. (1998): Functions of the BRCA1 and BRCA2 genes. Curr. Opin. Genet. Dev. **8**: 14–20.
- Bird A. (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev. **16**: 6–21.
- Bowtell D.D., Wales N.S., Böhm S., Hospital J.R., Ox O. (2015): Rethinking ovarian cancer II: reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer. Nat. Rev. Cancer **15**: 668–679.
- Carreira A., Hilario J., Amitani I., Baskin R.J., Shivji M.K.K., Venkitaraman A.R., Kowalczykowski S.C. (2009): The BRC Repeats of BRCA2 Modulate the DNA-Binding Selectivity of RAD51. Cell **136**: 1032–1043.
- Carvalho D.D. De, You J.S., Jones P.A. (2010): DNA methylation and cellular reprogramming. Trends Cell Biol. **20**: 609–617.
- Catteau A., Harris W.H., Xu C.F., Solomon E. (1999): Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: Correlation with disease characteristics. Oncogene **18**: 1957–1965.
- Cheng J.C., Matsen C.B., Gonzales F.A., Ye W., Greer S., Marquez V.E., Jones P.A., Selker E.U. (2003): Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. J. Natl. Cancer Inst. **95**: 399–409.
- Christman J.K. (2002): 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: Mechanistic studies and their implications for cancer therapy. Oncogene **21**:

5483–5495.

- Cihak A. (1974): Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes. *Oncology* **30**: 405–422.
- Darehdori A.S., Dastjerdi M.N., Dahim H., Slahshoor M., Babazadeh Z., Taghavi M.M., Taghipour Z., Gaafarineveh H. (2012): Lack of significance of the BRCA2 promoter methylation status in different genotypes of the MTHFR a1298c polymorphism in ovarian cancer cases in Iran. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **13**: 1833–1836.
- Deng C.X., Brodie S.G. (2000): Roles of BRCA1 and its interacting proteins. *BioEssays* **22**: 728–737.
- Dhillon V.S., Shahid M., Husain S.A. (2004): CpG methylation of the FHIT, FANCF, cyclin-D2, BRCA2 and RUNX3 genes in Granulosa cell tumors (GCTs) of ovarian origin. *Mol. Cancer* **3**: 1–8.
- Dubeau L. (1999): The cell of origin of ovarian epithelial tumors and the ovarian surface epithelium dogma: Does the emperor have no clothes? *Gynecol. Oncol.* **72**: 437–442.
- Eden A., Gaudet F., Waghmare A., Jaenisch R. (2003): Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science.* **300**: 455.
- Eichberger T., Sander V., Schnidar H., Regl G., Kasper M., Schmid C., Plamberger S., Kaser A., Aberger F., Frischauf A.M. (2006): Overlapping and distinct transcriptional regulator properties of the GLI1 and GLI2 oncogenes. *Genomics* **87**: 616–632.
- Esteller M., Silva J.M., Dominguez G., Bonilla F., Matias-Guiu X., Lerma E., Bussaglia E., Prat J., Harkes I.C., Repasky E.A., Gabrielson E., Schutte M., Baylin S.B., Herman J.G. (2000): Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**: 564–569.
- Farmer H., McCabe H., Lord C.J., Tutt A.H.J., Johnson D.A., Richardson T.B., Santarosa M., Dillon K.J., Hickson I., Knights C., Martin N.M.B., Jackson S.P., Smith G.C.M., Ashworth A. (2005): Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**: 917–921.
- Fathalla M.F. (1971): Incessant Ovulation-a Factor in Ovarian Neoplasia ? *Lancet* **298**: 163.
- Feinberg A.P., Tycko B. (2004): The history of cancer epigenetics. *Nat. Rev. Cancer* **4**: 143–153.
- Feinberg A.P., Vogelstein B. (1983): Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**: 89–92.
- Fradet-Turcotte A., Sitz J., Grapton D., Orthwein A. (2016): BRCA2 functions: From DNA repair to replication fork stabilization. *Endocr. Relat. Cancer* **23**: 1–17.
- Friedman L.S., Ostermeyer E.A., Szabo C.I., Dowd P., Lynch E.D., Rowell S.E., King M.C.

- (1994): Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat. Genet.* **8**: 399–404.
- Gent D.C. Van, Hoeijmakers J.H.J., Kanaar R. (2001): Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat. Rev. Genet.* **2**: 196–206.
- Gibney E.R., Nolan C.M. (2010): Epigenetics and gene expression. *Heredity (Edinb.)*. **105**: 4–13.
- Gras E., Cortes J., Diez O., Alonso C., Matias-Guiu X., Baiget M., Prat J. (2001): Loss of heterozygosity on chromosome 13q12-q14, BRCA-2 mutations and lack of BRCA-2 promoter hypermethylation in sporadic epithelial ovarian tumors. *Cancer* **92**: 787–795.
- Güth U., Huang D.J., Bauer G., Stieger M., Wight E., Singer G. (2007): Metastatic patterns at autopsy in patients with ovarian carcinoma. *Cancer* **110**: 1272–1280.
- Hilton J.L., Geisler J.P., Rathe J.A., Hattermann-Zogg M.A., Deyoung B., Buller R.E. (2002): Inactivation of BRCA1 and BRCA2 in ovarian cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**: 1396–1406.
- Hoeijmakers J.H.J. (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366–374.
- Holschneider C.H., Berek J.S. (2000): Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin. Surg. Oncol.* **19**: 3–10.
- Hughes-Davies L., Huntsman D., Ruas M., Fuks F., Bye J., Chin S.F., Milner J., Brown L.A., Hsu F., Gilks B., Nielsen T., Schulzer M., Chia S., Ragaz J., Cahn A., Linger L., Ozdag H., Cattaneo E., Jordanova E.S., Schuurin E., Yu D.S., Venkitaraman A., Ponder B., Doherty A., Aparicio S., Bentley D., Theillet C., Ponting C.P., Caldas C., Kouzarides T. (2003): EMSY Links the BRCA2 Pathway to Sporadic Breast and Ovarian Cancer. *Cell* **115**: 523–535.
- Hussmann D., Hansen L.L. (2018): Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM). *Methods Mol. Biol.* **1708**: 551–571.
- Irizarry R.A., Ladd-Acosta C., Wen B., Wu Z., Montano C., Onyango P., Cui H., Gabo K., Rongione M., Webster M., Ji H., Potash J.B., Sabunciyan S., Feinberg A.P. (2009): The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat. Genet.* **41**: 178–186.
- Issa J.P. (2005): Optimizing therapy with methylation inhibitors in myelodysplastic syndromes: Dose, duration, and patient selection. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2**: 24–29.
- Issa J.P., Kantarjian H., Kirkpatrick P. (2005): Azacitidine. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**: 6–8.
- Issa J.P.J., Garcia-Manero G., Giles F.J., Mannari R., Thomas D., Faderl S., Bayar E., Lyons

- J., Rosenfeld C.S., Cortes J., Kantarjian H.M. (2004): Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* **103**: 1635–1640.
- Jayson G.C., Kohn E.C., Kitchener H.C., Ledermann J.A. (2014): Ovarian cancer. *Lancet* **384**: 1376–1388.
- Jones P.A., Baylin S.B. (2002): The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 415–428.
- Jones P.A., Baylin S.B. (2007): The Epigenomics of Cancer. *Cell* **128**: 683–692.
- Jones P.A., Laird P.W. (1999): Cancer epigenetics comes of age. *Nat. Genet.* **21**: 163–167.
- Jones P.A., Taylor S.M. (1980): Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* **20**: 85–93.
- Klotz D.M., Wimberger P. (2017): Cells of origin of ovarian cancer: ovarian surface epithelium or fallopian tube? *Arch. Gynecol. Obstet.* **296**: 1055–1062.
- Kohn E.C., Ivy S.P. (2017): Whence High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.* **37**: 443–448.
- Konstantinopoulos P.A., Ceccaldi R., Shapiro G.I., D'Andrea A.D. (2015): Homologous recombination deficiency: Exploiting the fundamental vulnerability of ovarian cancer. *Cancer Discov.* **5**: 1137–1154.
- Kurman R.J., Shih I.M. (2008): Pathogenesis of ovarian cancer: Lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **27**: 151–160.
- Lindahl T., Wood R.D. (1999): Quality control by DNA repair. *Science*. **286**: 1897–1905.
- Lupo B., Trusolino L. (2014): Inhibition of poly(ADP-ribosylation) in cancer: Old and new paradigms revisited. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1846**: 201–215.
- Mccarthy D.J., Smyth G.K. (2009): Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. *Bioinformatics* **25**: 765–771.
- McMahon K.W., Karunasena E., Ahuja N. (2017): The Roles of DNA Methylation in the Stages of Cancer. *Cancer J. (United States)* **23**: 257–261.
- Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., Futreal P.A., Harshman K., Tavtigian S., Liu Q., Cochran C., Bennett L.M., Ding W., Bell R., Rosenthal J., Hussey C., Tran T., McClure M., Frye C., Hattier T., Phelps R., Haugen-Strano A., Katcher H., Yakumo K., Gholami Z., Shaffer D., Stone S., Bayer S., Wray C., Bogden R., Dayananth P., Ward J., Tonin P., Narod S., Bristow P.K., Norris F.H., Helvering L., Morrison P., Rosteck P., Lai M., Barrett J.C., Lewis C., Neuhausen S., Cannon-Albright L., Goldgar D., Wiseman R., Kamb A., Skolnick M.H. (1994): A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility

- gene BRCA1. *Science*. **266**: 66–71.
- Momparler R.L. (2003): Cancer epigenetics. *Oncogene* **22**: 6479–6483.
- Momparler R.L. (2005): Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin. Oncol.* **32**: 443–451.
- Moscheta M., George A. (2016): BRCA somatic mutations and epigenetic BRCA modifications in serous ovarian cancer. *Annals Oncol.* **27**: 1449–1455.
- Nafee T.M., Farrell W.E., Carroll W.D., Fryer A.A., Ismail K.M.K. (2008): Epigenetic control of fetal gene expression. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* **115**: 158–168.
- Palii S.S., Emburgh B.O. Van, Sankpal U.T., Brown K.D., Robertson K.D. (2008): DNA Methylation Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidine Induces Reversible Genome-Wide DNA Damage That Is Distinctly Influenced by DNA Methyltransferases 1 and 3B. *Mol. Cell. Biol.* **28**: 752–771.
- Patankar N.A., Pritchard J., Grinsven M. Van, Osooly M., Bally M.B. (2013): Topotecan and doxorubicin combination to treat recurrent ovarian cancer: The influence of drug exposure time and delivery systems to achieve optimum therapeutic activity. *Clin. Cancer Res.* **19**: 865–877.
- Paull T.T., Cortez D., Bowers B., Elledge S.J., Gellert M. (2001): Direct DNA binding by BRCA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 6086–6091.
- Petrucelli N., Daly M.B., Feldman G.L. (2010): Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. *Genet. Med.* **12**: 245–259.
- Powell S.N., Willers H., Xia F. (2002): BRCA2 keeps Rad51 in line: High-fidelity homologous recombination prevents breast and ovarian cancer? *Mol. Cell* **10**: 1262–1263.
- Pradjatmo H. (2016): Methylation status and expression of BRCA2 in epithelial ovarian cancers in Indonesia. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **16**: 8599–8604.
- Prieske K., Prieske S., Joosse S.A., Trillsch F., Grimm D., Burandt E., Mahner S., Schmalfeldt B., Milde-Langosch K., Oliveira-Ferrer L., Woelber L. (2017): Loss of BRCA1 promotor hypermethylation in recurrent highgrade ovarian cancer. *Oncotarget* **8**: 83063–83074.
- Rajan J. V., Wang M., Marquis S.T., Chodosh L.A. (1996): Brca2 is coordinately regulated with Brcal during proliferation and differentiation in mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 13078–13083.
- Renu K., V.G. A., Tirupathi T.P., Arunachalam S. (2018). *Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy – An update*. *Eur. J. Pharmacol.* **818**: 1-72.
- Reyes H.D., Devor E.J., Warriar A., Newton A.M., Mattson J., Wagner V., Duncan G.N., Leslie K.K., Gonzalez-Bosquet J. (2019): Differential DNA methylation in high-grade

- serous ovarian cancer (HGSOC) is associated with tumor behavior. *Sci. Rep.* **9**: 1–13.
- Rius M., Stresemann C., Keller D., Brom M., Schirmacher E., Keppler D., Lyko F. (2009): Human concentrative nucleoside transporter 1-mediated uptake of 5-azacytidine enhances DNA demethylation. *Mol. Cancer Ther.* **8**: 225–231.
- Rosen E.M., Fan S., Ma Y. (2006): BRCA1 regulation of transcription. *Cancer Lett.* **236**: 175–185.
- Roy R., Chun J., Powell S.N. (2012): BRCA1 and BRCA2: Different roles in a common pathway of genome protection. *Nat. Rev. Cancer* **12**: 68–78.
- Ruscito I., Dimitrova D., Vasconcelos I., Gellhaus K., Schwachula T., Bellati F., Zeillinger R., Benedetti-Panici P., Vergote I., Mahner S., Cacsire-Tong D., Concin N., Darb-Esfahani S., Lambrechts S., Sehouli J., Olek S., Braicu E.I. (2014): BRCA1 gene promoter methylation status in high-grade serous ovarian cancer patients - A study of the tumour Bank ovarian cancer (TOC) and ovarian cancer diagnosis consortium (OVCAD). *Eur. J. Cancer* **50**: 2090–2098.
- Šekerija M., Bubanović L., Novak P., Veltruski J., Glibo M., Stavinoha M., Sarajlić G. (2020): Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2017. Hrv. zavod za javno Zdr. **Bilten 42**: 1-33.
- Shafei A., El-Bakly W., Sobhy A., Wagdy O., Reda A., Aboelenin O., Marzouk A., Habak K. El, Mostafa R., Ali M.A., Ellithy M. (2017): A review on the efficacy and toxicity of different doxorubicin nanoparticles for targeted therapy in metastatic breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* **95**: 1209–1218.
- Sharan S.K., Morimatsu M., Albrecht U., Lim D.S., Regel E., Dinh C., Sands A., Eichele G., Hasty P., Bradley A. (1997): Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* **386**: 804–810.
- Sharma A., Gentry-Maharaj A., burn (2012): Assessing the malignant potential of ovarian inclusion cysts in postmenopausal women within the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a prospective cohort study. *BJOG* **119**: 207–219.
- Siegel R., Naishadham D., Jemal A. (2013): Cancer statistics, 2013. *CA. Cancer J. Clin.* **63**: 11–30.
- Sinčić N., Hecceg Z. (2011): DNA methylation and cancer: Ghosts and angels above the genes. *Curr. Opin. Oncol.* **23**: 69–76.
- Soleimani R., Heytens E., Darzynkiewicz Z., Oktay K. (2011): Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise. *Aging (Albany. NY).* **3**: 1–12.

- Sowter H.M., Ashworth A. (2005): BRCA1 and BRCA2 as ovarian cancer susceptibility genes. *Carcinogenesis* **26**: 1651–1656.
- Stresemann C., Brueckner B., Musch T., Stopper H., Lyko F. (2006): Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res.* **66**: 2794–2800.
- Tang Q., Cheng J., Cao X., Surowy H., Burwinkel B. (2016): Blood-based DNA methylation as biomarker for breast cancer: a systematic review. *Clin. Epigenetics* **8**: 1–18.
- Tang Z., Kang B., Li C., Chen T., Zhang Z. (2019): GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Res.* **47**: 556–560.
- Tsibulak I., Wieser V., Degasper C., Shivalingaiah G., Wenzel S., Sprung S., Lax S.F., Marth C., Fiegl H., Zeimet A.G. (2018): BRCA1 and BRCA2 mRNA-expression prove to be of clinical impact in ovarian cancer. *Br. J. Cancer* **119**: 683–692.
- Turner N., Tutt A., Ashworth A. (2004): Hallmarks of “BRCAness” in sporadic cancers. *Nat. Rev. Cancer* **4**: 814–819.
- Tutt A., Ashworth A. (2002): The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition. *Trends Mol. Med.* **8**: 571–576.
- Venkitaraman A.R. (2002): Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* **108**: 171–182.
- Venkitaraman A.R. (2009): Linking the cellular functions of BRCA genes to cancer pathogenesis and treatment. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **4**: 461–487.
- Wang Z., Zhang J., Zhang Y., Deng Q., Liang H. (2018): Expression and mutations of BRCA in breast cancer and ovarian cancer: Evidence from bioinformatics analyses. *Int. J. Mol. Med.* **42**: 3542–3550.
- Waterland R.A. (2006): Epigenetic mechanisms and gastrointestinal development. *J. Pediatr.* **149**: 137–142.
- Weisenberger D.J., Velicescu M., Cheng J.C., Gonzales F.A., Liang G., Jones P.A. (2004): Role of the DNA Methyltransferase Variant DNMT3b3 in DNA Methylation. *Mol. Cancer Res.* **2**: 62–72.
- Wermann H., Stoop H., Gillis A.J.M., Honecker F., Gulp R.J.H.L.M. Van, Ammerpohl O., Richter J., Oosterhuis J.W., Bokemeyer C., Looijenga L.H.J. (2010): Global DNA methylation in fetal human germ cells and germ cell tumours: Association with differentiation and cisplatin resistance. *J. Pathol.* **221**: 433–442.
- Williamson E.A., Dadmanesh F., Koeffler H.P. (2002): BRCA1 transactivates the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *Oncogene* **21**: 3199–3206.
- Wittwer C.T., Reed G.H., Gundry C.N., Vandersteen J.G., Pryor R.J. (2003): High-resolution

- genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin. Chem.* **49**: 853–860.
- Wojdacz T.K., Borgbo T., Hansen L.L. (2009): Primer design versus PCR bias in methylation independent PCR amplifications. *Epigenetics* **4**: 231–234.
- Wojdacz T.K., Dobrovic A. (2007): Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): A new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res.* **35**: 1–7.
- Wojdacz T.K., Dobrovic A., Hansen L.L. (2008): Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat. Protoc.* **3**: 1903–1908.
- Wong A.K.C., Pero R., Ormonde P.A., Tavtigian S. V., Bartel P.L. (1997): RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene *brca2*. *J. Biol. Chem.* **272**: 31941–31944.
- Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S M.J., Collins N, Gregory S, Gumbs C M.G. (1995): Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. *Nature* **378**: 789–781.
- Wooster R., Weber B.L. (2003): Breast and ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* **348(23)**: 2339–2347.
- Worm J., Aggerholm A., Guldberg P. (2001): In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve analysis. *Clin. Chem.* **47**: 1183–1189.
- Wu K., Jiang S.W., Thangaraju M., Wu G., Couch F.J. (2000): Induction of the *BRCA2* promoter by nuclear factor- κ B. *J. Biol. Chem.* **275**: 35548–35556.
- Yang H., Jeffrey P.D., Miller J., Kinnucan E., Sun Y., Thoma N.H., Zheng N., Chen P., Lee W. (2002): *BRCA2* Function in DNA Binding and Recombination from *BRCA2*-DSS1-ssDNA Structure. *Science*. **297**: 1837–1848.
- Yoshida K., Miki Y. (2004): Role of *BRCA1* and *BRCA2* as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.* **95**: 866–871.
- Zhang H., Tomblin G., Weber B.L. (1998): *BRCA1*, *BRCA2*, and DNA damage response: Collision or collusion? *Cell* **92**: 433–436.
- <https://genome.ucsc.edu> human assembly (Pristupljeno: 1.6.2021.)
- <http://gepia2.cancer-pku.cn/> (Pristupljeno: 16.6.2021.)

8. Životopis

Rođena sam u Sinju gdje sam pohađala osnovnu i srednju školu (Gimnazija Dinka Šimunovića). Godine 2015. upisala sam preddiplomski sveučilišni studij Biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i 2018. godine stekla akademski naziv sveučilišne prvostupnice biologije, obranivši završni rad „*Bakterije rezistentne na arsen*“, pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Hrenović. Godine 2018. upisala sam diplomski sveučilišni studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tijekom studija odradila sam tri laboratorijske prakse, jednu u Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, gdje sam naučila rukovati s laboratorijskim štakorima, zatim u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti “Dr. Fran Mihaljević”, gdje sam savladala molekularne metode u virologiji te na Institutu za vaskularnu biologiju i istraživanje tromboze u Centru za fiziologiju i farmakologiju na Medicinskom fakultetu u Beču, gdje sam ispitivala testove ukupne antioksidativne sposobnosti (engl. *Total Antioxidant Capacity*, TAC) i aktivnost endogene peroksidaze (engl. *Endogenous Peroxidase Activities*, EPA) u ljudskoj plazmi. Tijekom diplomskog studija položila sam Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama, A kategorija. Od 2015. do 2019. godine aktivno sam sudjelovala u provedbi popularno-znanstvene manifestacije „Noć biologije“, koja je dio veće manifestacije „Dan i noć na PMF-u“. Tijekom studiranja primala sam stipendiju grada Sinja koja se dodjeljuje studentima za uspješnost. 2017. godine primila sam STEM stipendiju koju dodjeljuje Ministarstvo znanosti i obrazovanja, a 2019. godine bila sam dobitnica stipendije CEEPUS (Srednjoeuropski program razmjene za sveučilišne studije) koju dodjeljuje Austrijska agencija za međunarodnu suradnju u području obrazovanja i istraživanja (OeAD-GmbH).