

Metilacija citozina u genima MGMT i RASSF1A u pacijenata s karcinomom testisa

Srbić, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:217:051072>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Marina Srbić

**Metilacija citozina u genima *MGMT* i *RASSF1A* u
pacijenata s karcinomom testisa**

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Neizmjernu zahvalnost dugujem svojoj mentorici, prof.dr.sc. Vlatki Zoldoš na ukazanom povjerenju, stručnom vodstvu i prilici da sudjelujem u ovom projektu. Uveli ste me u zanimljiv i intrigantan svijet epigenetike u koji sam se instantno zaljubila još na prvom satu Vašeg predavanja. Veliko hvala na strpljenju, srdačnosti, susretljivosti, trudu i vremenu utrošenom tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se Dori Markulin što je svoje praktično znanje u laboratoriju nesebično dijelila sa mnom, na svim objašnjenjima i pomoći u shvaćanju korištenih metoda, te uz koju sam stekla samostalnost i veliko iskustvo u radu u laboratoriju. Najiskrenije hvala na prijateljskom pristupu i velikom doprinosu pri izradi ovog rada.

Veliku zahvalnost dugujem tati Antunu i sestri Mariji, mojim vječnim uzorima koji su sve ovo vrijeme bili uz mene, prolazeći sa mnom sve uspone i padove, pružali bezuvjetnu ljubav i stalnu podršku. Hvala na snažnim razgovorima koji bi probudili ono ispravno u meni i uvijek me vraćali na pravi put.

Zahvaljujem se i Jeanu, ljubavi mog života, uz kojeg su moji snovi postali stvarnost. Hvala što si vjerovao u mene i onda kad ja nisam. Hvala na podršci i ljubavi.

Hvala svim prijateljima i poznanicima na sretnim i bezbrižnim trenucima uz koje je vrijeme studenskih dana proletjelo.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Marina Srbić

Metilacija citozina u genima *MGMT* i *RASSF1A* u pacijenata s karcinomom testisa

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Karcinom testisa (TC) predstavlja oko 1% svih novodijagnosticiranih zloćudnih tumora muške populacije. Smatra se da nastaje iz primordijalnih zametnih stanica u ranom embrionalnom razvoju kada se roditeljski obrasci metilacije DNA brišu, te se uspostavlja totipotencija stanica. Diferencijacijom podskupina TC-a postupno se povećava stupanj DNA metilacije zbog uspostavljanja metilacijskog obrasca. Cilj ovog istraživanja je bila analiza DNA metilacije unutar CpG otoka gena *MGMT* i *RASSF1A* iz periferne krvi pacijenata s karcinomom testisa i zdravih ljudi. U tu svrhu je korištena metoda pirosekvenciranja bisulfitno konvertirane DNA za analizu stupnja metilacije svakog pojedinog CpG dinukleotida unutar fragmenata gena *MGMT* i *RASSF1A*. Rezultati ne pokazuju statistički značajnu promjenu u CpG metilaciji gena *MGMT* između pacijenata i zdravih osoba. Međutim, CpG metilacija u analiziranim fragmentima unutar gena *RASSF1A* je statistički značajno promijenjena u pacijenata u odnosu na zdrave osobe, te ukazuje na potencijal CpG metilacije ovog gena analizirane u perifernoj krvi, kao dijagnostičkog biljega.

(51 stranica, 11 slika, 4 tablice, 123 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: karcinom testisa, metilacija DNA, CpG otok, gen *MGMT*, gen *RASSF1A*, molekularni biljeg iz krvi

Voditelj: Izv. prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

Doc. dr. sc. Sandra Radić Brkanac

Doc. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Rad prihvaćen: 3. Ožujak 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

Marina Srbić

Cytosine methylation in *MGMT* and *RASSF1A* genes in patients with testicular carcinoma

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Testicular cancer (TC) represents about 1% of all new diagnosed malignant cancer in male population. TC are believed to arise from primordial germ cells in early embryonal development when DNA methylation and parental imprints are erased and totipotency is restored. With differentiation of subgroups of TC the level of DNA methylation gradually increases. The main goal of this experiment was to analyse methylation level inside CpG islands of the *MGMT* and *RASSF1A* genes in blood samples of patients with testicular cancer and healthy individuals. For this purpose, methylation status was determined for each CpG sites of bisulfite converted DNA using pyrosequencing method. The results are not showing statistically significant change in CpG methylation within the analysed fragments of *MGMT* gene in patients with testicular cancer compared to healthy individuals. However, for *RASSF1A* the results show statistically significant change in CpG methylation analysed in patients with testicular cancer compared with healthy individuals, thus revealing the potential of this gene as a methylation biomarker in peripheral blood.

(51 pages, 11 figures, 4 tables, 123 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: testicular cancer, DNA methylation, CpG island, *MGMT*, *RASSF1A*, blood biomarker

Supervisor: PhD Vlatka Zoldoš, Associate professor

Reviewers: PhD Vlatka Zoldoš, Associate professor

PhD Sandra Radić Brkanac, Assistant professor

PhD Martina Šeruga Musić, Assistant professor

Thesis accepted: 3rd March 2016

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Karcinom testisa	2
1.1.1. Etiologija i čimbenici rizika karcinoma testisa.....	4
1.1.2. (Cito)genetika razvoja karcinoma testisa	5
1.1.3. Epigenetika razvoja karcinoma testisa	6
1.2. Epigenetički mehanizmi	8
1.2.1. Uloga metilacije DNA.....	9
1.2.1.1. Promjena metilacije DNA u karcinogenezi	11
1.2.1.2. Metilacija DNA kao molekularni biljeg	12
1.3. Geni <i>MGMT</i> i <i>RASSF1A</i>	12
1.4. Cilj istraživanja.....	14
2. MATERIJALI I METODE.....	15
2.1. Materijali	16
2.1.1. Uzorci DNA	16
2.2. Metode.....	16
2.2.1. Dizajniranje početnica za PCR i pirosekvenciranje.....	16
2.2.2. Bisulfitna konverzija DNA.....	18
2.2.3. Umnažanje fragmenata gena <i>MGMT</i> i <i>RASSF1A</i>	19
2.2.4. Pirosekvenciranje	21
2.2.5. Statistička obrada podataka	24
3. REZULTATI.....	25
3.1. Provjera kvalitete PCR reakcije gel elektroforezom	26
3.2. Analiza pirograma nakon pirosekvenciranja	28
3.3. Promjena stupnja CpG metilacije gena <i>MGMT</i> i <i>RASSF1A</i> u pacijenata s karcinomom testisa	30
4. RASPRAVA.....	35
5. ZAKLJUČAK	40
6. LITERATURA.....	42
7. ŽIVOTOPIS	50

1.UVOD

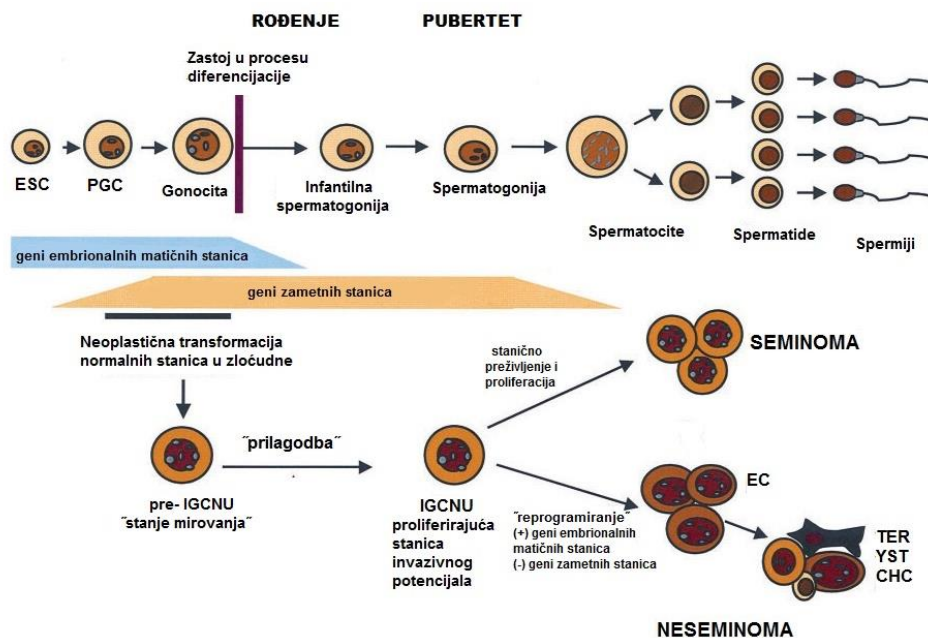
1.1. Karcinom testisa

Karcinom testisa (engl. *Testicular cancer*, TC) predstavlja oko 1% svih novodijagnosticiranih zloćudnih tumora muške populacije. Unatoč tome TC je najčešće dijagnosticirani tumor u muškaraca mlađe dobne skupine (između 15 - 40 godina) (1). Upravo se u tome krije njegova zloćudnost jer pogađa muškarce u najreproduktivnijim godinama života. Karcinom testisa označava heterogenu skupinu neoplazija koja primarno nastaje u testisima (sjemenicima) ili muškim gonadama, te se uobičajeno očituje kao bezbolno otvrdnuće dijela ili cijelog testisa, te rijeđe kao bolna otekline (2).

U zadnjih nekoliko desetljeća u zapadnim zemljama svijeta je povećana učestalost pojave karcinoma testisa u muškaraca (3). Incidencija oboljelih od karcinoma testisa značajno varira u određenim geografskim područjima, te prema dobno standardiziranim stopama naviša je u sjevernoj i zapadnoj Europi ($>9/100000$) i najmanja u Africi i Aziji ($<1/100000$). Najveći porast stope incidencije 2008.godine je zabilježen u Norveškoj (9.9/100000), Danskoj (9.4/100000), Švicarskoj (9.2/100000) i Sloveniji (8.5/100000) (4). Uočena je povezanost rizika od karcinoma testisa s rasom i etničkom pripadnošću kod Amerikanaca bijele rase s pet puta većom incidencijom oboljevanja od TC-a za razliku od Afroamerikanaca (5). Nadalje, u svijetu 2008. godine zabilježeno je preko 52 000 slučajeva novooboljelih i oko 10 000 umrlih od karcinoma testisa (6). Le Cornet i sur. (7) procjenjuju kontinuirano povećanje incidencije TC-a do 25% do 2025. godine diljem Europe, pa tako i u Hrvatskoj. Unatoč povećanom trendu incidencije karcinoma testisa, ohrabruju podaci mortaliteta koji ukazuju na kontinuirani pad smrtnosti u većini država Europe (8) zahvaljujući izrazitoj osjetljivosti zloćudnih stanica testisa na kemoterapiju temeljenu na platini (cisplatin). Izlječivost od karcinoma testisa je danas vrlo visoka i seže čak do 95%, dok je prije svega pedesetak godina to bio postotak njegove smrtnosti (9).

Usprkos velikom broju znanstvenih istraživanjima do danas nisu razjašnjeni svi elementi neoplastične transformacije stanica testisa te u otkrivanju istih značajno komplicira njegova izrazita heterogenost. Pojednostavljeno, patohistološka klasifikacija karcinoma testisa razlikuje skupinu karcinoma stanica spermatogenetske loze (engl. *Testicular germ cell tumours*, TGCT) koja čini i do 95% ukupnog karcinoma testisa, dok ostatak pripada skupini stromalnih tumora. Budući da s iznimnim postotkom unutar karcinoma testisa prevladava TGCT, upravo je zbog toga najčešće istraživana skupina karcinoma testisa. Skupinu TGCT-a

karakterizira izrazita pluripotentnost, te se pojedine podskupine TGCT-a histološki, klinički i epidemiološki međusobno razlikuju (10). Najčešća podjela TGCT-a je na dvije glavne podskupine, seminoma i ne seminoma. Smatra se da obje podskupine (osim spermatocitnog seminoma) prethodi lezija, posljedica tumorigeničnih događaja in utero, nazvana neklasificirana intratubularna neoplazija zametnih stanica (engl. *Intratubular germ-cell neoplasia, unclassified type*, IGCNU; alias *carcinoma in situ*). Pretpostavlja se da stanice IGCNU-a potječu od spolnih prastanica ili primordijalnih zametnih stanica (engl. *Primordial germ cells*, PGC), odnosno gonocita tijekom ranog embrionalnog razvoja te da miruju sve do puberteta kada uslijed hormonalnih promijena počinju nekontrolirano proliferirati i ostvarivati invazivni potencijal (11–15). Daljnom malignom transformacijom IGCNU-a unutar sjemenih kanalića (engl. *Seminiferous tubules*) testisa, mogu se razviti stanice seminoma ili ne seminoma ili u 15% slučajeva kombinacija stanica tih dviju podskupina (16) (Slika 1.). Prema podacima dobivenim visokoprotočnom analizom ekspresije gena uočena je sličnost seminoma s linijom zametnih stanica, te ne seminoma s linijom embrionalnih matičnih stanica (engl. *Embryonal stem cells*, ES cells) (17). Seminomi su građeni od monomorfnih, nediferenciranih nakupina stanica koje građom i imunohistokemijskim obilježjima nalikuju stanicama IGCNU-a. Za razliku od seminoma, ne seminomi su građeni od mnogih staničnih



Slika 1. Ilustrirani prikaz patogeneze TGCT-a. ESC, embrionalna matična stanica; PGC, primordijalna zametna stanica; IGCNU, neklasificirana intratubularna neoplazija zametnih stanica; EC, embrionalni karcinom; TER, teratom; YST, tumor žumanjčane vreće; CHC, koriokarcinom. Slika preuzeta i prilagođena iz rada Rajpert-De Meyts (18).

tipova koji se međusobno razlikuju prema stupnju diferenciranosti (2,18,19). Od izrazito nediferenciranih stanica totipotentnog karaktera je građen embrionalni karcinom (engl. *Embryonal carcinoma*, EC). Za stanice embrionalnog karcinoma se smatra da su maligna varijanta embrioblasta, tj. unutarnje mase stanica (engl. *Inner cell mass*, ICM) iz blastociste (20), jer imaju sposobnost diferencijacije u izvanembrionalno tkivo, odnosno u tumor žumanjčane vreće (engl. *Yolk sac tumor*, YST) i koriokarcinom (engl. *Choriocarcinoma*, CC), te u embrionalno tkivo, teratom koji je građen od somatskih stanica i predstavlja neorganiziranu mješavinu stanica svih triju zametnih listića (ektoderma, mezoderma i endoderma) (17,21–23).

1.1.1. Etiologija i čimbenici rizika karcinoma testisa

Etiopatogeneza razvoja karcinoma testisa još uvijek je nedovoljno razjašnjena, te predstavlja predmet mnogih rasprava među znanstvenicima. Pravi uzrok nastanka TC-a do danas nije jasno definiran, premda mnoge studije ukazuju da je za razvoj odgovorno međudjelovanje više čimbenika. Važnu ulogu u tome igraju endokrini, genetički i okolišni čimbenici, te prema novijim saznanjima ulogu u njegovu nastanku mogu imati i epigenetički mehanizmi, osobito metilacija DNA (18,24,25). Danas se uglavnom prihvaća hipoteza da prilikom razvoja TC-a dolazi do zastoja u procesu diferencijacije i sazrijevanja zametnih stanica zbog pojave abnormalne gonocite koja je izgubila mogućnost diferencijacije u zrele muške spolne stanice (spermije), te iz koje nastaje IGCNU stanica. Budući da je spermatogeneza strogo kontrolirana i ovisna o signalima iz staničnog mikrokoliša, svaka promjena potencijalno može narušiti homeostazu stanica i strome i potaknuti rast tumora. Prema tome, hormonalna neravnoteža uslijed poremećene funkcije Sertolijevih i Leydigovih stanica bi mogla imati ključnu ulogu u tome (26,27). Industrijskim i ukupnim djelovanjem čovjeka u okolišu nastaje sve više kemijskih spojeva kojima smo svakodnevno izloženi. Među mnogim spojevima ističu se endokrini disruptori koji mogu izravno djelovati na hormonske receptore imitirajući hormone i mjenjajući funkciju endokrinog sustava. Zabilježeni su potencijalno štetni učinci izlaganju endokrinih disruptora u prenatalnom i neonatalnom razdoblju na muški reproduktivni sustav kod kriptorhizma, hipospadije i neplodnosti (28). Smatra se da bi i kod TC-a endokrini disruptori imali sličan negativan učinak, no zbog kompleksnosti provođenja istraživanja kod TC-a je povezanost pronađena s izloženosti

pesticidima (29), te izloženosti majke povišenim koncentracijama estrogena i njegovog analoga dietilstilbestrola za vrijeme trudnoće (30,31). Također, u prilog važnoj ulozi okolišnih čimbenika u povećanju incidencije TC-a idu i podaci migracijskih studija (32–34). Kao glavni čimbenici rizika za razvoj TC-a navode se kriptorhizam zajedno s ostalim poremećajima sindroma testikularne disgeneze (TDS), zatim pozitivna obiteljska anamneza, prethodna dijagnoza TC-a, mala porođajna masa i rani pubertet (35–38). Među njima ističe se kriptorhizam kao najbolje istražen rizični faktor. Muškarci s poremećajem nespuštanja testisa u skrotum imaju 4.8 puta veću vjerojatnost oboljenja od TC-a (39). Međutim, navedeni čimbenici rizika nisu od presudnog značaja jer istraživanja ne dokazuju uzročnu povezanost s kancerogenezom (18).

1.1.2. (Cito)genetika razvoja karcinoma testisa

Kao i većinu tumorskih stanica i stanice TGCT-a karakterizira genomska, odnosno kromosomska nestabilnost. Kod njih je uočena značajna varijabilost kariotipa zbog promjene u broju ili strukturi kromosoma uzrokovane delecijom ili duplikacijom određenih regija kromosoma. Drugim riječima za TGCT je karakteristična aneuploidija, ali i poliploidija (stanice IGCNU-a i seminoma većinom imaju hipertriploidne, dok neseminoma hipotriploidne genome) (40,41). Među brojnim kromosomskim aberacijama analiziranim metodom komparativne genomske hibridizacije ističe se izokromosom 12, i(12p). Uz i(12p) uočena je i uzastopna duplikacija (amplifikacija) 12p kromosomske regije u gotovo svim histološkim skupinama TGCT-a (40) koja rezultira pojačanom ekspresijom gena *CCND2* (42) i *KRAS2* (43) uključenih u staničnu proliferaciju i preživljenje, te gena matičnosti *NANOG* i *STELLA* (44). Iako su se u početku aberacije kromosoma 12 smatrale ranim događajem u kancerogenezi TGCT-a, detaljnim citogenetičkim analizama na mikrodisektiranim pre-IGCNU stanicama nisu pronađene, stoga dobitak regije 12p ne povezujemo s ranim stadijem TGCT-a nego s njegovom progresijom u invazivne stadije seminoma i neseminoma (18,45). Za konstitutivnu aktivaciju RAS proteina dodatno su potrebne mutacije gena *KRAS2* i njegovog homologa *NRAS* (46), što za posljedicu ima poremećenu regulaciju onkogenog RAS signalnog puta i njegovih nizvodnih efektoru poput RASSF1A koji zajedno pridonose kancerogenezi TGCT-a. Detektirana je također i niska frekvencija mutacija u genu *MGMT* lociranom na kromosomu 10q26 (47). Brojne epidemiološke studije ukazuju na genetičku

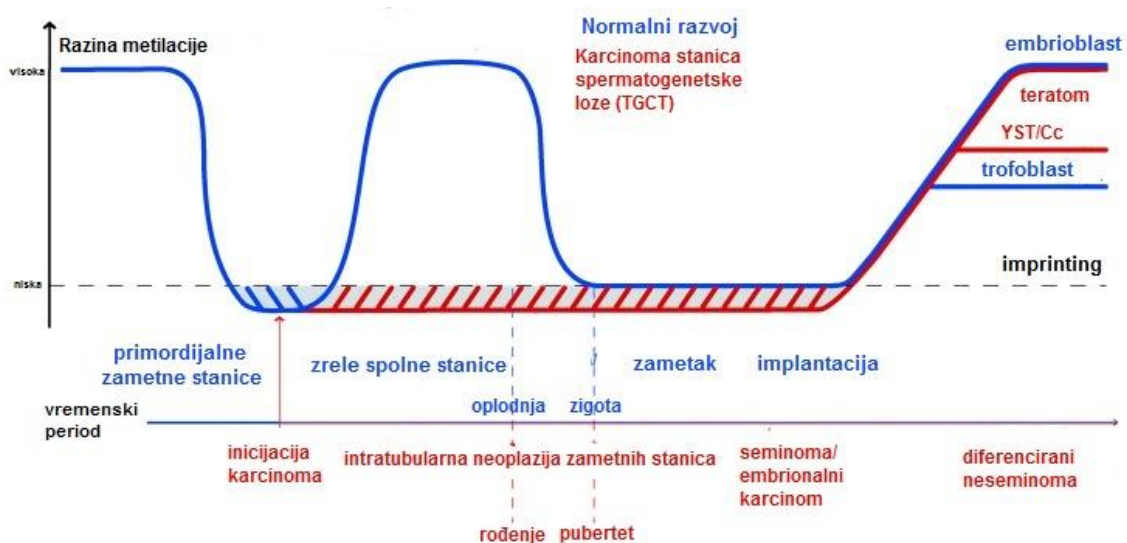
predispoziciju za oboljevanje od TC-a (48), međutim cjelogenomske analize povezanosti (engl. *Genome-wide linkage analysis*, GWLA) nisu uspjele pronaći značajnu povezanost s određenim genima, te se smatra da u nasljeđivanju sudjeluju brojni genski lokusi (49). Nadalje, cjelogenomske asocijacijske studije (engl. *Genome-wide association study*, GWAS) povezale su polimorfizme jednog nukleotida (engl. *Single nucleotide polymorphisms*, SNP) s povećanim rizikom od TGCT-a, od kojih najveći rizik predstavljaju polimorfizmi u genu *KITLG* lociranom na 12q22. Proteinski produkt tog gena uključen je u KITLG-KIT signalni put značajan za razvoj primordijalnih zametnih stanica, njihovoj migraciji u gametogenezi i preživljenju (50,51).

1.1.3. Epigenetika razvoja karcinoma testisa

Tijekom embrionalnog razvoja spolne stanice zahvaća drastična reorganizacija epigenoma, odnosno epigenetičkih modifikacija na razini genoma. Reprogramiraju se obrasci metilacije DNA i histonskih modifikacija, u dva vremenski odvojena perioda (i) u gametogenezi i (ii) preimplantacijskom embriju. Prvi dio se odnosi na populaciju primordijalnih zametnih stanica ili spolnih prastanica nastalu iz epiblasta (vanjskog sloja embrioblasta), koja migrira u spolne nabore, odnosno osnove budućih gonada. Tijekom tog razdoblja spolne prastanice doživljavaju snažan demetilacijski val koji rezultira izrazitom globalnom hipometilacijom. Tim procesom brišu se roditeljski obrasci metilacije DNA i uspostavlja se totipotentnost stanica (52). Poznato je da je epigenom stanica u periodu epigenetičkog reprogramiranja izrazito osjetljiv na djelovanje okolišnih čimbenika i podložan promjenama. Prema tome, izlaganje štetnim okolišnim čimbenicima u tom kritičnom periodu može imati za posljedicu abnormalnu promjenu epigenoma linije zametnih stanica. Također, iako je cijeli proces strogo kontroliran, pojedine regije u genomu uspjevaju izbjeći epigenetičko reprogramiranje te posljedično tome prenijeti epigenetičku informaciju na sljedeće generacije potomaka, što podrazumijeva transgeneracijsko epigenetičko nasljeđivanje. Sukladno principu epigenetičkog nasljeđivanja izravno djelovanje štetnih okolišnih čimbenika u tom kritičnom periodu može rezultirati trajnom promjenom epigenetičke informacije koja se kao takva nasljeđuje i čini podlogu za razvoj bolesti (53,54).

Sve više istraživanja ukazuje na važnu ulogu metilacije DNA u razvoju TGCT-a. Smatra se da TGCT nastaje iz primordijalnih zametnih stanica u trenutku kada je njihov

genom izrazito hipometiliran (Slika 2.), te kao takav podložan nakupljanju epimutacija i mutacija tijekom staničnih dioba koje za posljedicu mogu imati malignu transformaciju stanica u IGCNU (9,21,55–58). Budući da TGCT ne pokazuje nasljeđivanje klasičnim Mendelovim zakonima, transgeneracijsko epigenetičko nasljeđivanje bi potencijalno moglo objasniti genetičku predispoziciju TGCT-a (55). Pojedine histopatološke podskupine TGCT-a se unatoč podrijetlu od iste IGCNU stanice, te sličnim genskim promjenama morfološki veoma razlikuju. Smatra se da su tome najviše zaslužni drugačiji obrasci metilacije pojedinih poskupina TGCT-a. Cjelogenomskom studijom metilacije DNA (engl. *Genome – wide DNA methylation study*) korištenjem metode RLGS (engl. *Restriction landmark genome scanning*, RLGS) primjećena je razlika u metilacijskom obrascu pojedinih podskupina TGCT-a. Diferencijacijom TGCT-a razina metilacije se postupno povećava zbog uspostavljanja metilacijskog obrasca. Za podskupinu seminoma i IGCNU stanice je karakteristična izrazito niska razina globalne metilacije DNA i CpG otoka, dok obrasci metilacije kod podskupine neseminoma variraju od embrionalnog karcinoma koji pokazuje nisku razinu metilacije sve do teratoma s visokom razinom metilacije DNA (58,59) (Slika 2.). Tome u prilog idu rezultati istraživanja Almstrup i suradnika koji ukazuju na pretjeranu ekspresiju *de novo* DNA



Slika 2. Ciklus epigenetičkog reprogramiranja u normalnom embrionalnom razvoju sisavaca i u karcinomu stanica spermatogenetske loze (TGCT). Tijekom normalnog embrionalnog razvoja (plava linija) stanice zametne linije doživljavaju dva snažna vala demetilacije genoma popraćena *de novo* metilacijom DNA zbog uspostavljanja metilacijskog obrasca. U gametogenezi se reprogramiraju roditeljski obrasci metilacije DNA, dok u preimplantacijskom embriju reprogramiranje izostaje kod utisnutih gena i ponavljajućih slijedova DNA. Nakon implantacije, stanice embrioblasta razlikuju se od stanica trofoblasta po većoj razini metilacije DNA. Smatra se da TGCT nastaje od primordijalnih zametnih stanica u trenutku kada je genom izrazito hipometiliran (crvena linija). Isprekidana linija predstavlja gubitak genomskog utiska (engl. *Loss of genomic imprinting*) u TGCT-u. Razina metilacije DNA se povećava kako stanice TGCT-a diferenciraju, od seminoma s najnižom razinom metilacije do teratoma s najvišom. Tumor žumanjčane vreće, YST; korikarcinoma, Cc. Slika je preuzeta i prilagođena iz rada Lind i sur. (58).

metiltransferaza zaslužnih za uspostavu globalne metilacije genoma (DNMT3B i DNMT3L) u neseminoma, za razliku od seminoma i IGCNU (60). Istraživanja su ukazala i na promjene metilacije DNA u TGCT-u i to hipermetiliranost gena *BRCA1*, *RASSF1A*, *MGMT* i *HIC1* (58). Nadalje, otkrivena je i hipermetilacija gena povezanih s tkivom testisa poput gena *SCGB3A1* koji kodira za sekretoglobin i *PRSS21* koji kodira za testisin (61,62). Nedavna istraživanja su ukazala i na gubitak funkcije malih nekodirajućih RNA, piRNA utišavanjem hipermetilacijom cijele obitelji proteina PIWI, te je na taj način inhibiran PIWI/piRNA putu važan u utišavanju mobilnih elemenata u spermatogenezi i održavanju genomske stabilnosti (63). Također u prilog utišavanju gena hipermetilacijom CpG otoka idu i istraživanja gdje na taj način dolazi do utišavanja transkripcijskih faktora pluripotentnosti Nanog i OCT3/4 (24,64).

1.2. Epigenetički mehanizmi

Središnja dogma molekularne biologije zasniva se na pretpostavci da je u primarnom slijedu nukleotida molekule DNA pohranjena temeljna genetička informacija koja podrazumijeva prepisivanje slijeda nukleotida u molekulu RNA (transkripcija) i prevođenje u aminokiselinski slijed (translacija) (65). Međutim, osim genetičkog koda u genomu čovjeka postoji i epigenetički kod koji značajno proširuje informacijski potencijal genetičkog koda regulirajući gensku ekspresiju u svakoj stanici, te unatoč istim molekulama DNA u svim stanicama nekog organizma, obrasci ekspresije gena razlikuju se u različitim staničnim tipovima. U svakom staničnom tipu eksprimirani su određeni, tkivno – specifični geni. Prema tome, razvoj složenih organizama s različitim staničnim tipovima, tkivima i organima zahtjeva staničnu diferencijaju. Glavnu ulogu u tome imaju epigenetičke modifikacije koje se opisuju kao nasljedne, reverzibilne promjene genske ekspresije i strukture kromatina bez izmjena u sekvenci molekule DNA. Epigenetičke modifikacije, odnosno mehanizmi njihova djelovanja uključuju metilaciju DNA, kovalentne modifikacije histona, uvođenje histonskih varijanti, djelovanje malih nekodirajućih RNA molekula, remodeliranje kromatina, te poziciju određene sekvence unutar interfazne jezgre (66,67). Navedeni mehanizmi međusobno intenzivno interagiraju i čine jedinstven epigenetički sustav kojim se ostvaruje zajedničko precizno reguliranje aktivnosti pojedinih gena ovisno o stadiju razvoja i staničnom tipu, te u svakoj stanici čine jedinstven epigenetički uzorak koji se prenosi tijekom stanične diobe, ali i

na sljedeće generacije (transgeneracijski). Epigenetičke modifikacije se smatraju glavnim mehanizmom kojim egzogeni i endogeni, te okolišni čimbenici utječu na gensku ekspresiju, te na taj način mogu pridonijeti nastanku različitih bolesti (68,69).

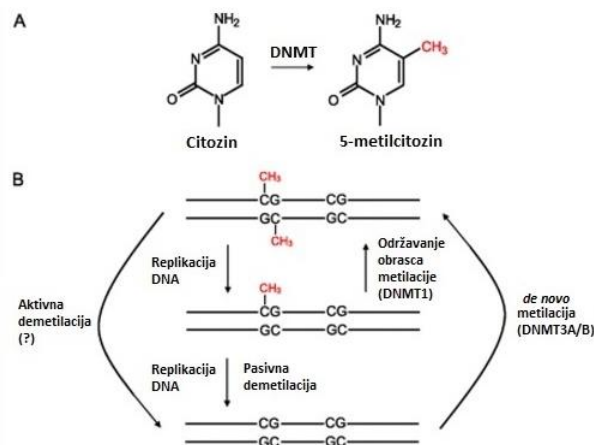
1.2.1. Uloga metilacije DNA

Metilacija DNA je jedna od najvažnijih i najistraženijih epigenetičkih mehanizama. Predstavlja stabilne, nasljedne epigenetičke oznake važne u represiji transkripcije. Promjene metilacije DNA pokreću reorganizaciju strukture kromatina posljedično mijenjajući gensku ekspresiju, ali i stabilnost kromatina. Uključena je u regulaciju brojnih staničnih procesa poput inaktivacije X kromosoma, uspostavi genomskog utiska (engl. *Genomic imprinting*), staničnoj diferencijaciji, očuvanju stabilnosti kromosoma, embriogenezi, gametogenezi, utišavanju mobilnih i retroviralnih elemenata, te razvoju mnogih bolesti (70–73). U genomu sisavaca se većinom metilira citozin kojem prethodi gvanin unutar citozin-gvanin dinukleotida (CpG, gdje p označava fosfodietersku vezu između citozina i gvanina). U samom procesu metilacije citozina sudjeluju enzimi DNA metiltransferaze (DNMT) koji premještaju metilnu skupinu (CH₃) sa S-adenozilmetionina na peti ugljikov atom nukleotida citozina tvoreći 5-metilcitozin (68,74) (Slika 3.A). U genomu čovjeka 70 – 80% CpG dinukleotida je metilirano (75). Učestalost CpG dinukleotida nije jednolika unutar genoma. Područja bogata CpG dinukleotidima pojavljuju se pretežito u ponavljajućim sekvencama DNA, primjerice centromernim ponavljanjima i retrotranspozonomima. CpG dinukleotidi u tim područjima su izrazito metilirani (hipermetilirani su), te je time osigurana stabilnost genoma (76). Postoje područja gdje su CpG dinukleotidi gusto raspoređeni i nazivaju se CpG otocima. Zauzimaju 0,7% humanog genoma i prostiru se u promotorskoj regiji 60% gena (77). CpG otoci obično nisu metilirani (hipometilirani su), te je time omogućena normalna ekspresija gena (76). Iznimka su CpG otoci utišnutih gena (engl. *Imprinted genes*) i gena na inaktivnom X kromosomu koji se tijekom razvoja metiliraju, te im je ekspresija utišana (71). Smatra se da metilacija DNA inhibira transkripciju gena na način da dodana metilna skupina ometa vezanje transkripcijskih faktora (78) i omogućava vezanje proteina koji imaju afinitet za metiliranu DNA tzv. MBD proteina (engl. *Methyl binding proteins*) poput MeCP2 proteina, koji se veže za metilirane citozine i regrutira histon deacetilaze (HDAC) zajedno s ostalim histon modificirajućim proteinima koji dodatno inhibiraju transkripciju održavajući represivno stanje

promotora (71,79,80). Istraživanja sve više ukazuju i na značajnu ulogu metilacije DNA u regulaciji ekspresije promotora gena koji ne sadrže CpG otok (77,81).

Enzimi odgovorni za metilaciju DNA su DNA metiltransferaze (DNMT) (Slika 3.B). DNMT reguliraju metilaciju DNA istovremeno osiguravajući epigenetičko nasljeđivanje metilacijskih obrazaca DNA i dinamičke izmjene obrazaca sukladno staničnim potrebama. Dijele se na dvije skupine (i) DNMT održavateljskog tipa (DNMT1) i (ii) *de novo* DNMT (DNMT3A i DNMT3B). DNMT1 pokazuje afinitet prema hemimetiliranoj DNA, odnosno molekuli DNA sa samo jednim metiliranim lancem koja nastaje tijekom replikacije DNA. DNMT1 katalizira prijenos metilne skupine kopiranjem metilacijskog obrasca lanca kalupa na novosintetizirani lanac čime se osigurava prijenos obrasca metilacije DNA na stanice kćeri. Prema tome DNMT1 je odgovorna za održavanje obrasca metilacije prilikom svake stanične diobe. Uspostavu obrasca metilacije, odnosno *de novo* metilaciju kataliziraju DNMT3A i DNMT3B koje pokazuju afinitet prema nemetiliranoj i hemimetiliranoj DNA. Smatra se da imaju ulogu i u obnavljanju metilacije već uspostavljenog obrasca metilacije nastalog pogreškama DNMT1. Ova skupina DNA metiltransferaza je eksprimirana tijekom embrionalnog razvoja, što odgovara periodu reprogramiranja metilacije DNA, dok u odraslim stanicama njezina funkcija nije u potpunosti istražena. U liniji zametnih stanica eksprimira se i DNMT3L koja nema katalitičku aktivnost, ali interakcijom s DNMT3A/B potiče proces *de novo* metilacije (67,74,82–85).

Demetilacija DNA može biti ostvarena pasivnim gubitkom metilne skupine u stanicama koje se intenzivno dijele uslijed smanjene aktivnosti DNMT1 ili gubitkom njezine funkcije. Uz pasivnu, u stanici se provodi i aktivna demetilacija koja nije ovisna o replikaciji (Slika 3.B). Do danas nisu precizno definirani mehanizmi aktivne demetilacije DNA ali je predloženo nekoliko modela od koji se najviše ističe model demetilacije djelovanjem enzima TET1 (engl. *Ten – eleven translocation 1*). TET1 oksidira 5-metilcitozin u 5-hidroksimetilcitozin, nakon čega može slijediti konverzija 5-hidroksimetilcitozina u nemetilirani citozin popravkom izrezivanja baza s pomoću timin DNA glikozidaze (TDG). Do aktivne i pasivne demetilacije dolazi prilikom metilacijskog reprogramiranja za vrijeme ranog embrionalnog razvoja. Aktivna demetilacija zahvaća očev genom unutar oplodene jajne stanice, te nakon nekoliko dioba zigote dolazi do pasivne demetilacije majčinog genoma koja osim majčinog prelazi i na očev genom (52,86,87).



Slika 3. Prikaz mehanizama uključenih u metilaciju i demetilaciju DNA u sisavaca. A) DNA metiltransferaza (DNMT) katalizira kovalentni dodatak metilne skupine na peti atom ugljika tvoreći 5-metilcitozin. B) Prikaz procesa stvaranja i održavanja metilacijskih obrasa pomoću DNMT3A/B i DNMT1, te pasivne i aktivne demetilacije. Slika je preuzeta i prilagođena iz rada Chen i Riggs (86).

1.2.1.1. Promjena metilacije DNA u karcinogenezi

Dosadašnje studije istaknule su važnost epigenetičkih mehanizama u normalnom razvoju organizama, ali i u razvoju različitih bolesti, uključujući zloćudne tumore. Epigenom zdravih stanica je podložan abnormalnim promjenama, te zajedno s genetičkim mutacijama sudjeluje u inicijaciji i progresiji maligne transformacije stanica, odnosno kancerogenezi (88). Metilacija DNA kao važan epigenetički mehanizam je također podložna promjenama u kancerogenezi, te abnormalnosti u metilaciji DNA su vrlo čest događaj u tumorskim stanicama. Za razliku od zdravih stanica, za tumorske stanice je karakteristična hipermetilacija CpG otoka u promotorskim regijama gena i globalna hipometilacija ostalih područja genoma (73). Globalna hipometilacija zahvaća ponavljajuće sljedove DNA uključujući mobilne elemente i sljedove bitne za strukturu kromosoma, introne, te promotore siromašne CpG dinukleotidima koji su u zdravim stanicama hipermetilirani, odnosno ekspresija im je utišana. Posljedica globalne hipometilacije može biti nestabilnost genoma i aktivacija onkogeno uslijed kromosomskih rearanžmana i premještanja mobilnih elemenata po genomu. Hipermetilacija CpG otoka promotorskih regija gena za posljedicu može imati utišavanje ekspresije tumor supresor gena. Tumor supresor geni imaju važnu ulogu u regulaciji brojnih staničnih procesa poput stanične smrti, popravka DNA, regulaciji staničnog ciklusa, te inaktivacija njihove funkcije pridonosi kancerogenezi. U skladu s Knudsonovom hipotezom dvostrukog udarca (engl. *Knudson's two hit hypothesis*) hipermetilacijom se tumor

supresor geni mogu direktno utišati (utišavanje oba alela) ili indirektno u kombinaciji s genskim mutacijama, gdje hipermetilacija osigurava utišavanje drugog alela potrebnog za inicijaciju kancerogeneze (88,89). U nekim tumorima hipermetilacija CpG otoka promotorskih regija predstavlja rani događaj na putu maligne transformacije stanica (73).

1.2.1.2. Metilacija DNA kao molekularni biljeg

Promjene metilacije DNA su često rani događaj u kancerogenezi i zbog toga predstavljaju potencijalno dobre molekularne biljege za rano otkrivanje bolesti. Molekularni biljezi predstavljaju biološke molekule u tkivima ili tjelesnim tekućinama koje se mogu kvantitativno mjeriti i služiti kao indikatori normalnih bioloških ili patoloških procesa, te odgovora organizma na terapiju. U području istraživanja karcinoma kao uzorak za analizu metilacije DNA najbolje bi bilo koristiti tumorsko tkivo, koje se međutim može dobiti samo invazivnim metodama (npr. biopsija) te stoga nije praktično, a često niti operativno primjenjivo. Neinvazivne metode bi olakšale dijagnostiku i prognostiku bolesti pa se stoga kao uzorak najčešće koriste tjelesne tekućine kao što su urin, bronhijalna sluz, majčino mlijeko, slina, serum i plasma, te periferna krv. Biokemijski, DNA molekula je stabilnija od drugih bioloških molekula (RNA molekula i protein), te iz tog razloga je analiza metilacije DNA iz uzoraka tjelesnih tekućina moguća i lako dostupna (90,91). Analiza metilacije DNA iz krvi može se podijeliti na (i) slobodnu DNA otpuštenu iz cirkulirajućih stanica, npr. tumorskih stanica u serumu ili plazmi i na (ii) DNA izoliranu iz leukocita ili stanica pune periferne krvi. Slobodna DNA iz plazme ili seruma postoji u vrlo malim količinama i iako može biti oslobođena iz tumorskih stanica isto tako može i iz normalnih zdravih stanica, te je time smanjena specifičnost. Suprotno tome, količina i kvaliteta DNA izolirane iz pune periferne krvi ne predstavlja problem, no upitna je usporedivost stupnja metilacije DNA iz krvi i tumorskog tkiva jer je obrazac metilacije tkivno specifičan (91).

1.3. Geni *MGMT* i *RASSF1A*

Gen *MGMT* zauzima 300 kb kromosomskog područja smještenog na duljem kraku kromosoma 10 (10q26). Ima promotor bez veznih mjesta za transkripcijske faktore kao što su

TATA-box i CAAT-box, koji je bogat GC parovima baza, te unutar kojeg se prostire CpG otok. Gen sadrži i nekoliko veznih mjesta za transkripcijske faktore poput Sp1, AP-1, AP-2, te elemente za odgovor na glukokortikoide (engl. *Glucocorticoid – responsive elements*). Sekvenca DNA i funkcija proteinskog produkta gena *MGMT* je očuvana od prokariota do sisavaca. Gen je eksprimiran u svim normalnim stanicama i tkivima čovjeka (92,93). Kodira za O₆ – metilgvanin DNA metiltransferazu, enzim koji direktno sudjeluje u popravku DNA. Učinkovito popravlja oštećenja nastala djelovanjem alkilirajućih agensa prenošenjem metilnih skupina s O₆ – gvanina na sebe čime se inaktivira i potom degradira. Na taj način štiti stanicu od mutagenog, kancerogenog i citotoksičnog učinka alkilirajućih agensa. Nedostatak enzima ima za posljedicu nakupljanje mutacija nastalih krivim sparivanjem O₆ – gvanina s timinom prilikom replikacije i do transverzije G:C para u A:T (94–96). Gubitak ekspresije gena *MGMT* ima ključnu ulogu u karcinogenezi. U nekim tumorskim tkivima je uočena smanjena ekspresija proteina za razliku od normalnog tkiva. Zabilježen gubitak ekspresije često nije posljedica genetičkih mutacija poput delecije ili translokacije, nego hipermetilacije CpG otoka u promotoru gena *MGMT* (97). Epigenetičko utišavanje gena *MGMT* je primjećeno u različitim vrstama tumora, primjerice u gliomu, limfomu, tumoru mozga, karcinomu jednjaka, želudca i debelog crijeva, gušterače, adenokarcinomu prostate, te i kod TGCT-a (98,99). Aberantna metilacija gena *MGMT* detektirana je u tjelesnim tekućinama, stoga *MGMT* predstavlja dobar epigenetički dijagnostički biljeg za ranu detekciju karcinoma (100).

RASSF1A (engl. *Ras-association domain family 1 isoform A*) je poznati tumor supresor gen koji je jedan od najčešće utišanih gena u različitim vrstama tumora (101). Iako nisu u potpunosti definirani mehanizmi njegovog djelovanja, smatra se da sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa, stanične smrti i stabilnosti mikrotubula. *RASSF1A* ima funkciju negativnog regulatora staničnog rasta, zaustavljanjem staničnog ciklusa i poticanjem programirane stanične smrti ili apoptoze. Pod utjecajem mitogena smanjuje razinu ciklina A i D, te inhibira aktivaciju APC/Cdc20 kompleksa spriječavajući prijelaz iz G1 u S fazu staničnog ciklusa, odnosno odgađajući progresiju mitoze. Aktivacija receptora smrti potiče interakciju *RASSF1A* s pro-apoptotskim kinazama i proteinima, poput MST1/2 i MOAP1 (engl. *Modulator of Apoptosis 1*) što za posljedicu ima staničnu smrt (102). Njegovom inaktivacijom u patogenim stanjima kao što su tumori dolazi do nekontrolirane stanične proliferacije i izbjegavanja stanične smrti (102). Smatra se da je *RASSF1A* jedan od efektoru u Ras signalnom putu koji ima ulogu u staničnoj proliferaciji, diferencijaciji i preživljenju. *KRAS* je član Ras obitelji proteina i uključen je u isti signalni put, te je kod nekih tumora čest

dogadađ mutacija u *KRAS* zajedno s inaktivacijom *RASSF1A* (103,104). *RASSF1A* je jedan od osam (*RASSF1A* - *RASSF1H*) izoformi gena *RASSF1* lociranog na kromosomskom području 3p21.3 nastalih mehanizmom alternativnog izrezivanja i prepisivanjem s alternativnog promotora. *RASSF1A* transkript nastaje prepisivanjem s promotora prvog od dva CpG otoka (101). Kao i ostali članovi *RASSF* obitelji proteina, proteinski produkt *RASSF1A* na svom C – kraju sadži Ras domenu (engl. *Ras association domain*, RA) s kojom stvara slabe interakcije s članovima obitelji Ras proteina, te SARAH (Salvador-*RASSF1A*-Hippo) domenu od iznimne važnosti za interakciju s pro-apoptotskim kinazama MST1 i MST2. Također, sadži mjesto za fosforilaciju ATM (engl. *Ataxia telangiectasia mutated*) kinaze te je time uključen u popravak dvolančanih lomova DNA. N – kraj sadži domenu bogatu cisteinima (engl. *Cysteine – rich domain*, CRD). Smatra se da proteinski produkt *RASSF1A* nema enzimatsku funkciju, nego da služi kao konstrukcijski protein (engl. *Scaffolding protein*) koji dovodi komponente signalnih puteva u neposrednu blizinu povezujući ih u multienzimski kompleks i omogućujući njihovo međudjelovanje (101,104). *RASSF1A* je eksprimiran u svim normalnim stanicama i tkivu čovjeka. Zabilježena je njegova smanjena ekspresija uslijed hipermetilacije CpG otoka u *RASSF1A* promotoru u različitim vrstama tumora (103,105,106), primjerice u karcinomu dojke, pluća, prostate, bubrega, neuroblastoma, glioma, te u TGCT-u (107,108). Također, poremećena metilacija *RASSF1A* je detektirana u tjelesnim tekućinama, te stoga predstavlja dobar dijagnostički i prognostički biljeg za karcinom (105).

1.4. Cilj istraživanja

Brojna istraživanja su pokazala epigenetičko utišavanje gena *MGMT* i *RASSF1A* uslijed aberantne hipermetilacije promotora u različitim vrstama tumora, te i kod TGCT-a. Kod tih gena glavni mehanizam regulacije ekspresije je metilacija promotora. Budući da uloga metilacije DNA u etiologiji i biologiji razvoja karcinoma testisa nije dovoljno istražena, cilj ovog istraživanja je bio analizirati metilacijski status CpG dinukleotida unutar CpG otoka kandidat gena *MGMT* i *RASSF1A* prije i poslije tretmana kemoterapijom u pacijenata s karcinomom testisa. Statistički značajna promjena metilacije CpG dinukleotida iz periferne krvi pacijenata u odnosu na zdrave kontrole značila bi potencijalni rani dijagnostički biljeg karcinoma testisa, te pružila dodatan uvid u ishod i učinkovitost tretmana.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Uzorci DNA

Analizirana je DNA pacijenata oboljelih od karcinoma testisa u dvije faze (i) prije tretmana kemoterapijom i (ii) nakon tretmana kemoterapijom, te zdravih osoba (kontrolna skupina). Pacijenti su dobili kemoterapiju koja je uključivala cisplatin u kombinaciji s etopozidom u dva ciklusa. U prvom ciklusu su uz kemoterapiju dobili i tretman antibiotikom bleomicinom. Razmak između dva ciklusa kemoterapije je bio tri tjedna. DNA je izolirana iz pune periferne krvi. Uzorci krvi pacijenata su prikupljeni u Kliničkom bolničkom centru Zagreb (REBRO), a zdravih osoba u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu u Zagrebu. DNA je izolirana u Genos d.o.o. u Zagrebu. U istraživanju je bilo ukupno 96 uzoraka, od kojih su 32 bili uzorci prije tretmana kemoterapijom, 32 poslije tretmana kemoterapijom i 32 kontrolne skupine. Uzorci pacijenata su bili dodatno podijeljeni prema skupinama TGCT-a, od kojih su 14 bili neseminoma, 11 seminoma i 7 kombinacija seminoma i neseminoma. Prilikom optimizacije protokola i eseja za PCR i pirosekvenciranje korištena je bisulfitno konvertirana DNA izolirana iz staničnih linija HeLa (stanice karcinoma grlića maternice) i HepG2 (stanice hepatocelularnog karcinoma), te iz krvi zdrave osobe.

2.2. Metode

2.2.1. Dizajniranje početnica za PCR i pirosekvenciranje

Za umnažanje željenih fragmenata gena *MGMT* i *RASSF1A* metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) i za analizu stupnja metilacije istih fragmenata metodom pirosekvenciranja dizajnirane su početnice na temelju sekvenci gena pronađenih pomoću web genomskog preglednika UCSC Genome Bioinformatics (<https://genome.ucsc.edu/>). Sekvence su preuzete iz baze podataka RefSeq, identifikacijskih oznaka NM_002412.0 za gen *MGMT*, te NM007182.0 za gen *RASSF1A*. Preuzete sekvence obuhvaćaju promotorsku regiju, prvi egzon i dio prvog introna, te se unutar tog područja nalazi CpG otok kod oba istraživana gena. CpG otoci su određeni prema kriterijima genomskog preglednika UCSC (dijelovi genoma s više od 50% G-C sadržaja, duljine od barem 200 parova baza, te omjerom postojećih i očekivanih G-C parova većim od 0.6). Prije samog odabira početnica specifičnih za bisulfitno

konvertiranu DNA sekvencama gena je promijenjen slijed baza, uz pretpostavku da su svi nemetilirani citozini konvertirani u uracile, te da će nakon PCR reakcije biti zamjenjeni za timine. Stoga su svi citozini koji ne pripadaju CpG dinukleotidu označeni kao timini, a svi potencijalno metilirani citozini koji im pripadaju su označeni kao Y (oznaka za pirimidinsku bazu, Y=C/T). Budući da lanci DNA nisu komplementarni nakon bisulfitne konverzije, za umnažanje željenih fragmenata gena PCR reakcijom odabran je par početnica, F početnica (engl. *Forward primer*) za produljivanje jednog lanca i R početnica (engl. *Reverse primer*) za produljivanje drugog. Početnice za *MGMT* su dizajnirane prema uobičajenim pravilima za dizajn početnica s napomenom da ne smiju sadržavati CpG dinukleotide, jer bi se smanjila specifičnost prijanjanja i amplifikacije. Dužina početnica je u konačnici bila nešto manja od idealne (26-32 nukleotida) prvenstveno zbog izbjegavanja CpG dinukleotida, te pridržavanja pravila za dizajn poput ujednačavanja temperature denaturacije (engl. *Melting temperature*, T_m) para početnica (razlika između početnica ne smije biti veća od 2°C), te izbjegavanja komplementarnosti početnica samoj sebi jer može doći do stvaranja sekundarnih struktura poput ukosnica i stabilnih homodimera. Početnice sadržavaju nekoliko citozina koji su konvertirani u timine kako bi se dodatno osiguralo prijanjanje početnica na bisulfitno konvertiranu DNA. Sekvence početnica za *RASSF1A* za PCR reakciju su preuzete iz rada Pasquali i sur. (109). Odabranim početnicama su se prilikom PCR reakcije amplificirali PCR produkti veličine 273 pb za gen *MGMT* i 136 pb za gen *RASSF1A*.

Za razliku od F početnice, R početnica je dodatno obilježena biotinom koji je kovalentno vezan na njezin 5' – kraj. Produženjem R početnice polimeraznom aktivnošću tijekom PCR reakcije, nastali biotinizirani DNA lanac služi kao kalup na koji hibridizira početnica za pirosekvenciranje. Prilikom dizajna F početnice za pirosekvenciranje (F pyro) korištena su ista pravila za dizajn kao i za prethodni par početnica, te su također izbjegavana CpG mjesta. Zbog ograničene dužine sekvence koju je moguće pirosekvencirati odabrano je nekoliko CpG mjesta za svaki gen. F pyro početnice oba gena hibridiziraju što bliže analiziranoj sekvenci DNA obilježenoj biotinom. Analizirana sekvenca za *MGMT* se nalazi unutar promotora, a za *RASSF1A* unutar prvog egzona. U Tablici 1. Prikazane su navedene početnice, analizirane sekvence metodom pirosekvenciranja, te broj CpG dinukleotida analiziranih za svaki gen. Kvaliteta početnica je provjerena pomoću programa PyroMark Assay Design SW 2.0 i web programa PerlPrimer v.1.1.21.

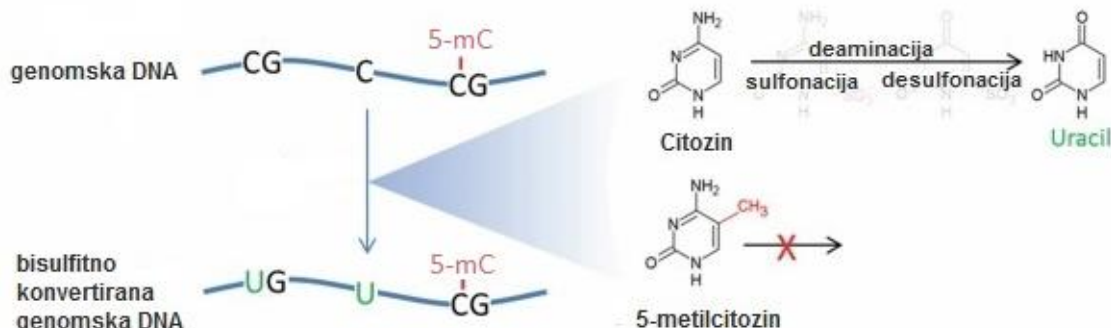
Tablica 1. Popis početnica korištenih za umnažanje i analizu metilacije gena *MGMT* i *RASSF1A*. Navedene su sekvence i broj CpG mjesta (YG) analiziranih metodom pirosekvenciranja.

Naziv gena	Naziv početnice	Sekvenca početnice	Analizirana sekvenca	CpG mjesta
<i>MGMT</i>	MGMT_F (Forward)	5'-GGTGATTGTAGTTTTGGA-3'	5'- <u>YGYGTTTYGGGTTTAGYGT</u> <u>AGTYGTTTYGAGTAGGATY</u> <u>GGGATTTTA-3'</u>	7
	MGMT_R Biotin (Reverse)	Biotin-5'- TCCTATCACAAAAATAATCC-3'		
	MGMT_F_Pyro (Forward za pirosekvenciranje)	5'-GGTATTAGGAGGGGAGAGATT-3'		
<i>RASSF1A</i>	RASSF1A_F (Forward)	5'-AGTTTGGATTTTGGGGGAGG-3'	5'- <u>YGTTYGGTTYGYGTTTGTTA</u> <u>GYGTTTAAAGTTAGYGAAG</u> <u>TAYGGGTTTAATYGGGTTA</u> <u>TGYG-3'</u>	9
	RASSF1A_R Biotin (Reverse)	Biotin-5'- CAACTCAATAAACTCAAACCTCCC-3'		
	RASSF1A_F_Pyro (Forward za pirosekvenciranje)	5'-GTTTTGTGGTTT-3'		

2.2.2. Bisulfitna konverzija DNA

Za analizu metilacije DNA pomoću pirosekvenciranja, genomska DNA (gDNA) iz uzoraka je modificirana reakcijom bisulfitne konverzije koja podrazumijeva selektivnu konverziju nemetiliranih citozina do uracila, dok metilirani citozini ostaju nepromijenjeni (Slika 4.). Za taj postupak korišten je komplet kemikalija EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, Catalog Nos. D5005 & D5006) prema prilagođenom protokolu proizvođača. U PCR tubice dodano je 20 µl smjese DNA (500 ng po reakciji) i vode, te 130 µl prethodno pripravljenog CT Conversion reagent-a koji sadrži natrij bisulfit za bisulfitnu konverziju. Prije stavljanja u PCR uređaj, tubice su kratko centrifugirane kako bi se sve komponente smjese spustile na dno tubice. Pokrenut je sljedeći PCR program: 10 min na 98°C (denaturacija lanaca DNA toplinom), inkubacija 2,5 sata na 65°C, te čuvanje uzoraka na 4°C maksimalno 20 sati. Nakon navedenog koraka, ukupan volumen svake PCR tubice prebačen je u zasebne Zymo-Spin™ IC Column kolonice položene u sabirne kolonice, kojima je prethodno dodano 600 µl M-Binding pufera. Slijedilo je centrifugiranje na 12 000 g kroz 30

sek. Profiltrirana tekućina iz sabirnih kolonica je bačena. U Zymo-Spin™ IC Column kolonice dodano je 100 µl M-Wash pufera, te je ponovljen korak centrifugiranja na 12 000 g



Slika 4. Princip bisulfitne konverzije DNA. Citozin, C; gvanin, G; uracil, U; 5-metilcitozin, 5-mC. Slika je preuzeta i prilagođena iz rada Pixberg-a i sur. (110).

kroz 30 sek. Zatim je u kolonice dodano 200 µl M-Desulphonation pufera, nakon čega je uslijedila inkubacija 20 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani na 12 000 g kroz 30 sek. Tim korakom je bio završen postupak bisulfitne konverzije te su uslijedili koraci pročišćavanja bisulfitno konvertirane gDNA. U kolonice je dodano 200 µl M-Wash pufera, te su centrifugirane kroz 30 sek. Ovaj korak se ponovio. Zymo-Spin™ IC Column kolonice su prebačene u sterilne tubice (1.5 ml), te im je dodano po 10 µl Elution pufera direktno na matriks kolonice. Slijedilo je centrifugiranje pomoću kojeg su eluirani konvertirani i pročišćeni uzorci DNA u sterilne tubice. Uzorci su bili spremni za daljnu analizu ili su bili pohranjeni na -20°C.

2.2.3. Umnažanje fragmenata gena *MGMT* i *RASSF1A*

Bisulfitno konvertirani uzorci gDNA pacijenata i zdravih osoba korišteni su kao kalup za umnažanje željenih fragmenata gena *MGMT* i *RASSF1A* metodom lančane reakcije polimeraze (PCR). U tu svrhu korišten je komplet kemikalija PyroMark® PCR kit (QIAGEN®). Uz uzorke gDNA pacijenata i zdravih osoba, za kontrolu metilacije korištena je bisulfitno konvertirana potpuno metilirana i nemetilirana DNA čovjeka, EpiTect® PCR Control DNA Set (QIAGEN®). Početnice za oba gena su osmišljene na temelju podataka

genomskog preglednika UCSC kao što je opisano u poglavlju 2.2.1 Dizajniranje početnica za PCR i pirosekvenciranje. Reakcijska smjesa je pripremljena prema prethodno optimiziranim protokolima. Komponente reakcijske smjese i volumeni po reakciji navedeni su u Tablici 2 i 3. PyroMark PCR Master Mix komponenta sadrži HotStarTaq DNA polimerazu koja je u neaktivnom stanju pri sobnoj temperaturi, a aktivira se pri 95°C, te pufer s MgCl₂ i deoksiribonukleotid-trifosfati, dNTP-i (dATP, deoksiadenozin – trifosfat; dGTP, deoksigvanozin – trifosfat; dTTP, deoksitimidin – trifosfat; dCTP, deoksicitidin - trifosfat) koji osiguravaju optimalne uvjete PCR reakcije. Nakon pripreme reakcijske smjese, dodani su odgovarajući volumeni (48.5 µL za *MGMT* i 23.5 µL za *RASSF1A*) u svaku PCR tubicu, te je na kraju dodana DNA odgovarajućeg uzorka (1.5 µL). U negativnu kontrolu je umjesto uzorka DNA dodan isti volumen vode oslobođene RNaza (engl. *RNase-free*). Potom je pokrenut sljedeći PCR program u The Veriti® 96-Well Thermal Cycle (Applied Biosystems®) uređaju:

Tablica 2. Reakcijska smjesa za gen *MGMT*

Komponente reakcijske smjese	Volumeni po reakciji (µL)
PyroMark PCR Master Mix, 1x	25
CoralLoad Concetrate, 1x	5
MGMT_F (Forward) 0.12 µM	0.6
MGMT_R_Biotin (Reverse) 0.12 µM	0.6
DNA	1.5
RNase-free voda	17.3
Ukupno	50

- 15 min na 95°C (aktivacija HotStarTaq DNA polimeraze)
 - 30 sek na 94°C (denaturacija DNA lanaca)
 - 30 sek na 51°C za *MGMT*, a 65°C za *RASSF1A* (prijanjanje početnica)
 - 30 sek na 72°C (produljivanje početnica polimeraznom aktivnošću)
 - 10 min na 72°C (završno produljivanje)
 - ∞ na 4°C
- } 50 ciklusa

Tablica 3. Reakcijska smjesa za gen *RASSF1A*

Komponente reakcijske smjese	Volumeni po reakciji (µL)
PyroMark PCR Master Mix, 1x	12.5
CoralLoad Concetrate, 1x	2.5
RASSF1A_F (Forward) 0.16 µM	0.4
RASSF1A_R_Biotin (Reverse) 0.16 µM	0.4
DNA	1.5
RNase-free voda	7.7
Ukupno	25

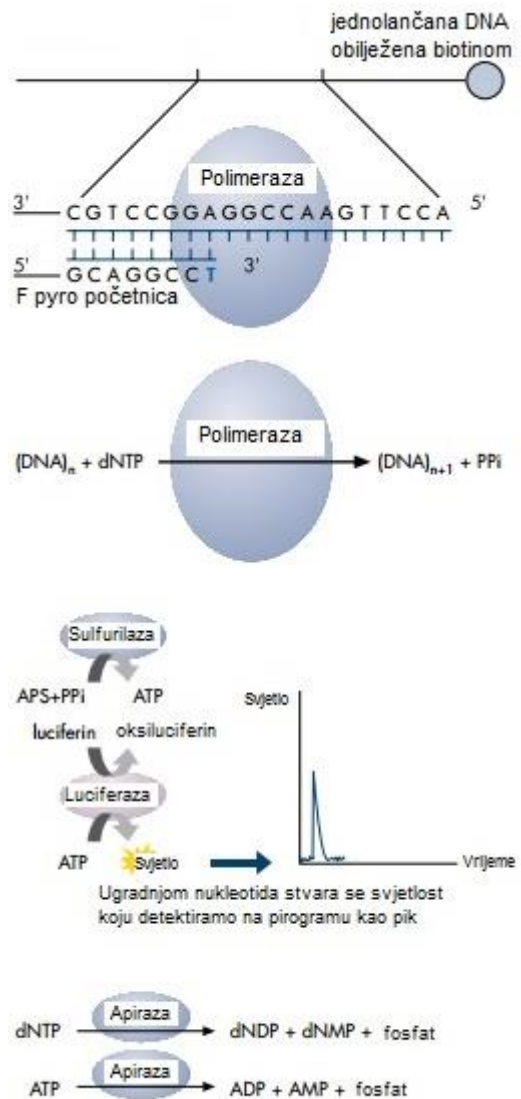
Navedenom PCR reakcijom su se uracili nastali bisulfitnom konverzijom zamijenili s timinima (dTTP), a metilirani citozini u CpG dinukleotidu citozinima (dCTP).

Uspješnost lančane reakcije polimerazom, odnosno kvaliteta PCR produkta je provjerena pomoću gel elektroforeze na 2% agaroznom gelu u 1xTAE puferu. Na gel je nanešeno 5 µL pojedinog PCR produkta. Gel elektroforeza je provedena na 80 V u trajanju od 45 min. Dodatkom otopine etidij bromida prilikom pripreme gela omogućena je po završetku elektroforeze vizualizacija umnoženih DNA fragmenata pomoću UV-transluminatora. Veličina PCR produkata je provjerena usporedbom s markerom MassRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific) s poznatim veličinama DNA fragmenata. Uspješno umnoženi uzorci su pohranjeni na +4°C sve do postupka pirosekvenciranja.

2.2.4. Pirosekvenciranje

Umnoženim uzorcima DNA je potom analiziran postotak metilacije svakog pojedinog CpG dinukleotida željenog dijela gena metodom pirosekvenciranja u PyroMark[®] Q24 Advanced uređaju (QIAGEN[®]). Pirosekvenciranje je kvantitativna metoda sekvenciranja kojom se u stvarnom vremenu mjeri intenzitet svjetlosnog signala nastalog enzimatskom pretvorbom pirofosfata oslobođenog tijekom pojedinačne ugradnje nukleotida u rastući lanac DNA. Princip pirosekvenciranja prikazan je na Slici 5. Početnica za pirosekvenciranje (F pyro) hibridizira na jednolančanu DNA obilježenu biotinom koja služi kao kalup za sintezu

novog lanca DNA. U reakcijsku smjesu su dodani enzimi DNA polimeraza, ATP sulfurilaza, luciferaza, apiraza i pripadni supstrati adenosin-5'-fosfosulfat (APS) i luciferin. Zatim se dodaje jedan od četiri deoksiribonukleotida (dNTP). Ukoliko postoji komplementarnost s bazom u kalupnoj DNA, polimeraza će katalizirati reakciju produženja F pyro početnice za taj dNTP. Prilikom svake ugradnje dNTP-a u rastući lanac oslobađa se molekula pirofosfata (PP_i). U prisutnosti APS-a enzim sulfurilaza pretvara pirofosfat u adenosin trifosfat, ATP. Enzim luciferaza u prisutnosti nastale molekule ATP-a katalizira reakciju oksidacije luciferina u oksiluciferin pri čemu se oslobađa foton svjetlosti koji se detektira pomoću CCD kamere, te je prikazan na pirogramu kao pik. Intenzitet svjetlosti, odnosno visina svakog pika je proporcionalna količini ATP-a, odnosno broju ugrađenih nukleotida. Prema tome vrlo visoki pik ukazuje na ugradnju više istih nukleotida zaredom. Postupak se ponavlja nakon što enzim apiraza degradira molekule ATP-a i neugrađene dNTP-e (PyroMark[®] Q24 Advanced User Manual, QIAGEN[®] 2013) (111).



Slika 5. Prikaz kemijskih reakcija i stvaranja svjetlosnog signala tijekom pirosekvenciranja. Slika je preuzeta i prilagođena sa službene web stranice Qiagen-a (<https://www.qiagen.com>)

Pirosekvenciranje je provedeno pomoću kompleta kemikalija PyroMark[®] Q24 Advanced (QIAGEN[®]) i prema protokolu proizvođača, te optimiziranim esejima kojima su uspostavljeni optimalni uvjeti reakcije pirosekvenciranja. Prije početka postupka pirosekvenciranja u računalnom programu PyroMark Q24 Advanced Software su kreirani CpG eseji pojedinačno za svaki gen, te je definiran postupak analize (engl. *Run*) s položajima uzoraka na pločici zajedno s pripadnim esejima koji su spremljeni na USB stik. Prilikom kreiranja eseja potrebno je utvrditi redosljed dodavanja nukleotida u reakcijsku smjesu (engl. *Dispensation order*, DO). U tu svrhu unešene su sekvence fragmenata gena prije bisulfitne

konverzije koje će se analizirati, te ih potom program direktno konvertira. Zatim je odabran automatski način određivanja DO u kojem program na temelju unesene sekvence sam određuje redosljed, dodaje pojedine dodatne prazne pozicije koje služe kao negativna kontrola, te jedan citozin koji služi kao unutarnja kontrola učinkovitosti bisulfitne konverzije. Nakon toga slijedila je priprema radne stanice PyroMark® Q24 Vacuum Workstation dodavanjem odgovarajućih otopina za pročišćavanje i denaturaciju PCR uzoraka, te provjera valjanosti vakuumske pumpe. Nakon što je sve bilo spremno pripremljena je reakcijska smjesa za vezanje biotiniziranih PCR produkata na streptavidinom obložene sefarozne kuglice (interakcija biotin-streptavidin) (Tablica 4.). U pojedinu jažicu PCR pločice (24 jažice) dodana je smjesa pufera za vezanje, kuglica sefaroze i po potrebi mili-Q vode visoke čistoće, te na kraju PCR produkt određenog gena. Kako bi se spriječilo taloženje sefaroznih kuglica na dno jažica i omogućilo što bolje vezanje produkata na kuglice, pločica je postavljena na tresilicu na 1400 rpm kroz 10 min. U međuvremenu pripremljena je PyroMark Q24 pločica za pirosekvenciranje (24 jažice) dodavanjem pufera za prijanjanje i F pyro početnica za određeni gen (Tablica 1.). Nakon isteka 10 min, pločice su postavljene na njihove pozicije na radnoj stanici. Pod uključenim vakuumom nastavci s filtrima ("iggy") su spušteni u jažice

Tablica 4. Komponente i volumeni reakcijske smjese za vezanje biotiniziranih PCR produkata na sefarozne kuglice (narančasta boja) i za prijanjane početnica (plava boja)

Komponente reakcijske smjese	Volumen po uzorku (µL)		
	<i>MGMT</i>	<i>RASSF1A</i>	
Kuglice sefaroze (High Performance, 34 µm, g ml, GE Healthcare)	3	1	PCR pločica
Pufer za vezanje	37	40	
mili-Q-voda	0	19	
PCR produkt (DNA)	40	20	
F pyro početnica (10 µM)	0,75	0,75	PyroMark Q24 pločica
Pufer za prijanjanje	19,25	19,25	

PCR pločice na 15 sek. Tim postupkom je ostvareno povlačenje sefaroznih kuglica s vezanim biotiniziranim PCR produktom na filtre nastavaka vakuumske pumpe, dok je ostatak tekućine profiltriran. Nakon toga, nastavci s filtrima su premješteni u 70% etanol na 5 sek (ispiranje nevezanih DNA koje nisu obilježene biotinom). Zatim u denaturacijski pufer na 5 sek (odvajanje lanaca DNA pri čemu samo biotinizirani lanac ostaje vezan za sefaroznu kuglicu).

Nakon kemijske denaturacije, premještanjem u pufer za ispiranje na 10 sek nastavci su isprani od denaturacijskog pufera i nevezanih lanaca DNA. Nakon ispiranja, nastavci su postavljeni neposredno iznad PyroMark Q24 pločice, te je isključen vakuum. Zatim su spuštene u jažice pločice uz polaganu trešnju kako bi se kuglice s vezanom DNA u potpunosti otpustile od nastavaka u smjesu s početnicama za pirosekvenciranje. Pločica je inkubirana na 80°C kroz 5 min postavljanjem na grijaču ploču. Nakon inkubacije, pločica je ohlađena na sobnoj temperaturi u PyroMark Q24 Advanced uređaju (hibridizacija početnica za pirosekvenciranje na komplementarne slijedove DNA). U međuvremenu je priređen nosač PyroMark Q24 cartridge dodavanjem određenih volumena smjese enzima, supstrata i deoksiribonukleotida (dNTP) koji variraju ovisno o broju uzoraka, dužini i sastavu analizirane sekvence. U pojedine odjeljke nosača su redosljedom dodani prvo dNTP-i (dCTP, dGTP, dTTP i dATP α S), zatim smjesa enzima (sadrži DNA polimerazu, ATP sulfurilazu, luciferazu, apirazu i dodatno SSB proteine), te naposljetku fotoosjetljiva smjesa supstrata (adenosin-5'-fosfosulfat ili APS i luciferin). Navedeni deoksiribonukleotid dATP α S se koristi umjesto dATP-a, jer ga enzim luciferaza ne prepoznaje, a DNA polimeraza ga normalno ugrađuje u lanac DNA. Nakon navedenog, nosač je smješten unutar PyroMark Q24 Advanced uređaja zajedno s prethodno ohlađenom PyroMark Q24 pločicom. U uređaj je stavljen USB stik, te je pokrenut postupak pirosekvenciranja uzoraka.

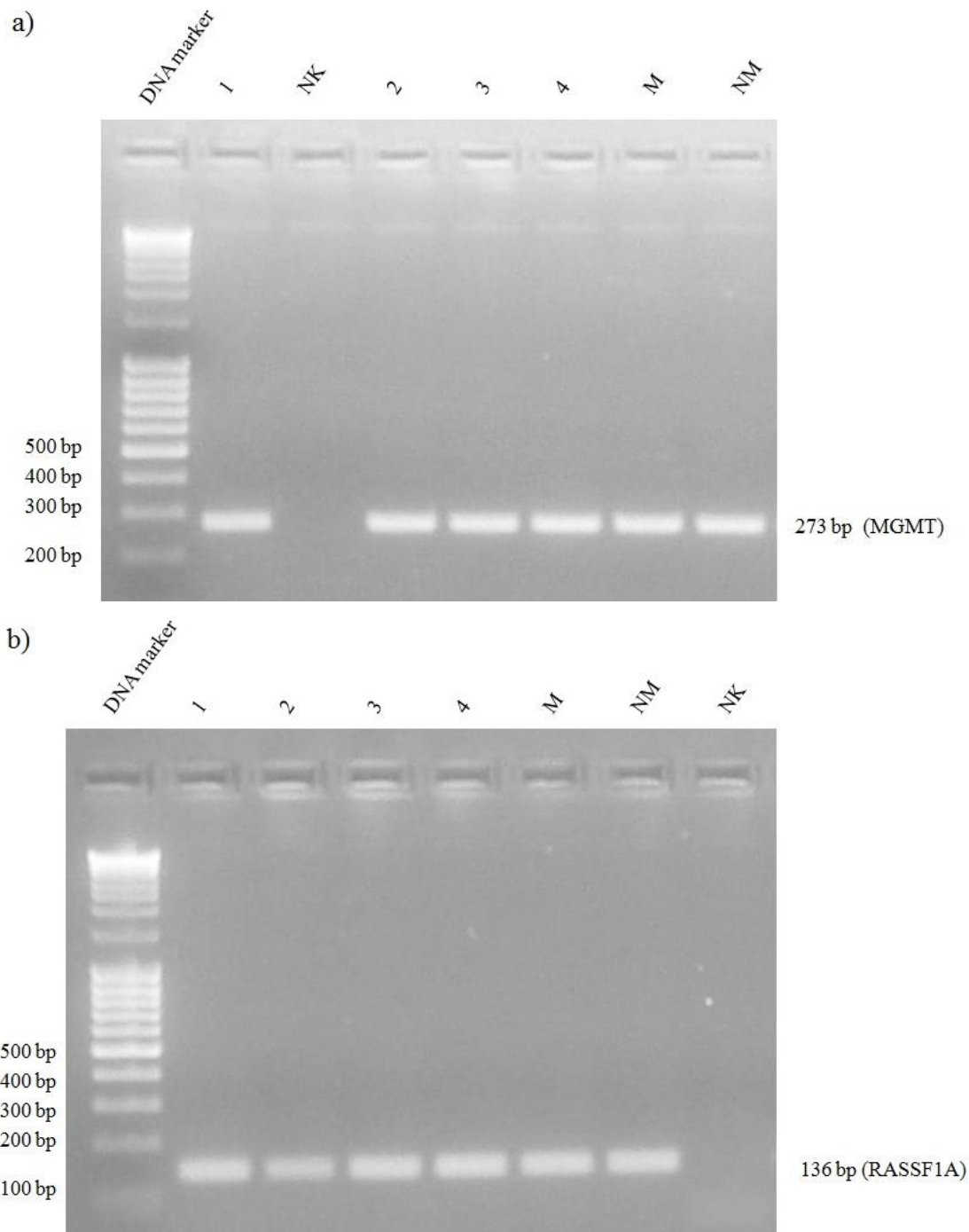
2.2.5. Statistička obrada podataka

Dobiveni podaci su statistički obrađeni u računalnom programu STATISTICA® (verzija 10.0). Mjere srednje vrijednosti, standardne devijacije i standardne pogreške za svaki skup podataka (prije tretmana kemoterapijom, poslije tretmana kemoterapijom i kontrolne skupine) i svako CpG mjesto opisane su koristeći deskriptivnu statistiku. Grafički prikazi su napravljeni u Microsoft Office Excel 2007 programu. Za ispitivanje dolaze li podaci iz normalne distribucije korištena je Lillieforsova inačica Kolmogorov-Smirnovljeva testa. S obzirom da varijable nisu bile iz normalne distribucije korišteni su neparametrijski statistički testovi. Za oba gena korišten je Wilcoxon Matched Pair test za zavisne (usporedba uzoraka prije i poslije tretmana kemoterapijom) i Mann-Whitney U test za nezavisne varijable (usporedba uzoraka prije tretmana kemoterapijom i kontrolne skupine). Statistički značajni rezultati smatrani su oni čija je p vrijednost $<0,05$.

3. REZULTATI

3.1. Provjera kvalitete PCR reakcije gel elektroforezom

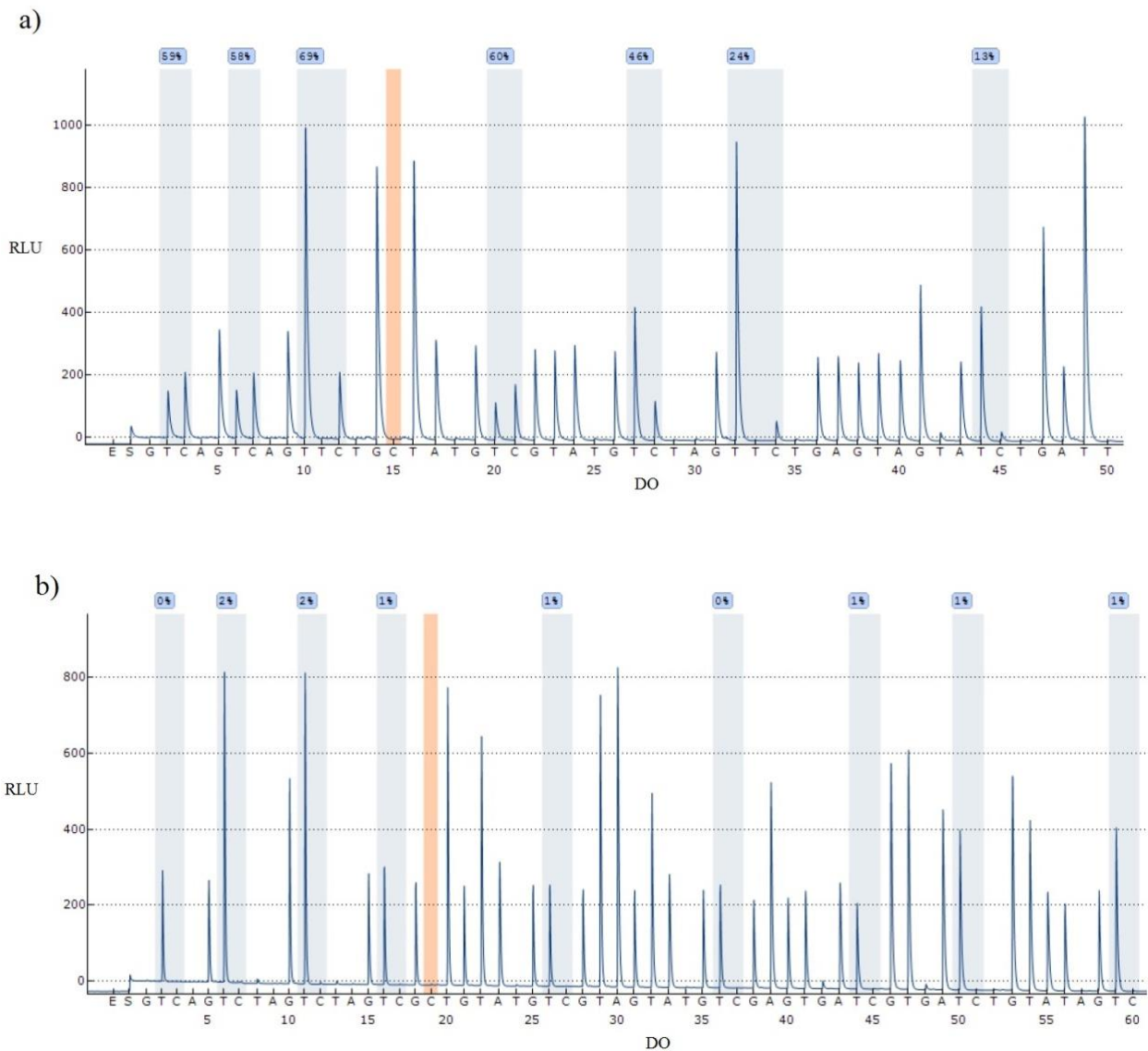
Uspješnost umnožavanja fragmenata gena *MGMT* i *RASSF1A* metodom lančane reakcije polimeraze provjerena je pomoću gel elektroforeze. Slika 6. Prikazuje ogledne primjerke agaroznog gela s uspješno umnoženim fragmentima gena *MGMT* veličine 273 bp i gena *RASSF1A* veličine 136 bp u nekoliko uzoraka bisulfitno konvertirane DNA pacijenata, zdravih jedinki, te uzorcima bisulfitno konvertirane potpuno metilirane i nemetilirane DNA čovjeka. Uspješnost je određena usporedbom s fragmentima DNA poznatih veličina. Negativna kontrola nije pokazala kontaminaciju komponenti reakcijske smjese stranim molekulama DNA jer se fragmenti gena nisu umnožili PCR reakcijom.



Slika 6. Ogledni primjerci agaroznog gela dobivenih gel elektroforezom prilikom provjere kvalitete PCR produkata. a) Uspješno umnoženi fragmenti gena *MGMT* veličine 273 bp. b) Uspješno umnoženi fragmenti gena *RASSF1A* veličine 136 bp. Bisulfitno konvertirani uzorci DNA pacijenata i zdravih kontrola zbog jednostavnosti su označeni brojevima. M – bisulfitno konvertirana potpuno metilirana DNA čovjeka; NM - bisulfitno konvertirana potpuno nemetilirana DNA čovjeka; NK - negativna kontrola; DNA marker - marker s poznatim veličinama fragmenata DNA.

3.2. Analiza pirograma nakon pirosekvenciranja

Nakon završenog postupka pirosekvenciranja analiza CpG metilacije pojedinog uzorka je grafički prikazana na pirogramu (Slika 7.). Prilikom interpretacije pirograma kvaliteta dobivenih rezultata je procijenjena na osnovi kontrole bisulfitne konverzije, negativnih kontrola, intenziteta dobivenih pikova, te prisutnosti nespecifičnih signala. Uzorci kod kojih nije došlo do ugradnje citozina u sekvencu prije timina (konvertiranog iz nemetiliranog citozina) su prošli kontrolu bisulfitne konverzije i time uključeni u daljnju analizu. Nekoliko uzoraka nije prošlo kontrolu, što znači da bisulfitna konverzija tih uzoraka nije bila potpuna (svi citozini kojima ne slijedi gvanin nisu konvertirani u timine), te im je ponovljen postupak bisulfitne konverzije. Gotovo svi pikovi varijabilnih pozicija su prošli najnižu granicu intenziteta svjetlosnog signala od 20 RLU (engl. *Relative light units*), te je većina bila iznad 50 RLU. U konačnici postotci analiziranih CpG mjesta na dobivenim pirogramima su pokazali nikakvo ili malo odstupanje od očekivanih, te su većinom bili označeni plavom bojom i definirani kao pouzdani i kvalitetni rezultati. Općenito dobiveni postotci CpG metilacije gena *MGMT* su bili viši od gena *RASSF1A* koji pokazuju vrlo nisku razinu metilacije.

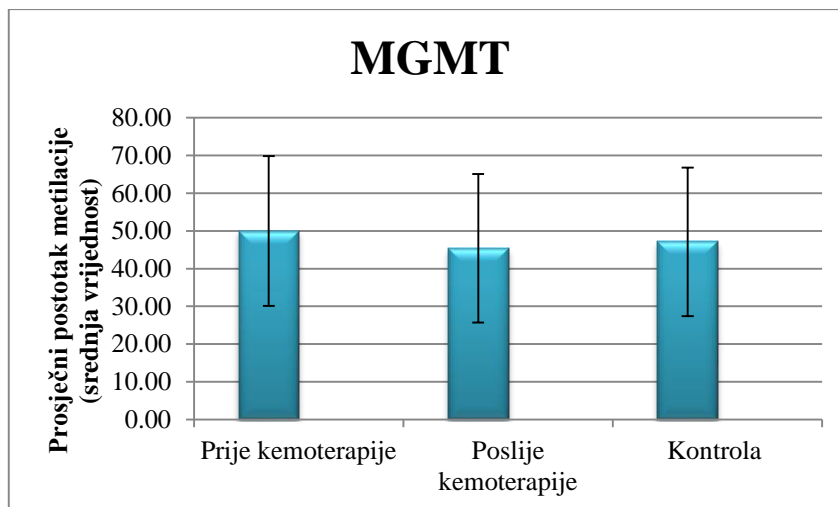


Slika 7. Primjeri pirograma dobivenih analizom CpG metilacije uzoraka DNA pacijenata prije tretmana kemoterapijom. a) Pirogram gena *MGMT* prikazuje postotke metilacije 7 analiziranih CpG mjesta i b) gena *RASSF1A* prikazuje postotke metilacije 9 analiziranih CpG mjesta. Na osi X prikazan je redosljed dodavanja nukleotida (DO) i dužina analizirane sekvence s brojevima radi lakšeg snalaženja prilikom interpretacije pirograma, te smjesu enzima (E) i supstrata (S) dodanu na početku analize. Na osi Y prikazan je intenzitet svjetlosnog signala (engl. *Relative light units*, RLU). Varijabilne pozicije T/CpG su istaknute svijetlo plavom bojom u obliku stupaca, dok su iznad njih označeni postotci metilacije pojedinog CpG mjesta. Kontrola bisulfitne konverzije je istaknuta stupcem svijetlo crvene boje. Pikovi prikazuju ugradnju određenog dNTP-a.

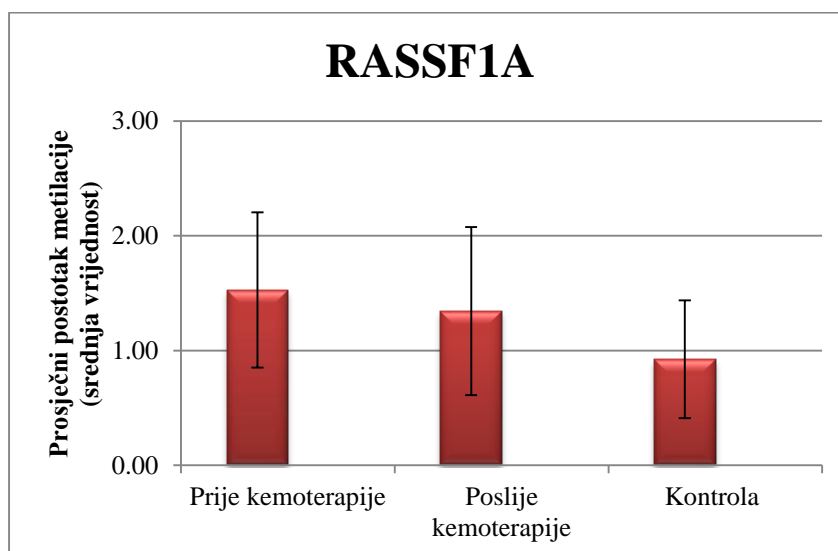
3.3. Promjena stupnja CpG metilacije gena *MGMT* i *RASSF1A* u pacijenata s karcinomom testisa

Analizom metilacije fragmenata gena *MGMT* i *RASSF1A* pomoću metode pirosekvenciranja određen je postotak metilacije pojedinih CpG mjesta svakog uzorka. Slika 8. grafički prikazuje promjenu prosječnog postotka CpG metilacije po skupinama uzoraka. Uočena je razlika stupnja metilacije s obzirom na analizirane skupine. Skupina uzoraka DNA

a)



b)



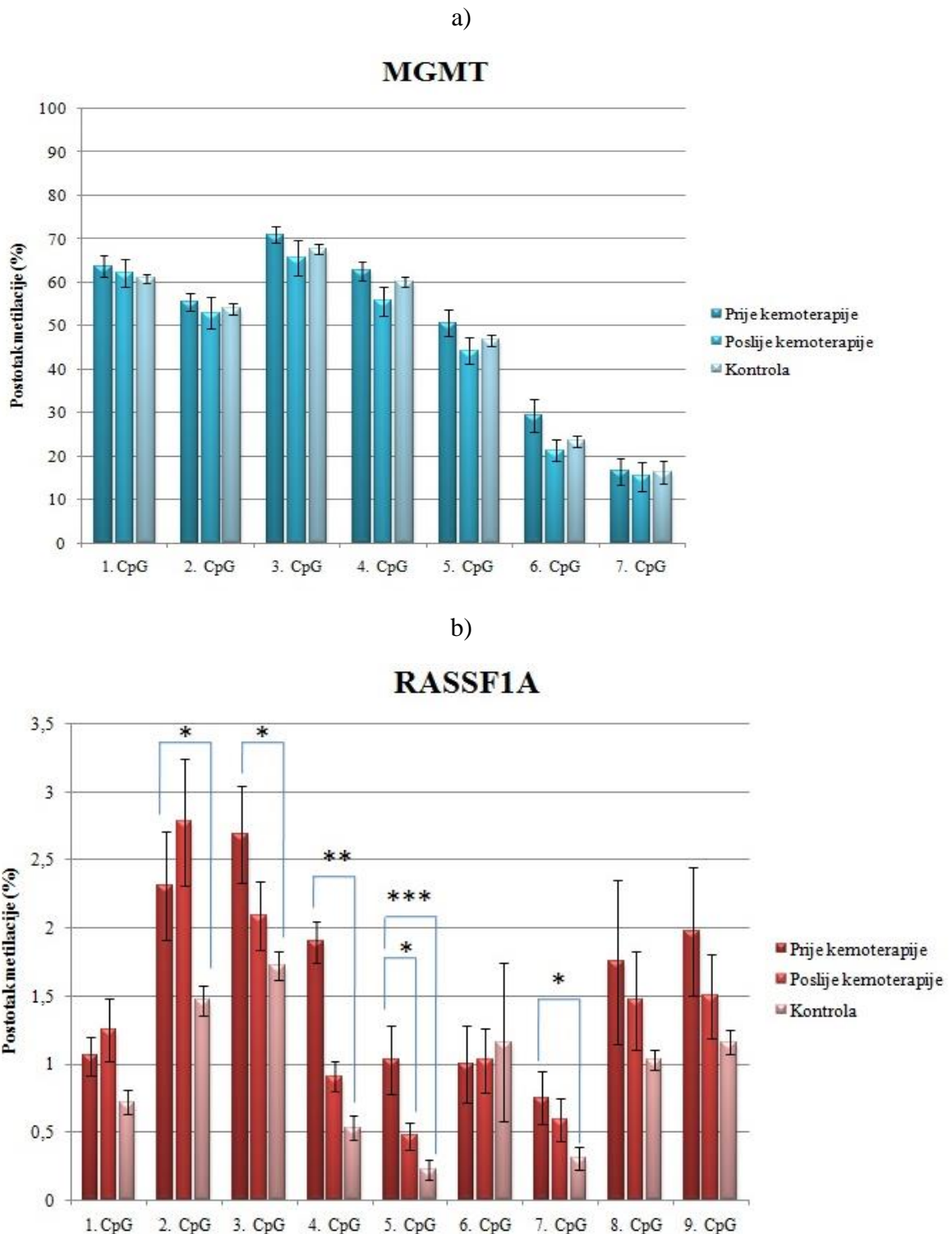
Slika 8. Grafički prikaz srednje vrijednosti postotka metilacije svih CpG mjesta analiziranih fragmenata a) gena *MGMT* i b) gena *RASSF1A* dobivenih postupkom pirosekvenciranja. Za svaku skupinu uzoraka (DNA pacijenata prije tretmana kemoterapijom, poslije tretmana kemoterapijom i njihovih pripadnih zdravih kontrola) prikazan je stupac prosječnog postotka metilacije. Na svakom stupcu su naznačene okomite linije standardne devijacije koje predstavljaju heterogenost metilacije pojedinih CpG mjesta unutar pripadne skupine.

pacijenata prije tretmana kemoterapijom pokazuje viši stupanj metilacije (za gen *MGMT* srednja vrijednost iznosi 49,97 %, a za *RASSF1A* 1,53 %) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (za gen *MGMT* srednja vrijednost iznosi 47,1 %, a za *RASSF1A* 0,92 %) u oba slučaja analiziranih fragmenata gena. Također, skupina uzoraka DNA pacijenata poslije tretmana kemoterapijom pokazuje niži stupanj metilacije (za gen *MGMT* srednja vrijednost iznosi 45,39 %, a za *RASSF1A* 1,34 %) u odnosu na skupinu prije tretmana.

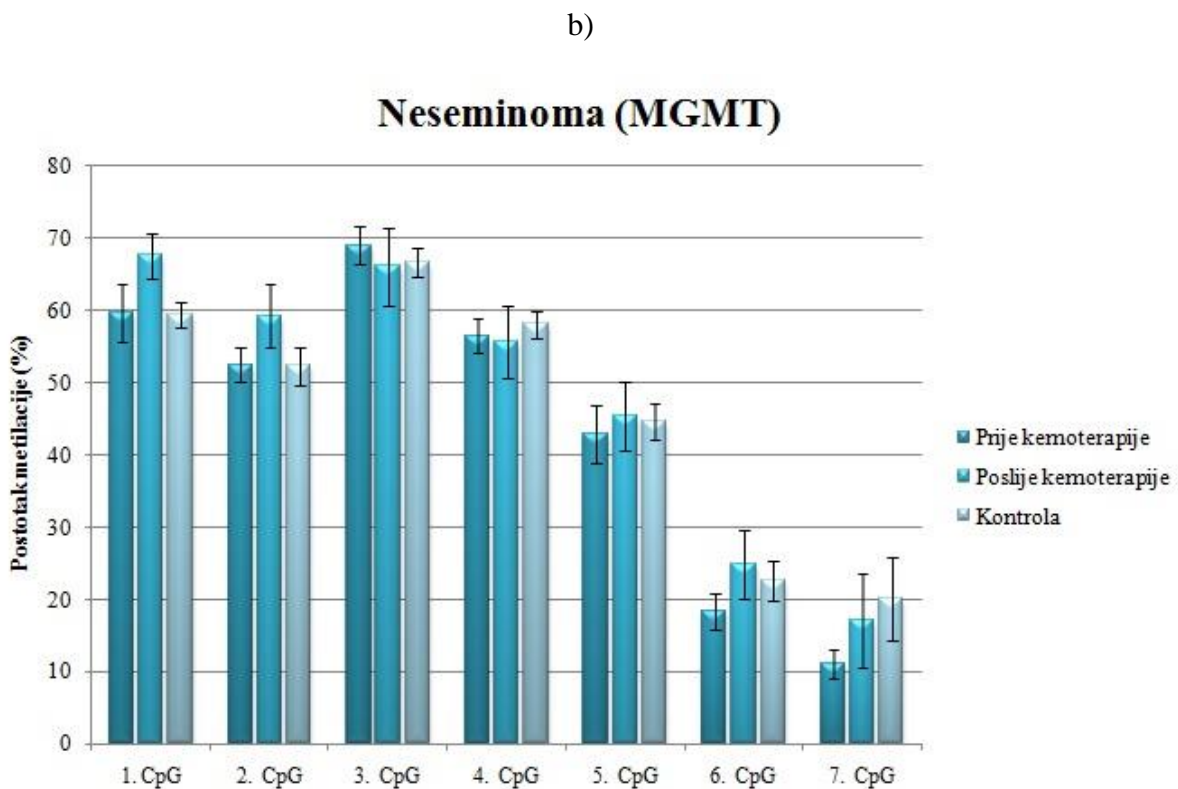
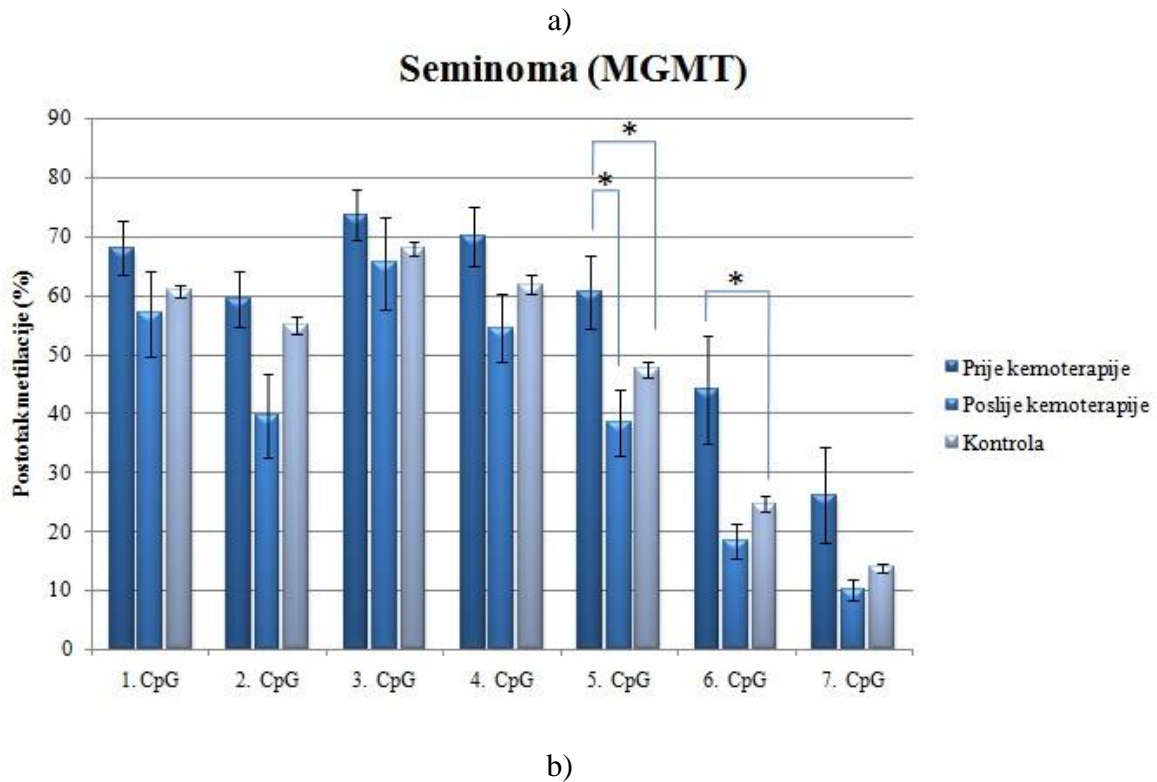
Napravljena je statistička obrada podataka stupnja metilacije za pojedino CpG mjesto po skupinama uzoraka. Unutar fragmenta gena *MGMT* nije pokazana statistički značajna razlika u postotku metilacije između analiziranih skupina uzoraka, dok unutar fragmenta gena *RASSF1A* je pokazana statistički značajna razlika u nekoliko CpG mjesta (Slika 9.). Pet (2 - 5. i 7. CpG mjesto) od ukupno devet CpG mjesta pokazuju statistički značajnu razliku u postotku metilacije između skupine uzoraka DNA pacijenata prije tretmana kemoterapijom i zdrave kontrolne skupine, dok samo jedno CpG mjesto (5. CpG mjesto) pokazuje statistički značajnu razliku između uzoraka DNA pacijenata prije i poslije kemoterapije. Navedena CpG mjesta uzoraka DNA pacijenata prije kemoterapije su hipermetilirana u odnosu na kontrolnu skupinu, te skupinu poslije tretmana kemoterapijom.

Također je napravljena statistička obrada podataka stupnja metilacije za pojedino CpG mjesto prema histopatološkim podskupinama TGCT-a za svaku skupinu uzoraka. Unutar fragmenta gena *MGMT* za podskupinu seminoma promjena u postotku metilacije pokazuje statistički značajnu razliku u dva CpG mjesta (5. i 6. CpG mjesto) između uzoraka DNA pacijenata prije kemoterapije i zdravih kontrola, te u jednom CpG mjestu (5. CpG mjesto) između uzoraka DNA pacijenata prije i poslije kemoterapije. Navedena CpG mjesta su hipermetilirana u odnosu na kontrolnu skupinu, te skupinu poslije tretmana kemoterapijom. Za podskupinu neseminoma promjene u postotku metilacije ne pokazuju statistički značajnu razliku (Slika 10.). Unutar fragmenta gena *RASSF1A* za podskupinu seminoma promjena u postotku metilacije pokazuje statistički značajnu razliku u jednom CpG mjestu (5. CpG mjesto) između uzoraka DNA pacijenata prije kemoterapije i zdravih kontrola. Za podskupinu neseminoma statistički značajnu razliku u metilaciji pokazuju četiri CpG mjesta (3 - 5. i 7. CpG mjesto) između uzoraka DNA pacijenata prije kemoterapije i zdravih kontrola, te jedno CpG mjesto (1. CpG mjesto) između uzoraka DNA pacijenata prije i poslije kemoterapije. Navedena CpG mjesta uzoraka DNA pacijenata prije kemoterapije su hipermetilirana u odnosu na zdravu kontrolu i hipometilirana u odnosu na uzorke DNA pacijenata nakon kemoterapije. Iako dijagrami pokazuju neke dodatne razlike u postotku metilacije, podaci jako

variraju što pokazuju okomite linije standardne pogreške, te ih program nije uzeo u obzir kao statistički značajne promjene (Slika 11.).



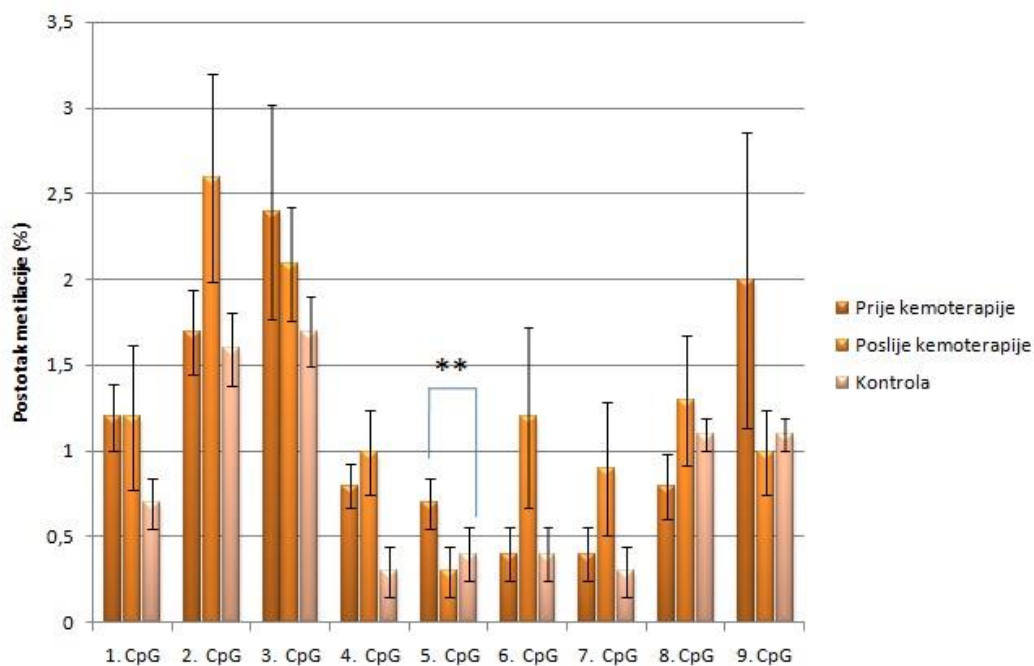
Slika 9. Stupčasti dijagrami postotaka metilacije pojedinih CpG mjesta fragmenata gena a) *MGMT* i b) *RASSF1A* dobivenih metodom pirosekvenciranja. Za pojedino CpG mjesto prikazan je stupac metilacije uzoraka DNA pacijenata oboljelih od karcinoma testisa prije tretmana kemoterapijom, poslije tretmana kemoterapijom i zdrave kontrolne skupine. Okomite linije na svakom stupcu predstavljaju standardnu pogrešku (engl. *Standard error of the mean*, SEM). Statistički značajna p vrijednost između skupina uzoraka pojedinog CpG mjesta označena je zvijezdicama (* označava $p < 0,05$; ** - $p < 0,005$; *** - $p \leq 0,0006$).



Slika 10. Stupčasti dijagrami postotaka metilacije pojedinih CpG mjesta fragmenata gena *MGMT* prema tipovima TGCT-a, a) za seminoma i b) za neseminoma dobivenih metodom pirosekvenciranja. Za pojedino CpG mjesto prikazan je stupac metilacije uzoraka DNA pacijenata oboljelih od karcinoma testisa prije tretmana kemoterapijom, poslije tretmana kemoterapijom i zdrave kontrolne skupine. Okomite linije na svakom stupcu predstavljaju standardnu pogrešku (engl. *Standard error of the mean*, SEM). Statistički značajna p vrijednost između skupina uzoraka pojedinog CpG mjesta označena je zvijezdicama (* označava $p < 0,05$).

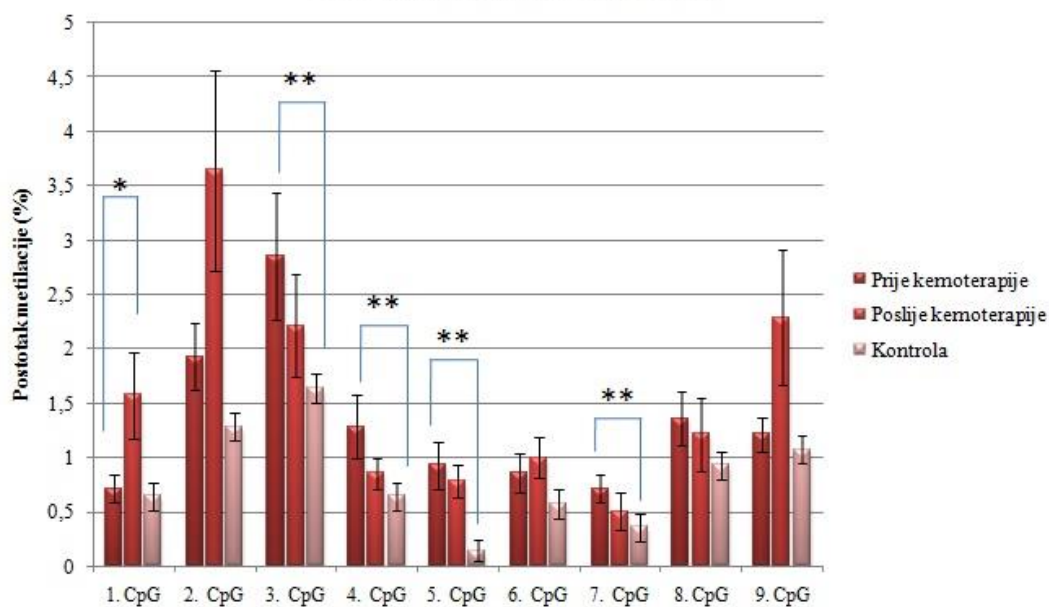
a)

Seminoma (RASSF1A)



b)

Neseminoma (RASSF1A)



Slika 11. Stupčasti dijagrami postotaka metilacije pojedinih CpG mjesta fragmenata gena *RASSF1A* prema tipovima TGCT-a, a) za seminoma i b) za neseminoma dobivenih metodom pirosekvenciranja. Za pojedino CpG mjesto prikazan je stupac metilacije uzoraka DNA pacijenata oboljelih od karcinoma testisa prije tretmana kemoterapijom, poslije tretmana kemoterapijom i zdrave kontrolne skupine. Okomite linije na svakom stupcu predstavljaju standardnu pogrešku (engl. *Standard error of the mean*, SEM). Statistički značajna p vrijednost između skupina uzoraka pojedinog CpG mjesta označena je zvijezdicama (* označava $p < 0,05$; ** - $p \leq 0,009$).

4. RASPRAVA

Prije nekoliko desetljeća smatralo se da je nastanak karcinoma isključivo posljedica niza mutacija nastalih oštećenjem genoma uslijed mutacija u genima odgovornim za očuvanje staničnog integriteta poput tumor supresor gena koji reguliraju procese bitne za održavanje stanične homeostaze. Međutim, danas se u istraživanju zloćudnih tumora sve veća važnost pridodaje epigenetičkim mehanizmima, poput metilacije DNA, koji sudjeluju u samom procesu neoplastične transformacije stanica. Cjelogenomskim analizama metilacije DNA u tumorskim stanicama je pokazano globalno smanjenje razine metilacije u odnosu na normalne stanice. Globalna hipometilacija u tumorskim stanicama rezultira gubitkom genomskog utiska i općenitom nestabilnosti genoma uslijed aktivacije mobilnih elemenata koji su u normalno stanju izrazito hipermetilirani i utišani. Također, hipometilacija ponavljajućih sljedova DNA, primjerice satelitne DNA u pericentromernom području povezana je s kromosomskim rearanžmanima i aneuploidijom. Osim globalne hipometilacije, tumorske stanice karakterizira i hipermetilacija CpG otoka promotorskih regija specifičnih gena uključenih u različite stanične puteve, poput popravka DNA, apoptoze, angiogeneze, regulacije staničnog ciklusa itd. (112). Povećana razina metilacije CpG otoka kandidat gena u tumorskim stanicama prvi put je zabilježena još 1986. godine u radu Baylin i sur. (113), no njezin značaj u kancerogenezi nije bio objašnjiv zbog nedostatka adekvatnih metoda analize. Pionirskim radom Bird-a i suradnika objavljenim 1990. godine je povezana učestala inaktivacija gena u tumorskim staničnim linijama s metilacijom CpG otoka (114). Unatoč brojnim studijama koja su ustanovila povezanost hipermetilacije CpG otoka promotora specifičnih gena s utišanim stanjem kandidat gena u raku, postavlja se pitanje na koji način određeni geni postaju meta za utišavanje hipermetilacijom. Jedna od hipoteza objašnjava da do toga dolazi zbog slučajne metilacije po genomu uslijed poremećene funkcije DNA metilacijske mašinerije, te da bi se na taj način mogli metilirati promotori tumor supresor gena što bi rezultiralo selektivnom prednošću zahvaćene stanice i njezinom klonalno ekspanzijom koja bi vodila do progresije tumora (115).

Cilj ovog istraživanja je bio utvrditi postoji li statistički značajna promjena metilacije pojedinih CpG dinukleotida unutar CpG otoka kandidat gena *MGMT* i *RASSF1A* iz uzoraka pune periferne krvi pacijenta s karcinomom testisa, u odnosu na zdrave osobe. Dobiveni rezultati analize metilacije metodom bisulfitnog pirosekvenciranja za *RASSF1A* pokazuju statistički značajnu promjenu u metilaciji CpG dinukleotida. Pet CpG dinukleotida od ukupno devet analiziranih pokazuju značajnu hipermetilaciju u uzorcima pacijenata prije tretmana kemoterapijom u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu. Jedno CpG mjesto pokazuje značajnu

hipermetilaciju u uzorcima pacijenata prije tretmana kemoterapijom u odnosu na uzorke pacijenata poslije tretmana. Dobiveni rezultati za *MGMT* nisu pokazali statistički značajnu promjenu u metilaciji niti jednog CpG dinukleotida od ukupno sedam analiziranih. Budući da se histopatološke skupine TGCT-a razlikuju po obrascu metilacije kako globalno tako i na razini CpG otoka – seminomi pokazuju nižu razinu metilacije, a ne seminomi višu – dobiveni rezultati podijele prema histopatološkim podskupinama TGCT-a pokazuju statistički značajnu metilaciju pojedinih CpG dinukleotida. Podskupina seminoma za *RASSF1A* pokazuje statistički značajnu hipermetiliranost uzoraka pacijenata prije kemoterapije u odnosu na zdrave kontrole u jednom CpG dinukleotidu. Suprotno tome, podskupina ne seminoma pokazuje statistički značajnu hipermetiliranost četiri CpG dinukleotida uzoraka pacijenata prije kemoterapije u odnosu na zdrave kontrole, te hipometiliranost u jednom CpG uzoraka pacijenata prije kemoterapije u odnosu na uzorke pacijenata poslije kemoterapije. Iako za gen *MGMT* nije pokazana statistički značajna promjena niti jednog CpG dinukleotida u analiziranim uzorcima, nakon podijele prema histopatološkim skupinama pokazala se statistički značajna hipermetilacija samo kod podskupine seminoma i to u dva CpG dinukleotida uzoraka pacijenata prije kemoterapije u odnosu na zdrave kontrole, te statistički značajna hipermetilacija uzoraka pacijenata prije kemoterapije u odnosu na poslije kemoterapije. Dobiveni rezultati za gen *RASSF1A* ukazuju na veću hipermetiliranost kod ne seminoma za razliku od seminoma što se slaže s rezultatima drugih autora. Koul i sur. (116) koristeći MSP metodu (engl. *Methylation-specific PCR*) pokazali su hipermetiliranost CpG otoka *RASSF1A* u gotovo svim analiziranim uzorcima ne seminoma, dok je samo jedan uzorak seminoma bio hipermetiliran. Nadalje, slične rezultate su pokazali i Honorio i sur. koji su analizirali metilaciju promotora gena *RASSF1A* (108). Oba istraživanja su pokazala i hipermetiliranost promotora gena *MGMT* i to samo kod uzoraka ne seminoma. U ovom istraživanju gen *MGMT* nije pokazao statistički značajnu hipermetiliranost kod ne seminoma, stoga se ne slaže s rezultatima drugih autora. Razlog tomu može biti korištenje različitih metoda za analizu metilacije. Metodom bisulfitnog pirosekvenciranja se dobije postotak metilacije određenog CpG mjesta koji pokazuje prosječno stanje metilacije svih umnoženih epialela (amplikona) dobivenih nakon PCR reakcije. Dobiveni rezultati su pouzdani i kvantitativni, stoga predstavlja osjetljiviju metodu analize metilacije od MSP kojom se dobije kvalitativna informacija je li analizirani fragment metiliran ili ne, te ne može razlučiti pozadinsku metilaciju (117). Unatoč vrlo čestoj upotrebi MSP kao metode analize metilacije DNA, u slučaju metilacije promotora gena *MGMT* može pokazati nepouzdan rezultate, jer je za lokus *MGMT* karakteristična heterogena metilacija zbog postojanja multiplih epialela, te je

za njegovu analizu primjerenija metoda bisulfitnog pirosekvenciranja koja ih može točnije detektirati (118). Također, MSP-om su analizirani veći fragmenti promotora i CpG otoka gena *MGMT* koji ukupno mogu dati drugačije rezultate metilacije, za razliku od ograničene veličine analiziranih fragmenata pirosekvenciranjem koji uključuju tek nekoliko CpG dinukleotida. Tome u prilog idu i objavljene studije temeljene na cjelogenomskim analizama koje su ukazale na postojanje tzv. CpG obala koje se nalaze na rubovima CpG otoka u području siromašnijem CpG dinukleotidima. Iako se smatra da se regulacijska uloga ekspresije gena postiže metilacijom unutar CpG otoka, ove studije ukazuju da je za regulaciju ekspresije bitna i metilacija na rubovima CpG otoka (57). Koul i sur. su također napravili i korelacijsku analizu između metiliranosti gena *MGMT* i *RASSF1A* i njihove ekspresije. Pokazana je smanjena ekspresija u oba gena. Također primjetili su da je smanjena ekspresija gena *MGMT* i kod gotovo svih uzoraka TGCT-a koji nisu bili metilirani, što potencijalno može ukazivati na regulaciju ekspresije gena *MGMT* putem nekih drugih epigenetičkih mehanizama, ali i na regulaciju kroz udaljene pojačivače (engl. *Enhancers*) koji rade omče i na taj način se dovode u neposrednu blizinu promotora. U sklopu ovog istraživanja nije napravljena analiza ekspresije, stoga ne znamo utječe li metilacija na ekspresiju analiziranih gena. U pravilu, hipermetilacijom CpG otoka bi trebalo doći do utišavanja ekspresije gena, što bi za *RASSF1A* značilo smanjenu ekspresiju u pacijenata prije kemoterapije u odnosu na zdravu kontrolu. Iako je uočena statistički značajna promjena u metilaciji *RASSF1A* relativno mala, pojedini CpG dinukleotidi *RASSF1A* koji su pokazali statističku promjenu hipermetilacije u uzorcima pacijenata u odnosu na zdrave kontrole potencijalno mogu predstavljati metilacijski status cijelog područja, te kao takvi poslužiti kao dijagnostički biljezi za rano otkrivanje karcinoma testisa. Treba također uzeti i u obzir da je analizirana metilacija DNA izolirane iz pune periferne krvi u kojoj se nalaze različiti stanični tipovi. Poznato je da različiti tipovi stanica iz krvi pokazuju različite obrasce metilacije DNA (119) stoga je upitno koliko su oni odraz obrascu metilacije iz tumorskog tkiva. Moguće je dodatno razdvojiti pojedine krvne stanične populacije pomoću protočne citometrije, ali to nije najpraktičnije rješenje jer je za stanično sortiranje potrebna velika količina krvi te se većinom u istraživanju metilacije DNA u bolestima analizira ukupna populacija krvnih stanica (120). Aberantna metilacija *RASSF1A* je detektirana u tjelesnim tekućinama brojnih različitih karcinoma, te predstavlja dobar dijagnostički i prognostički biljeg za karcinom (105). U prilog tomu ide i objavljeni rad Ellinger i sur. (121) koji su prvi analizirali metilaciju slobodne DNA otpuštene iz cirkulirajućih stanica karcinoma testisa. Analizirali su metilacijski status CpG

otoka nekoliko gena koji su povezani s karcinogenezom TC-a, između ostalog i *RASSF1A* koji je pokazao statistički značajnu hipermetilaciju u odnosu na zdrave kontrole.

Budući da se metilacija DNA gena *MGMT* i *RASSF1A* pokazala osim kao dobar dijagnostički i prognostički biljeg u brojnim tumorima, može dati dodatan uvid i u ishod i učinkovitost tretmana, te time služiti kao dobar biljeg odgovora pacijenata na tretman kemoterapijom. Stanice karcinoma testisa su izrazito osjetljive na cisplatin kombiniranu kemoterapiju (cisplatin – etopozid – bleomicin), zbog čega je izlječivost od karcinoma testisa vrlo visoka. Ako je TC dijagnosticiran vrlo rano u razvoju njegova izlječivost je puno bolja nego ako se dijagnostira u kasnim, uznapredovalim stadijima. Također, svega mali broj slučajeva pacijenata je rezistentno na kemoterapiju ili postane rezistentno nakon tretmana (122). Koul i sur. su pokazali da postoji razlika u metilaciji promotora gena *MGMT* i *RASSF1A* u uzorcima karcinoma testisa osjetljivim na cisplatin kemoterapiju i rezistentnim na cisplatin kemoterapiju. Pokazali su da je hipermetilacija promotora gena *RASSF1A* povezana s rezistentnošću, dok hipermetilacija promotora gena *MGMT* povezana s osjetljivošću stanica karcinoma testisa na cisplatin kemoterapiju (123). U ovom istraživanju je samo za gen *RASSF1A* jedno CpG mjesto pokazalo statistički značajnu hipermetiliranost u uzorcima pacijenata prije kemoterapije u odnosu na uzorke pacijenata poslije kemoterapije.

Za utvrđivanje značaja promjena metilacije CpG dinukleotida u genima *MGMT* i *RASSF1A*, te njihovog značaja kao potencijalnih dijagnostičkih i prognostičkih biljega za ranu detekciju karcinoma testisa iz periferne krvi potrebna su dodatna istraživanja na većem broju uzoraka, te je potrebno analizirati metilaciju na više fragmenata unutar promotora ovih gena kako bi se povećala rezolucija slike metiliranosti promotora.

5. ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem su dobiveni rezultati koji idu u prilog potencijalnoj ulozi metilacije DNA u razvoju karcinoma testisa. Analizom stupnja metilacije pojedinih CpG dinukleotida unutar fragmenta gena *RASSF1A* i *MGMT* je pokazana statistički značajnom samo u slučaju *RASSF1A*. Otkrivena je statistički značajna hipermetilacija pet CpG dinukleotida od devet analiziranih u fragmentu gena *RASSF1A* uzoraka pacijenata prije kemoterapije u odnosu na kontrolu. Dodatnom podjelom na histopatološke skupine TGCT-a pokazane su statistički značajne razlike u metilaciji pojedinih CpG dinukleotida. U genu *RASSF1A* je pokazana veća hipermetiliranost pojedinih CpG kod neseminoma nego kod seminoma, što se slaže s rezultatima drugih autora. U genu *RASSF1A* je pokazana također i statistički značajna hipermetiliranost jednog CpG dinukleotida uzoraka pacijenata prije kemoterapije u odnosu na poslije kemoterapije. Budući da su otkrivene statistički značajne razlike u metilaciji CpG dinukleotida između pacijenata i zdravih osoba na relativno malom broju uzoraka, potrebna su istraživanja na većem broju uzoraka i određivanje metilacije na većem broju CpG dinukleotida, kako bi se utvrdio pravi značaj promjene metilacije CpG dinukleotida u genima *MGMT* i *RASSF1A*, te njihovog značaja kao potencijalnih dijagnostičkih i prognostičkih biljega za ranu detekciju karcinoma testisa iz periferne krvi.

6. LITERATURA

1. Manecksha RP, Fitzpatrick JM. Epidemiology of testicular cancer. *BJU Int* [Internet]. 2009;104(9 Pt B):1329–33.
2. Reuter VE. Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors. *Mod Pathol*. 2005;18 Suppl 2:S51–60.
3. Huyghe E, Matsuda T, Thonneau P. Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *J Urol* [Internet]. 2003;170(1):5–11.
4. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Jemal A, Bray F. International variations and trends in testicular cancer incidence and mortality. *Eur Urol* [Internet]. 2014;65(6):1095–106.
5. McGlynn K a, Devesa SS, Sigurdson AJ, Brown LM, Tsao L, Tarone RE. Trends in the incidence of testicular germ cell tumors in the United States. *Cancer* [Internet]. 2003;97(1):63–70.
6. Ferlay J, Shin H, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin D. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010.
7. Le Cornet C, Lortet-Tieulent J, Forman D, Béranger R, Flechon A, Fervers B, et al. Testicular cancer incidence to rise by 25% by 2025 in Europe? Model-based predictions in 40 countries using population-based registry data. *Eur J Cancer*. 2014;50(4):831–9.
8. Bray F, Richiardi L, Ekbom A, Pukkala E, Cuninkova M, Møller H. Trends in testicular cancer incidence and mortality in 22 European countries: Continuing increases in incidence and declines in mortality. *Int J Cancer*. 2006;118(12):3099–111.
9. Hanna NH, Einhorn LH. Testicular Cancer - Discoveries and Updates. *N Engl J Med* [Internet]. 2014;371(21):2005–16.
10. Vasdev N, Moon A, Thorpe AC. Classification, epidemiology and therapies for testicular germ cell tumours. *Int J Dev Biol*. 2013;57(2-4):133–9.
11. Ziglioli F, Maestroni U, Dinale F, Ciuffreda M, Cortellini P. Carcinoma in situ (CIS) of the testis. *Acta Biomed*. 2011;82(2):162–9.
12. Høie-Hansen CE, Rajpert-De Meyts E, Daugaard G, Skakkebaek NE. Carcinoma in situ testis, the progenitor of testicular germ cell tumours: A clinical review. *Ann Oncol*. 2005;16(6):863–8.
13. Rorth M, Rajpert-De Meyts E, Andersson L, Dieckmann KP, Fossa SD, Grigor KM, et al. Carcinoma in situ in the testis. *Scand J Urol Nephrol Suppl*. 2000;(205):166–86.
14. Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Giwercman A, Muller J. Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl*. 1987;10(1):19–28.
15. Sonne SB, Almstrup K, Dalgaard M, Juncker AS, Edsgard D, Ruban L, et al. Analysis of gene expression profiles of microdissected cell populations indicates that testicular carcinoma in situ is an arrested gonocyte. *Cancer Res*. 2009;69(12):5241–50.
16. Aschim EL, Haugen TB, Tretli S, Daltveit a K, Grotmol T. Risk factors for testicular cancer--differences between pure non-seminoma and mixed seminoma/non-seminoma? *Int J Androl* [Internet]. 2006;29(4):458–67.
17. Sperger JM, Chen X, Draper JS, Antosiewicz JE, Chon CH, Jones SB, et al. Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(23):13350–5.
18. Rajpert-De Meyts E. Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: Genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update*. 2006;12(3):303–23.
19. Almstrup K, Høie-Hansen CE, Wirkner U, Blake J, Schwager C, Ansorge W, et al. Embryonic stem cell-like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-

- wide gene expression profiling. *Cancer Res.* 2004;64(14):4736–43.
20. Andrews PW, Matin MM, Bahrami a R, Damjanov I, Gokhale P, Draper JS. Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochem Soc Trans.* 2005;33:1526–30.
 21. Sheikine Y, Genega E, Melamed J, Lee P, Reuter VE, Ye H. Molecular genetics of testicular germ cell tumors. *Am J Cancer Res [Internet].* 2012;2(2):153–67.
 22. Skotheim RI, Lind GE, Monni O, Nesland JM, Abeler VM, Fosså SD, et al. Differentiation of human embryonal carcinomas in vitro and in vivo reveals expression profiles relevant to normal development. *Cancer Res.* 2005;65(I):5588–98.
 23. Chaganti RS, Houldsworth J. Genetics and biology of adult human male germ cell tumors. *Cancer Res [Internet].* 2000;60(6):1475–82.
 24. Vega A, Baptissart M, Caira F, Brugnion F, Lobaccaro JM a, Volle DH. Epigenetic: A molecular link between testicular cancer and environmental exposures. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3(NOV):1–12.
 25. Looijenga LHJ, Van Agthoven T, Biermann K. Development of malignant germ cells—the genvironmental hypothesis. *Int J Dev Biol.* 2013;57(2-4):241–53.
 26. Silván U, Díez-Torre A, Moreno P, Arluzea J, Andrade R, Silió M, et al. The spermatogonial stem cell niche in testicular germ cell tumors. *Int J Dev Biol [Internet].* 2013;57(2-4):185–95.
 27. Díez-Torre A, Silván U, Díaz-Núñez M, Aréchaga J. The role of microenvironment in testicular germ cell tumors. *Cancer Biol & Ther [Internet].* 2010;10(6):529–36.
 28. Sikka SC, Wang R. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. *Asian J Androl [Internet].* 2008;10(1):134–45.
 29. Giannandrea F, Gandini L, Paoli D, Turci R, Figà-Talamanca I. Pesticide exposure and serum organochlorine residuals among testicular cancer patients and healthy controls. *J Environ Sci Health B [Internet].* 2011;46(8):780–7.
 30. Henderson BE, Benton B, Jing J, Yu MC, Pike MC. Risk factors for cancer of the testis in young men. *Int J Cancer [Internet].* 1979;23(5):598–602.
 31. Ramlau-Hansen CH, Olesen AV, Parner ET, Sørensen HT, Olsen J. Perinatal markers of estrogen exposure and risk of testicular cancer: follow-up of 1,333,873 Danish males born between 1950 and 2002. *Cancer Causes Control [Internet].* 2009;20(9):1587–92.
 32. Ekbom A, Richiardi L, Akre O, Montgomery SM, Sørensen P. Age at Immigration and Duration of Stay in Relation to Risk for Testicular Cancer Among Finnish Immigrants in Sweden. *JNCI J Natl Cancer Inst [Internet].* 2003;95(16):1238–40.
 33. Montgomery SM, Granath F, Ehlin A, Sparén P, Ekbom A. Germ-cell testicular cancer in offspring of Finnish immigrants to Sweden. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev [Internet].* 2005;14(1):280–2.
 34. Hemminki K, Li X. Cancer risks in Nordic immigrants and their offspring in Sweden. *Eur J Cancer [Internet].* 2002;38:2428–34.
 35. Garner MJ, Turner MC, Ghadirian P, Krewski D. Epidemiology of testicular cancer: an overview. *Int J Cancer [Internet].* 2005;116(3):331–9.
 36. Greene MH, Kratz CP, Mai PL, Mueller C, Peters J a., Bratslavsky G, et al. Familial testicular germ cell tumors in adults: 2010 summary of genetic risk factors and clinical phenotype. *Endocr Relat Cancer.* 2010;17(2):109–21.
 37. Richiardi L, Pettersson A, Akre O. Genetic and environmental risk factors for testicular cancer. *Int J Androl.* 2007;30(4):230–40.
 38. Prener a, Engholm G, Jensen OM. Genital anomalies and risk for testicular cancer in Danish men. [Internet]. *Epidemiology (Cambridge, Mass.).* 1996. p. 14–9.
 39. Dieckmann K-P, Pichlmeier U. Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors. *World J Urol [Internet].* 2004;22(1):2–14.

40. Skotheim RI, Lothe RA. The testicular germ cell tumour genome. *APMIS* [Internet]. 2003;111(1):136–51.
41. Fosså SD, Nesland JM, Pettersen EO, Amellem O, Waehre H, Heimdal K. DNA ploidy in primary testicular cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 1991;64(5):948–52.
42. Houldsworth J, Reuter V, Bosl GJ, Chaganti RS. Aberrant expression of cyclin D2 is an early event in human male germ cell tumorigenesis. *Cell Growth Differ* [Internet]. 1997;8(1044-9523 (Print)):293–9.
43. Roelofs H, Mostert MC, Pompe K, Zafarana G, van Oorschot M, van Gurp RJ, et al. Restricted 12p amplification and RAS mutation in human germ cell tumors of the adult testis. *Am J Pathol* [Internet]. 2000;157(4):1155–66.
44. Clark AT, Rodriguez RT, Bodnar MS, Abeyta MJ, Cedars MI, Turek PJ, et al. Human STELLAR, NANOG, and GDF3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p13, a hotspot for teratocarcinoma. *Stem Cells*. 2004;22(2):169–79.
45. Looijenga LHJ, Zafarana G, Grygalewicz B, Summersgill B, Debiec-Rychter M, Veltman J, et al. Role of gain of 12p in germ cell tumour development. *APMIS* [Internet]. 2003;111(1):161–71; discussion 172–3.
46. Olie R a, Looijenga LH, Boerrigter L, Top B, Rodenhuis S, Langeveld a, et al. N- and KRAS mutations in primary testicular germ cell tumors: incidence and possible biological implications. *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. 1995;12(2):110–6.
47. Smith-Sørensen B, Lind GE, Skotheim RI, Fosså SD, Fodstad Ø, Stenwig a-E, et al. Frequent promoter hypermethylation of the O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) gene in testicular cancer. *Oncogene* [Internet]. 2002;21(57):8878–84.
48. Lutke Holzik MF, Rapley EA, Hoekstra HJ, Sleijfer DT, Nolte IM, Sijmons RH. Genetic predisposition to testicular germ-cell tumours. *Lancet Oncol*. 2004;5:363–71.
49. Crockford GP, Linger R, Hockley S, Dudakia D, Johnson L, Huddart R, et al. Genome-wide linkage screen for testicular germ cell tumour susceptibility loci. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2006;15(3):443–51.
50. Kanetsky P a, Mitra N, Vardhanabhuti S, Li M, David J, Letrero R, et al. Common variation in KITLG and at 5q31.3 proximate to SPRY4 predispose to testicular germ cell cancer. *Nat Genet* [Internet]. 2009;41(7):811–5.
51. Rapley E a, Turnbull C, Al Olama AA, Dermitzakis ET, Linger R, Huddart R a, et al. A genome-wide association study of testicular germ cell tumor. *Nat Genet* [Internet]. 2009;41(7):807–10.
52. Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet*. 2005;14(SPEC. ISS. 1):47–58.
53. Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2012;13(2):97–109.
54. Skinner MK. Environmental epigenetic transgenerational inheritance and somatic epigenetic mitotic stability. *Epigenetics*. 2011;6(7):838–42.
55. del Mazo J, García-López J, Weber M. Epigenetic traits of testicular cancer: from primordial germ cells to germ cell tumors. *Epigenomics* [Internet]. 2014;6(3):253–5.
56. Kristensen DG, Skakkebak NE, Rajpert-De Meyts E, Almstrup K. Epigenetic features of testicular germ cell tumours in relation to epigenetic characteristics of foetal germ cells. *Int J Dev Biol*. 2013;57(2-4):309–17.
57. Van Der Zwan YG, Stoop H, Rossello F, White SJ, Looijenga LHJ. Role of epigenetics in the etiology of germ cell cancer. *Int J Dev Biol*. 2013;57(2-4):299–308.
58. Lind GE, Skotheim RI, Lothe R a. The epigenome of testicular germ cell tumors. *APMIS* [Internet]. 2007;115(10):1147–60.
59. Brait M, Maldonado L, Begum S, Loyo M, Wehle D, Tavora FF, et al. DNA

- methylation profiles delineate epigenetic heterogeneity in seminoma and non-seminoma. *Br J Cancer* [Internet]. 2012;106(2):414–23.
60. Almstrup K, Høje-Hansen CE, Nielsen JE, Wirkner U, Ansorge W, Skakkebaek NE, et al. Genome-wide gene expression profiling of testicular carcinoma in situ progression into overt tumours. *Br J Cancer*. 2005;92:1934–41.
 61. Manton KJ, Douglas ML, Netzel-Arnett S, Fitzpatrick DR, Nicol DL, Boyd a W, et al. Hypermethylation of the 5' CpG island of the gene encoding the serine protease Testisin promotes its loss in testicular tumorigenesis. *Br J Cancer* [Internet]. 2005;92(4):760–9.
 62. Lind GE, Skotheim RI, Fraga MF, Abeler VM, Esteller M, Lothe RA. Novel epigenetically deregulated genes in testicular cancer include homeobox genes and SCGB3A1 (HIN-1). *J Pathol*. 2006;210(4):441–9.
 63. Ferreira HJ, Heyn H, Muro XG del, Vidal A, Larriba S, Muñoz C, et al. Epigenetic loss of the piwi/pirna machinery in human testicular tumorigenesis. *Epigenetics*. 2014;9(1):113–8.
 64. Nettersheim D, Biermann K, Gillis AJM, Steger K, Looijenga LHJ, Schorle H. NANOG promoter methylation and expression correlation during normal and malignant human germ cell development. *Epigenetics*. 2011;6(1):114–22.
 65. Crick F. Central dogma of molecular biology. *Nature*. 1970;227(5258):561–3.
 66. Allis DC, Jenuwein T, Reinberg D. Chapter 3: Overview and Concepts. *Epigenetics*. 2007;23–40.
 67. Geiman TM, Muegge K. DNA methylation in early development. *Molecular Reproduction and Development*. 2010. p. 105–13.
 68. Tollefsbol TO. Epigenetics: The new science of genetics. In: *Handbook of Epigenetics*. 2011. p. 1–6.
 69. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell*. 2007. p. 635–8.
 70. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2005;6(8):597–610.
 71. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development*. 2002. p. 6–21.
 72. Jones P a, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*. 2001;293(5532):1068–70.
 73. Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Robertson KD. DNA methylation in development and human disease. *Mutat Res* [Internet]. 2008;647(1-2):30–8.
 74. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*. 2000;9(16):2395–402.
 75. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, Mccune RA, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Res*. 1982;10(8):2709–21.
 76. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2008;9(6):465–76.
 77. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The Mammalian Epigenome. *Cell*. 2007. p. 669–81.
 78. Watt F, Molloy PL. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev*. 1988;2(9):1136–43.
 79. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* [Internet]. 1998;393(6683):386–9.

80. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2009;10(5):295–304.
81. Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, Holtan N, Hanigan CL, Duan H, et al. Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nat Genet* [Internet]. 2002;31(2):175–9.
82. Jones P a, Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2009;10(11):805–11.
83. De Carvalho DD, You JS, Jones PA. DNA methylation and cellular reprogramming. *Trends in Cell Biology*. 2010. p. 609–17.
84. Sulewska A, Niklinska W, Kozlowski M, Minarowski L, Naumnik W, Niklinski J, et al. DNA methylation in states of cell physiology and pathology. *Folia Histochem Cytobiol* [Internet]. 2007;45(3):149–58.
85. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99(3):247–57.
86. Chen Z, Riggs AD. DNA methylation and demethylation in mammals. *J Biol Chem* [Internet]. 2011;286(21):18347–53.
87. Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* [Internet]. 2013;502(7472):472–9.
88. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2009. p. 27–36.
89. Iacobuzio-Donahue C a. Epigenetic Changes in Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis* [Internet]. 2009;4(1):229–49.
90. Shivapurkar N, Gazdar a F. DNA methylation based biomarkers in non-invasive cancer screening. *Curr Mol Med*. 2010;10(2):123–32.
91. Li L, Choi J-Y, Lee K-M, Sung H, Park SK, Oze I, et al. DNA Methylation in Peripheral Blood: A Potential Biomarker for Cancer Molecular Epidemiology. *J Epidemiol*. 2012;22(5):384–94.
92. Gerson SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(4):296–307.
93. Harris LC, Potter PM, Tano K, Shiota S, Mitra S, Brent TP. Characterization of the promoter region of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1991;19(22):6163–7.
94. Olsson M, Lindahl T. Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*. Methyl group transfer from O6-methylguanine to a protein cysteine residue. *J Biol Chem*. 1980;255(22):10569–71.
95. Srivenugopal KS, Yuan X, Friedman HS, Ali-osman F. Ubiquitination-Dependent Proteolysis of O 6 -Methylguanine-DNA Methyltransferase in Human and Murine Tumor Cells following Inactivation with O 6 -Benzylguanine. *Biochemistry*. 1996;35:1328–34.
96. Coulondre C, Miller JH. Genetic studies of the lac repressor. III. Additional correlation of mutational sites with specific amino acid residues. *J Mol Biol*. 1977;117(3):525–67.
97. Jacinto F V., Esteller M. MGMT hypermethylation: A prognostic foe, a predictive friend. *DNA Repair (Amst)*. 2007;6(8):1155–60.
98. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Advances in Brief Inactivation of the DNA Repair Gene O 6 - Methylguanine-DNA Methyltransferase by Promoter Hypermethylation is a Common Event in Primary Human Neoplasia 1. *Cancer Res*. 1999;793–7.
99. Zuo C, Ai L, Ratliff P, Suen JY, Hanna E, Brent TP, et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene: epigenetic silencing and prognostic value in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(June):967–75.

100. Soejima H, Zhao W, Mukai T. Epigenetic silencing of the MGMT gene in cancer. *Biochem Cell Biol* [Internet]. 2005;83(4):429–37.
101. Donniger H, Vos MD, Clark GJ. The RASSF1A tumor suppressor. *J Cell Sci* [Internet]. 2007;120(Pt 18):3163–72.
102. Amin KS, Banerjee PP. The cellular functions of RASSF1A and its inactivation in prostate cancer. *J Carcinog* [Internet]. 2012;11:3.
103. Dammann R, Schagdarsurengin U, Strunnikova M, Rastetter M, Seidel C, Liu L, et al. Epigenetic inactivation of the Ras-association domain family 1 (RASSF1A) gene and its function in human carcinogenesis. *Histology and Histopathology*. 2003. p. 665–77.
104. Gordon M, Baksh S. RASSF1A: Not a prototypical Ras effector. *Small GTPases* [Internet]. 2011;2(3):148–57.
105. Dammann R, Schagdarsurengin U, Seidel C, Strunnikova M, Rastetter M, Baier K, et al. The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: An update. *Histol Histopathol*. 2005;20:645–63.
106. Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet*. 2000;25(3):315–9.
107. Hesson LB, Cooper WN, Latif F. The role of RASSF1A methylation in cancer. *Dis Markers*. 2007;23(1-2):73–87.
108. Honorio S, Agathangelou A, Wernert N, Rothe M, Maher ER, Latif F. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene in testicular tumours and distinct methylation profiles of seminoma and nonseminoma testicular germ cell tumours. *Oncogene* [Internet]. 2003;22(3):461–6.
109. Pasquali L, Bedeir A, Ringquist S, Styche A, Bhargava R, Trucco G. Quantification of CpG island methylation in progressive breast lesions from normal to invasive carcinoma. *Cancer Lett* [Internet]. 2007;257(1):136–44.
110. Pixberg C, Schulz W, Stoecklein N, Neves R. Characterization of DNA Methylation in Circulating Tumor Cells. *Genes (Basel)* [Internet]. 2015;6(4):1053–75.
111. Technologies A. February 2013 PyroMark ® Q24 Advanced User Manual Sample & Assay Technologies. 2013;(February).
112. Berdasco M, Esteller M. Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. *Developmental Cell*. 2010. p. 698–711.
113. Baylin SB, Höppener JW, de Bustros A, Steenbergh PH, Lips CJ, Nelkin BD. DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. *Cancer Res* [Internet]. 1986;46(6):2917–22.
114. Antequera F, Boyes J, Bird A. High levels of De Novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell*. 1990;62(3):503–14.
115. McCabe MT, Brandes JC, Vertino PM. Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2009;15(12):3927–37.
116. Koul S, Houldsworth J, Mansukhani MM, Donadio A, McKiernan JM, Reuter VE, et al. Characteristic promoter hypermethylation signatures in male germ cell tumors. *Mol Cancer*. 2002;1:8.
117. Mikeska T, Bock C, Do H, Dobrovic A. DNA methylation biomarkers in cancer: progress towards clinical implementation. *Expert Rev Mol Diagn*. 2012;12(5):473–87.
118. Mikeska T, Candiloro IL, Dobrovic A. The implications of heterogeneous DNA methylation for the accurate quantification of methylation. *Epigenomics*. 2010;2(4):561–73.
119. Reinius LE, Acevedo N, Joerink M, Pershagen G, Dahlén S-E, Greco D, et al. Differential DNA methylation in purified human blood cells: implications for cell

- lineage and studies on disease susceptibility. *PLoS One* [Internet]. 2012;7(7):e41361.
120. Mikeska T, Craig JM. DNA methylation biomarkers: cancer and beyond. *Genes (Basel)* [Internet]. 2014;5(3):821–64.
 121. Ellinger J, Albers P, Perabo FG, Müller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. CpG island hypermethylation of cell-free circulating serum DNA in patients with testicular cancer. *J Urol* [Internet]. American Urological Association; 2009;182(1):324–9.
 122. Peckham MJ, Barrett a, Liew KH, Horwich a, Robinson B, Dobbs HJ, et al. The treatment of metastatic germ-cell testicular tumours with bleomycin, etoposide and cisplatin (BEP). *Br J Cancer*. 1983;47(5):613–9.
 123. Koul S, McKiernan JM, Narayan G, Houldsworth J, Bacik J, Dobrzynski DL, et al. Role of promoter hypermethylation in Cisplatin treatment response of male germ cell tumors. *Mol Cancer* [Internet]. 2004;3:16.

7. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Marina Srbić

Datum i mjesto rođenja: 9. rujna 1990., Virovitica

Obrazovanje:

- 2005. – 2009. Opća gimnazija, srednja škola Marka Marulića, Slatina
- 2009. – 2012. Preddiplomski studij biologije, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- 2012. – 2016. Diplomski studij molekularne biologije, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Iskustvo:

- ožujak – lipanj 2015. Erasmus + stručna praksa, Institut za biomedicinska istraživanja Bellvitge u Barceloni, Španjolska
- travanj – prosinac 2014. Laboratorijska stručna praksa, Laboratorij za epigenetiku na Zavodu za molekularnu biologiju, PMF Zagreb

Ostalo:

- Simpozij "Time – how nature sets the clock" (Vienna Biocenter, Beč, 11.2013.)
- Projektna radionica "Postgenomic era of molecular biology Proteomics era I" (Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 9. – 11. Prosinca 2015.)
- Član Udruge studenata biologije – BIUS

Osobne vještine:

- hrvatski (materinski), engleski (C1), francuski (A2), španjolski (A1)
- Windows i MacOS
- vozačka dozvola B kategorije