Utjecaj epigenetički aktivnih tvari na rast i razvoj eksperimentalnog tumora zametnih stanica miša in vitro

Buljubašić, Robert

Doctoral thesis / Disertacija

2020

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:675814

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Robert Buljubašić

UTJECAJ EPIGENETIČKI AKTIVNIH TVARI NA RAST I RAZVOJ EKSPERIMENTALNOG TUMORA ZAMETNIH STANICA MIŠA IN VITRO

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020.



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Robert Buljubašić

UTJECAJ EPIGENETIČKI AKTIVNIH TVARI NA RAST I RAZVOJ EKSPERIMENTALNOG TUMORA ZAMETNIH STANICA MIŠA IN VITRO

DOKTORSKI RAD

Mentor:
izv. prof. dr. sc. Nino Sinčić, dr. med.

Zagreb, 2020.



University of Zagreb

Faculty of Science

Robert Buljubašić

IMPACT OF EPIGENETIC AGENTS ON GROWTH AND DEVELOMPENT OF EXPERIMENTAL MOUSE GERM CELL TUMOUR IN VITRO

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
associate professor Nino Sinčić, MD, PhD

Zagreb, 2020.

Ovaj doktorski rad izrađen je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Nina Sinčića, dr. med., u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija Biologija pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Životopis mentora

Nino Sinčić rođen je 1981. godine u Puli (RH). Diplomirao je 2005. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (MEF UniZg). Od 2006. godine radi na Zavodu za medicinsku biologiju MEF UniZg u statusu asistenta. Godine 2012. stekao je akademski stupanj doktora znanosti iz područja Biomedicine i zdravstva, polje Temeljne medicinske znanosti, grana Citologija, histologija, embriologija. Godine 2012. zaposlen je u svojstvu višeg asistenta, 2013. stekao je stupanj znanstvenog suradnika, 2015. docenta, 2018. višeg znanstvenog suradnika, a 2020. izvanrednog profesora. Nastavnik je na Integriranom preddiplomskom i diplomskom Studiju medicine, Medical studies in English, te Studiju dentalne medicine na hrvatskom i engleskom jeziku. Sudjeluje u doktorskom studiju "Biomedicina i zdravstvo" te "Neuroznanost" na MEF UniZg, te „Biologija novotvorina" na MEF Sveučilišta u Splitu. Sudjelovao je u organizaciji niza nacionalnih i međunarodnih tečajeva, radionica, okruglih stolova te znanstvenih kongresa. Mentor je niza doktoranada, diplomanata te kolega pri stručnom osposobljavanju i studentskoj praksi. Aktivno sudjeluje na znanstvenim projektima (od 2000. godine – 13 projekata, 6 u tijeku od kojih 1 međunarodni). Voditelj je HRZZ Uspostavnog istraživačkog projeka "Epigenetika raka prostate" (epiPro), UIP-2017-05-8138 (2018.-2023.), te voditelj Projektnog elementa Centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu (CERRM) KK.01.1.1.01.0008. (2017.-2022.). Suradnik je na ostalim elementima CERRM, te na HRZZ istraživačkom projektu „Epigenetički biomarkeri u krvi i ejakulatu bolesnika sa seminomom testisa" (epiSem), IP-2016-06-3692 (2017.-2021.), te Sveučilišnim potporama (2019.). Konzultant je na HRZZ istraživačkom projektu „Prevencija hipoglikemije u trudnica s dijabetesom tipa 1" (PRE-HYPO), IP-2018-01-1284 (2019.-2023.). Suradnik je na međunarodnom projektu "Identifying (epi)genetic profiles associated with epidemiological transition of colorectal cancer" (epiCRC) financiranog od strane IARC-WHO (2019.-nadalje). Od 2017. voditelj je znanstvene grupe za istraživanje epigenetičkih biomarkera (epiMark). Objavio je 25 znanstvenih članaka (14 CC, 9 SCI, 2 ostali) i 7 stručnih, 75 kongresnih priopćenja (5 CC, 4 SCI, 66 ostali), održao je 14 pozvanih predavanja, autor je poglavlja u 2 knjige te prijevoda u 2 udžbenika. Citiranost mu je bez autocitata WOS 229, Scopus 248, ResearchGate 264, h-index 7. Recenzent je za 4 znanstvena časopisa, Hrvatske zaklade za znanost (2019.) te Samantha Dickinson Brain Tumour Trust (UK, 2009.). Obnaša niz dužnosti na MEF UniZg, u nacionalnom društvo HDBMB te u međunarodnom društvo FEBS kao FEBS Education Ambassaddor za Republiku Hrvatsku (2018.-danas).

Zahvaljujem svom mentoru izv. prof. dr. sc. Ninu Sinčiću i ostalim kolegama sa Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na neizmjernoj podršci i pomoći u izradi ove disertacije. Posebnu zahvalu upućujem članovima povjerenstva prof. dr. sc. Floriani Bulić-Jakuš, prof. dr. sc. Vlatki Zoldoš i prof. dr. sc. Jerki Dumić na konstruktivnim savjetima tijekom pisanja disertacije. Zahvaljujem svim ostalim kolegama na strpljenju. Posebno zahvaljujem svojoj obitelji - bez vas ovaj se san ne bi ostvario!

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

UTJECAJ EPIGENETIČKI AKTIVNIH TVARI NA RAST I RAZVOJ EKSPERIMENTALNOG TUMORA ZAMETNIH STANICA MIŠA *IN VITRO*

ROBERT BULJUBAŠIĆ
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Tumori zametnih stanica (TZS) testisa najčešća su neplastična bolest mlađe muške populacije s trendom porasta incidencije u Republici Hrvatskoj. Čini se da su inicijacija i progresija TZS pod izravnim utjecajem okoliša koji često rezultiraju epigenetičkim promjenama. Epigenetičke promjene su reverzibilne, a mogu biti jatrogeno modulirane epigenetički aktivnim lijekovima. Cilj disertacije bio je proučiti učinak epigenetički aktivnih molekula iz grupe inhibitora DNA metilaza, histonskih deacetilaza i inhibitora RNA interferencijskih molekula kao što su redom 5-azacitidin, trihostatin A, valproat, esi*Oct3/4*, esi*Nanog* i esi*Trrap* na rast i razvoj eksperimentalnog TZS-a miša u posebnom *in vitro* modelu. Eksperimentalni TZS *in vitro* razvijeni su kultiviranjem gastrulirajućeg zametnog cilindra. Zametni cilindri bili su jednokratno tretirani dva sata po izolaciji te kultivirani u standardnim uvjetima na granici tekućine i zraka tijekom sedam dana. Tumorska su tkiva analizirana metodama otiska po Westernu, imunohistokemije, *digital droplet* PCR i pirosekvenciranja nakon bisulfitne konverzije DNA na biljege razvojnih procesa. Inhibitori 5-azacitidin, trihostatin A, valproat i esi*Oct3/4* izazvali su drastično smanjenje rasta i razvoja tumora potičući apoptozu, smanjujući populaciju matičnih stanica te inducirajući diferencijaciju. Zaključno, ovo istraživanje dokazalo je da epigenetički aktivne molekule utječu na proces tumorigeneze djelujući na ishodišne normalne stanice, ali da imaju i terapijski potencijal za primjenu u liječenju TZS.

(138 stranice, 54 slika, 12 tablica, 263 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: Tumori zametnih stanica, epigenetički inhibitori, 5-azacitidin, trihostatin-A, valproat, esiRNA

Mentor: izv. prof. dr. sc. Nino, Sinčić

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Floriana Bulić-Jakuš, Prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš, Prof. dr. sc. Jerka Dumić

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

IMPACT OF EPIGENETIC AGENTS ON GROWTH AND DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL MOUSE GERM CELL TUMOUR *IN VITRO*

ROBERT BULJUBAŠIĆ
School of Medicine University of Zagreb

Germ cell tumours (GCT) of testis are most common neoplasias in young male population with increasing incidence in Republic of Croatia. It seems that GCT initiation and progression directly depend on the environment and epigenetic alterations. Epigenetic alterations are reversible and can be iatrogenically modulated by epigenetically active drugs. The aim of this dissertation was to study epigenetically active molecules from the groups of DNA methyltransferase inhibitors, HDAC inhibitors and RNA interfering molecules such as 5-azacytidine, Trichostatin-A, Valproate, esi*Oct3/4*, esi*Nanog*, and esi*Trrap*, respectively, on the growth and development of experimental mouse GCT in a specific *in vitro* model where GCTs developed from the gastrulating mouse embryo cylinder. The embryo cylinders were subjected to a single treatment for two hours after isolation, and were cultivated in standard conditions at the air-liquid interface for seven days. Tumours were analysed by Western blot, immunohistochemistry, digital droplet PCR, and pyrosequencing. 5-azacytidine, Trichostatin-A, Valproate and esi*Oct3/4* caused drastic reduction in tumour growth and development by promoting apoptosis, reducing stem cell populations, and inducing differentiation. In conclusion, this study proved that epigenetically active substances influence the process of tumorigenesis though their action on the original source of the tumour, the normal embryo, and have the potential for use in the GCT therapy.

(138 pages, 54 figures, 12 tables, 263 references, original in Croatian)

Keywords: germ cell tumours, epigenetic inhibitors, 5-azacytidine, Trichostatin-A, Valproate, esiRNA

Supervisor: Assoc. prof. Nino Sinčić, MD, PhD

Reviewers: Prof. Floriana Bulić-Jakuš, MD. PhD, Prof. Vlatka Zoldoš, PhD, Prof. Jerka Dumić, PhD

Sadržaj

1 UVOD 1
1.1 Svrha rada 3
1.2 Cilj rada 3
1.3 Opseg rada 4
1.4 Metode 5
1.5 Hipoteza 6
2 LITERATURNI PREGLED 7
2.1 Tumori testisa 7
2.1.1 Testis 7
2.1.2 Epidemiologija i klasifikacija tumora testisa 10
2.1.3 Etiologija tumora testisa 13
2.1.4 Embriološka osnova razvoja tumora testisa 14
2.1.5 Genetička osnova razvoja tumora zametnih stanica testisa 15
2.1.6 Konvencionalna terapija tumora zametnih stanica testisa 16
2.2 Epigenetika 17
2.2.1 Metilacija DNA 18
2.2.2 Histonske modifikacije 21
2.2.3 RNA interferencija 23
2.3 Epigentika tumora testisa 25
2.4 Epigenetička terapija tumora zametnih stanica testisa 29
2.5 Epigenetički lijekovi 32
2.5.1 5-azacitidin 34
2.5.2 Trihostatin A 36
2.5.3 Valproat 38
2.5.4 esiRNA 40

2.6 Sustav kultiviranja zametka i model teratoma miša *in vitro* 42
3 EKSPERIMENTALNI DIO 46
3.1 Sinteza esiRNA 46
3.2 Kultura tumora zametnih stanica *in vitro* 48
3.2.1 Izolacija zametaka 48
3.2.2 Tretiranje zametaka 50
3.2.3 Kultiviranje zametka *in vitro* 52
3.3 Mjerenje rasta tumora u kulturi *in vitro* 53
3.4 Eksplantacija teratoma i klasična histologija 53
3.5 Analiza ekspresije gena na razini proteina metodom imunohistokemije i morfometrijsko mjerenje 54
3.5.1 Imunohistokemija 54
3.5.2 Morfometrija 55
3.6 Analiza ekspresije gena na razini proteina metodom otiska po Westernu..... 57
3.6.1 Referentni uzorak eksperimentalnog teratokarcinoma u miša *in vivo* 57
3.6.2 Homogenizacija tkiva 57
3.6.3 Mjerenje koncentracije proteina 58
3.6.4 SDS elektroforeza i metoda otiska po Westernu 59
3.7 Analiza ekspresije gena na razini mRNA 61
3.7.1 Homogenizacija tkiva…….61
3.7.2 Mjerenje koncentracije RNA 62
3.7.3 Reverzna transkripcija 63
3.7.4 qPCR..... 63
3.7.5 ddPCR..... 65
3.8 Analiza metilacije DNA 66
3.8.1 Homogenizacija tkiva i mjerenje koncentracije DNA 66

3.8.2 Bisulfitno tretiranje DNA 67
3.8.3 PCR i agarozna elektroforeza 67
3.8.4 Pirosekvenciranje 69
3.9 Statistička obrada podataka 71
4 REZULTATI 72
4.1 Rast eksperimentalnog tumora zametnih stanica *in vitro* 72
4.2 Proliferacijska aktivnost tumora zametnih stanica *in vitro* 74
4.3 Apoptozna aktivnost tumora zametnih stanica *in vitro* 78
4.4 Biljezi matičnosti tumora zametnih stanica *in vitro* 82
4.4.1 Gen matičnosti *Oct3/4* 82
4.4.2 Gen matičnosti *Nanog* 87
4.4.3 Gen matičnosti *Sox2* 89
4.5 Stupanj i smjer diferencijacije stanica tumora zametnih stanica *in vitro* 91
4.6 Globalni epigenetički biljezi u tumoru zametnih stanica *in vitro* 98
4.6.1 Globalna acetilacija H3 98
4.6.2 Globalna metilacija DNA 101
5 RASPRAVA 102
5.1 Utjecaj 5-azacitidina na rast i razvoj eksperimentalnog tumora zametnih stanica miša *in vitro* 102
5.2 Utjecaj Trihostatina A na rast i razvoj eksperimentalnog tumora zametnih stanica miša *in vitro* 107
5.3 Utjecaj Valproata na rast i razvoj eksperimentalnog tumora zametnih stanica miša *in vitro* 109
5.4 Utjecaj esi*Oct3/4*-a na rast i razvoj eksperimentalnog tumora zametnih stanica miša *in vitro* 111
5.5 Utjecaj esi*Nanog*-a na rast i razvoj eksperimentalnog tumora zametnih stanica miša *in vitro* 113

5.6 Utjecaj esi*Trrap*-a a na rast i razvoj eksperimentalnog tumora zametnih stanica miša *in vitro* 113

6 ZAKLJUČAK 115

7 LITERATURA 117

8 ŽIVOTOPIS..... 138

1 UVOD

Tumori zametnih stanica (TZS) (engl. *Germ cell tumors*, GCTs), ubrajaju se u rijetke tumore različitih lokalizacija kao što su testis ili medijastinum. TZS se javljaju u testisu s incidencijom oko samo 1%, ali predstavljaju najčešće tumore mlađe muške populacije s porastom incidencije širom svijeta te najvećim godišnjim porastom upravo u hrvatskoj muškoj populaciji (1). Oni predstavljaju heterogenu skupinu tumora od kojih je među najprominentnijim teratokarcinom (TCa). TCa je građen od diferencirane komponente, teratoma, koja sadrži dobro diferencirane stanice podrijetlom iz svih triju zametnih listića, i nediferencirane komponente, embrionalnog karcinoma, građenog od stanica embrionalnog karcinoma (EC stanica) koje smatramo tumorskim matičnim stanicama i nositeljicama malignosti TCa (2, 3). Upravo se zbog svoje građe TCa smatra oglednim primjerom solidnog tumora s frakcijom tumorskih matičnih stanica (4). Razvijeni su različiti eksperimentalni animalni modeli TZS. Jedan od najznačajnijih eksperimentalnih *in vitro* modela postavili su i razrađivali Škreb, Švajger i Crnek (5), dokazavši da se trilaminarni tumor s elementima diferenciranih derivata triju zametnih listića, odnosno trilaminarni teratomski oblik TZS-a, razvija kultiviranjem mišjeg zametka u stadiju gastrulacije *in vitro*. Nadalje, naši neobjavljeni rezultati ovog rada, na razini analize molekularnih biljega, dokazuju prisutnost i pluripotentnih matičnih stanica poput EC pa se može reći da se kultiviranjem mišjeg zametka u fazi gastrulacije razvija teratokarcinomski oblik TZS-a *in vitro*. Eksperimentalni TCa miša *in vitro* izrazito je informativan model istraživanja razvoja TZS-a, tumora s populacijom matičnih stanica kao i učinka različitih tvari na tumorske (matične) stanice u kontroliranim uvjetima kulture zametaka. Premda istraživači na raspolaganju imaju humani materijal, *in vitro*, ali i *in vivo* animalne eksperimentalne modele, prava etiologija TCa ostaje do danas nepoznata. Ipak, široko je prihvaćena hipoteza *in utero* inicijacije TCa kao posljedice poremećaja epigenetike zametnih stanica (6).

Epigenetika je znanstvena disciplina koja opisuje sve reverzibilne nasljedne modifikacije genoma koje ne zadiru u nukleotidni slijed DNA. U ključne epigenetičke održivače ubrajamo metilaciju DNA, postranslacijske modifikacije histona i sustav RNA interferencije. Sve epigenetičke modifikacije međusobno djeluju kao jedinstven nedjeljiv sustav, a poremećaje tog sustava nazivamo epi-mutacijama (7).

Metilacija DNA najistraživanija je epigenetička modifikacija. Predstavlja kovalentnu adiciju metilne skupine na citozin u citozin-gvanin dinukleotidnom slijedu (CpG) čime se citozin pretvara u 5-metilcitozin, što je katalizirano DNA-metiltransferazom (Dnmt). Dijelove DNA bogate CpG dinukleotidima smještene u promotorskoj regiji gena nazivamo CpG otocima. Demetilirani ili hipometilirani CpG otoci dopuštaju vezanje transkripcijskih faktora i samu transkripciju, dok hipermetilirani podržavaju heterokromatizaciju promotora i posljedično inhibiciju transkripcije (8). Metilacijski obrazac DNA, metilom, dinamičan je, ali i stabilan epigenetički sustav koji se prenosi postreplikacijski (9) čime se osigurava održavanje fiziološkog fenotipa stanica kćeri. Stoga, tijekom maligne transformacije metilom mora podleći dramatičnoj reorganizaciji. Primjerice, globalna hipometilacija genoma u tumorskih stanica povezana je s gubitkom regulacije ekspresije pojedinih gena i kromosomskom nestabilnosti što uključuje abnormalnu transkripciju onkogena i kromosomske aberacije (10). Tumorske stanice često podliježu i žarišnoj hipermetilaciji CpG otoka promotora gena supresora tumora što potiče održivost i progresiju neoplastično transformirane stanice odnosno tumora (7, 11). Ipak, epigenetička reverzibilnost i dinamičnost omogućuju eksperimentalno i jatrogeno moduliranje metiloma tretmanom 5-azacitidinom (5azaC) (12). 5azaC je analog citozina koji se kompetitivno ugrađuje u lanac DNA tijekom replikacije, odnosno stanične proliferacije. Budući da se na položaju 5 pirimidinskog prstena 5azaC-a namjesto ugljika nalazi dušik na koji se ne može vezati metilna skupina, 5azaC ima snažan demetilacijski učinak. Poznati biološki učinak 5azaC-a na nediferencirane stanice (indukcija diferencijacije, inhibicija proliferacije i citotoksičnost) već se godinama koristi u terapiji hematoloških neoplazija te se intenzivno istražuje njegov potencijal u liječenju solidnih tumora (12, 13).

Histonske modifikacije drugi su najistraživaniji epigenetički sustav, a uključuju adiciju i eliminaciju specifičnih skupina na aminokiseline repova histona. Histonske modifikacije primarno reguliraju strukturnu organizaciju kromatina čime se posredno regulira i ekspresija gena (14). Među do danas opisanim, najznačajnije su acetilacija odnosno deacetilacija posredovane enzimima histonskom acetilazom (HAC) odnosno histonskom deacetilazom (HDAC) (15). Epimutacije histonskih modifikacija dokazane su u nizu neoplastičnih bolesti, primjerice kod karcinoma želuca i kolorektalnog karcinoma (16). Poznato je da različite tvari, ali i lijekovi već prisutni u kliničkoj praksi, poput trihostatina A (TSA) odnosno valproata (VAL), interferiraju sa sustavom acetilacije histona čime mijenjaju ekspresijski profil stanice (8). TSA spada u inhibitore histonskih deacetilaza (HDACi) čime mijenja proteom, posebice tumorskih stanica (17, 18), aktivira apoptozu i potiče diferencijaciju tumorskih stanica. Trenutno

se provode daljnja istraživanja biološkog učinka TSA, ali i istraživanja translacijskog potencijala u okološkoj terapiji (19). Valproat također pokazuje snažnu inhibiciju HDAC. Budući da se već koristi u kliničkoj praksi, kao standardna terapija epilepsije, iznimno je zanimljiv kao potencijalni novi lijek u onkološkoj terapiji solidnih tumora (20, 21).

RNA interferencija (RNAi) treći je i najdinamičniji sustav epigenetičkih održivača. U nekodirajućem dijelu genoma, 25% DNA prepisuje se u RNA molekule koje se ne prevode u proteine. Stoga ih nazivamo nekodirajuće RNA (ncRNAs). Dijelimo ih na male interferirajuće RNA (siRNA) i mikro RNA (miRNA) koje moduliraju translaciju mRNA, a time posredno ekspresiju gena. NcRNA nositeljice su RNA interferencije. Sintetskim siRNA molekulama komplementarnima pojedinoj mRNA eksperimentalno se može inhibirati ekspresija ciljnog gena što se danas intenzivno istražuje u bazičnim i kliničkim istraživanjima (22, 23). Poznati učinak inhibicije ekspresije gena povezanih uz inicijaciju i progresiju tumora ostvaruje se eksperimentalnom aktivacijom RNA interferencijskog puta pomoću sintetskih siRNA molekula poput esiRNA(24). Tako je dokazano da esi*Oct3/4* suprimira razvoj karcinoma, adenokarcinoma primjerice (25), dok esi*Nanog* smanjuje tumorigeni potencijal potkožnih ksenografta stanica karcinoma prostate, kolona i dojke (26).

1.1 Svrha rada

Svrha ovog rada je određivanje inhibicijskog potencijala epigenetički aktivnih tvari primjenjenih na normalni trilaminarni zametak kao ishodište teratoma na rast i razvoj eksperimentalnog TZS *in vitro* te određivanja intenziteta smanjenja populacije tumorskih matičnih stanica kako bi se pronašli novi dokazi o translacijskom potencijalu epigenetički aktivnih tvari odnosno epigenetičke terapije u liječenju kako TZS-a tako i ostalih tumora čovjeka s populacijom tumorskih matičnih stanica.

1.2 Cilj rada

Opći je cilj ovog istraživanja bio ustanoviti i usporediti inhibicijski potencijal epigenetički aktivnih molekula 5-azacitidina, trihostatina, valproata, esi*Oct3/*4, esi*Nanog* i esi*Trrap* na rast i razvoj eksperimentalnog TZS miša *in vitro*.

Specifični ciljevi:

Odrediti i usporediti inhibicijski potencijal ispitivanih epigenetičkih tvari na rast eksperimentalnog TZS *in vitro* praćenjem intenziteta rasta.

Odrediti i usporediti inhibicijski potencijal ispitivanih epigenetičkih tvari na proliferacijsku aktivnost stanica TZS *in vitro* određivanjem i usporedbom ekspresije biljega proliferacije (PCNA) na proteinskoj razini.

Odrediti i usporediti učinak ispitivanih epigenetičkih tvari na apoptoznu aktivnost stanica TZS *in vitro* određivanjem i usporedbom prisutnosti biljega apoptoze (aktivirane Kaspaze-3).

Odrediti i usporediti potencijal ispitivanih epigenetičkih tvari na smanjenje malignog potencijala TZS *in vitro*, odnosno populacije tumorskih matičnih stanica određivanjem i usporedbom ekspresije biljega matičnih EC stanica (*Oct3/4* i *Nanog*) na razini mRNA i proteinskoj razini.

Odrediti i usporediti potencijal ispitivanih epigenetičkih tvari na stupanj i smjer diferencijacije stanica TZS *in vitro* određivanjem i usporedbom ekspresije biljega matičnih stanica ektoderma (GFAP i Neurofilament), endoderma (Hnf4a) te biljega diferenciranog ektoderma odnosno bazalnih stanica epidermisa (Citokeratin 15).

1.3 Opseg rada

Ovo istraživanje provedeno je na laboratorijskim životinjama iz vlastitog uzgoja u Nastambi za laboratorijske životinje (HR-POK-010) Zavoda za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, sukladno pozitivnim propisima Republike Hrvatske, pod nadzorom Povjerenstva za dobrobit životinja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a u okviru odobrenja nadležnog Etičkog povjerenstva institucije (UR 380-59-10106-15-168/90, K 641-01/15-02/01, 23.04.2015.) i Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske.

Tijekom istraživanja korištene su ženke i mužjaci laboratorijskog miša soja C3H za uzorkovanje pa na odraslim jedinkama nije izvođena nikakva istraživačka manipulacija. Eutanazirano je

ukupno 171 ženki za izolaciju zametaka, dok je 50 mužjaka bilo korišteno u postupku parenja i niti jedan nije eutanaziran zbog potreba ovog istraživanja. U istraživanju je ukupno upotrijebljeno 1024 izoliranih zametaka u stadiju gastrulacije starih 7.5 dana *post coitum*.

Tijekom istraživanja korištena je infrastruktura Zavoda za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu: Nastamba za laboratorijske životinje, Laboratorij za izolaciju i transplantaciju zametaka, Laboratorij za kulturu tkiva, Laboratorij za histologiju i Laboratorij za epigenetiku i molekularnu medicinu. Dio metodologije proveden je koristeći infrastrukturu suradnih ustanova: Zavod za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Odjel za međustaničnu komunikaciju Centra za translacijska istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Klinički zavod za patologiju "Ljudevit Jurak" Kliničkog bolničkog centra Sestara Milosrdnica. Dio istraživanja proveden je na demo uređaju u suradnji s tvrtkama Bio-Rad Laboratories - Dubai Branch i Labena d.o.o.

Ovo je istraživanje financirano od strane Potpore Sveučilišta u Zagrebu „Epigenetička osnova razvojnih procesa u sisavaca" (2015.) i Podjedinice za biomedicinsko istraživanje reprodukcije i razvoja Centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu voditelja prof. dr. sc. Davora Ježeka (2015.-2022.) te je trošak materijala i metoda procijenjen na ukupan iznos od 150.000,00 HRK. Administrativne troškove i troškove školovanja kandidat je podmirio iz vlastitih izvora financiranja. Trošak diseminacije rezultata predstavljenih u ovoj disertaciji te trošak daljnjih istraživanja temeljenih na predstavljenim rezultatima ovog istraživanja preuzima Centar izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kao vlasnik rezultata ovog i budućih vezanih istraživanja, a u dogovoru s doktorandom.

1.4 Metode

- Sinteza esiRNA
- Izolacija gastrulirajućih zametaka miša
- Tretiranje zametaka i kultura *in vitro*
- Mjerenje rasta *in vitro*
- Izolacija kultiviranih zametaka/tumora *in vitro* i osnovna obrada za daljnje analize
- Bojanje tkiva hemalaun eozinom

- Imunohistokemija i morfometrija
- Izolacija i mjerenje koncentracija makromolekula (DNA, RNA, proteina)
- Analiza metodom otiska po Westernu
- RT-PCR, qPCR i ddPCR
- PCR, elektroforeza i pirosekvenciranje
- Statistička analiza podataka

1.5 Hipoteza

Epigenetički aktivne tvari 5-azacitidin, trihostatin, valproat, esi*Oct3/4* i esi*Nanog* primjenjene na zametak miša različitim intenzitetom suprimiraju rast te izazivaju različite učinke na razvoj eksperimentalnog tumora zametnih stanica *in vitro*.

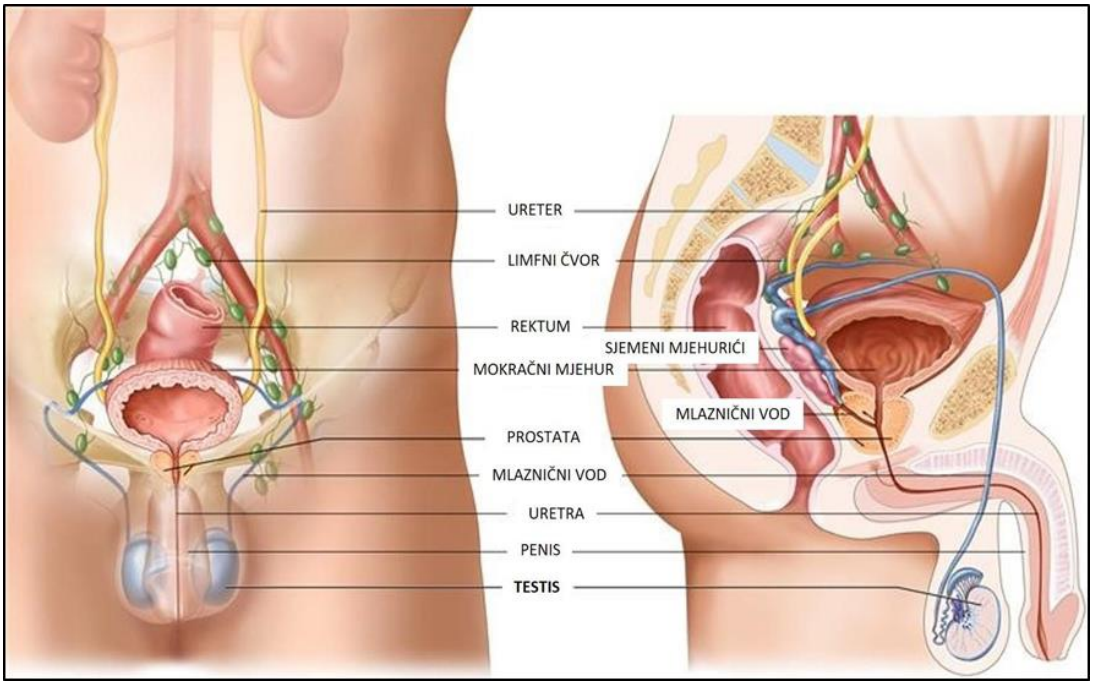
2 LITERATURNI PREGLED

2.1 Tumori testisa

Tumori testisa heterogena su skupina neoplastičnih bolesti testisa. Predstavljaju rijetke tumore, ali zbog specifičnih epidemioloških i inih karakteristika imaju značajan negativan socioekonomski, zdravstveni i demografski učinak na društvo. Biološki pak gledano, istraživanja tumora testisa iznimno su vrijedna budući da kontinuirano doprinose razumijevanju staničnih procesa u okviru biologije tumora, ali i razvojne biologije kao i biologije starenja i regeneracijskih procesa.

2.1.1 Testis

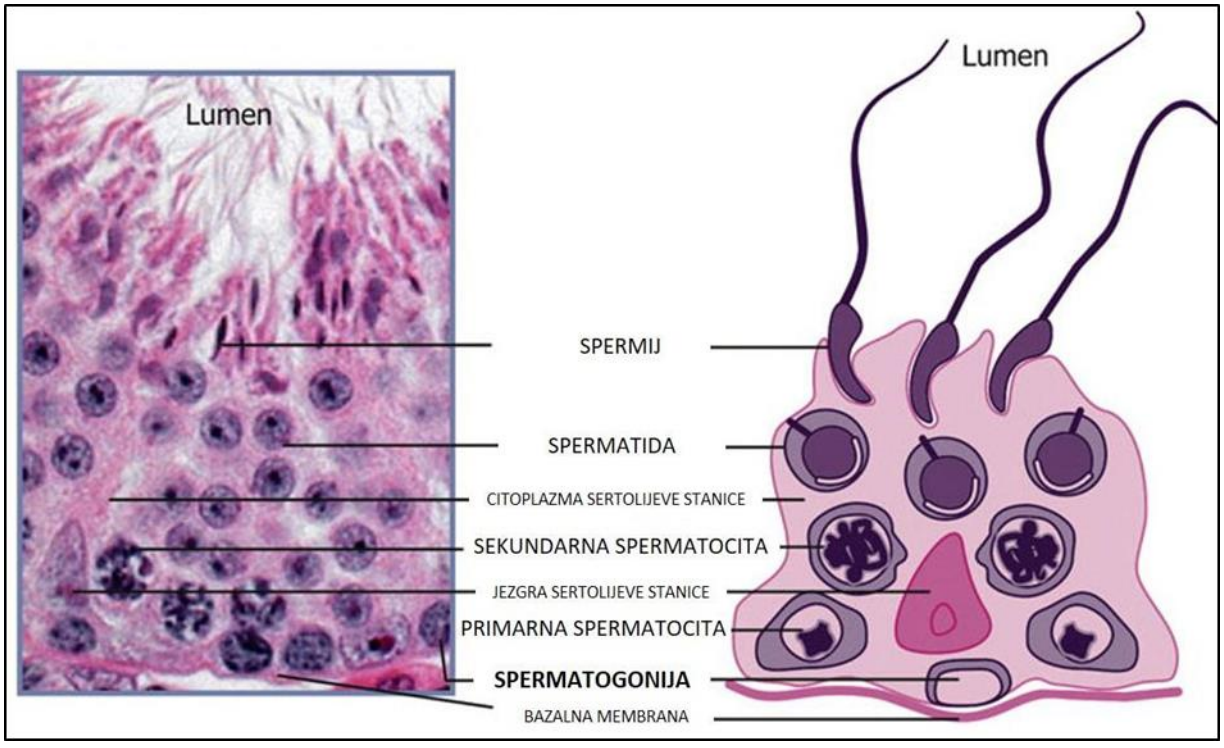
Testis (sjemenik) je parna muška spolna žlijezda smještena u skrotumu (mošnjama), težine od 20 do 40 g i prosječnih dimenzija 5 x 3,5 x 2,5 cm (Slika 1.). Obavijen je vezivnom čahurom od koje u unutrašnjost odlaze radijalno postavljene vezivne pregrade, često nepotpune.



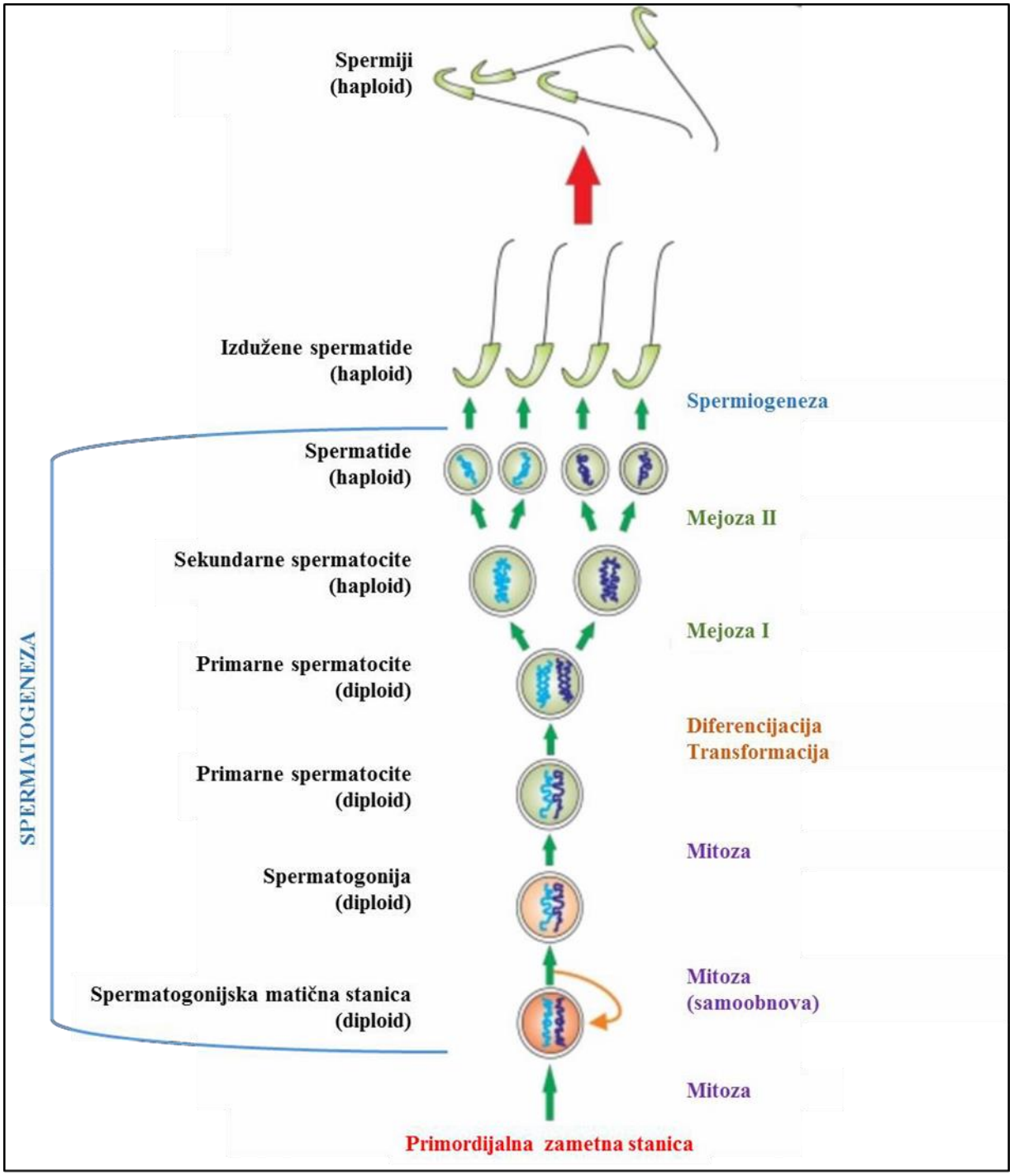
Slika 1. Anatomska građa muškog spolnog sustava. (Izvor: *www.tumori.me/rak-testisa-sjemenika.html*)

Pregrade testis dijele na 250 režnjića piramidnog oblika. Svaki režnjić sadržava od 1 do 4 vrlo zavijena sjemena kanalića smještena u rahlom vezivnom tkivu bogatom krvnim i limfnim žilama, živcima i intersticijskim Leydigovim stanicama, čija je funkcija proizvodnja androgenih hormona (27, 28).

Sjemeni kanalići mjesto su formiranja muških spolnih stanica, procesa kojeg nazivamo spermatogeneza. Sjemeni kanalići sastoje se od vezivnomišićne ovojnice koja je prekrivena bazalnom membranom na koju priliježe zametni epitel. Zametni epitel čine dvije vrste stanica. Potporne Sertolijeve stanice ne prolaze kroz spermatogenezu već je svojom morfologijom i fiziologijom uopće omogućuju (Slika 2.). Tako primjerice, sudjeluju u formiranju barijere krv–testis, fiziološke barijere ključne za osiguravanje potrebnog mikrookoliša potrebnog za uspješnu spermatogenezu. Druge stanice zametnog epitela, stanice spermatogenetske loze, prolaze složen proces spermatogeneze (Slika 3.).



Slika 2. Zametni epitel u sjemenom kanaliću testisa. Histološka slika (HEx400) usporedna je sa shematskim prikazom međuodnosa stanica zametnog epitela koji pokazuje složenost morfologije stijenke sjemenog kanalića testisa. (Prilagođeno prema *Borg i sur., 2010*)



Slika 3. Spermatogeneza. U pozadini spermatogeneze, procesa formiranja muških spolnih stanica, koja uključuje niz složenih morfoloških i fizioloških procesa, odvijaju se i osnovni biološki procesi diobe stanica odnosno raspoređivanja genetičkog materijala (mitoza i mejoza). (Prilagođeno prema *Cheng i sur. 2011*)

U procesu spermatogeneze, stanice su poredane u 4 do 8 redova. Spermatogeneza započinje u spermatogonijama tipa A, smještenima na periferiji sjemenog kanalića. To su nediferencirane matične stanice zametnog epitela. Njihovom diferencijacijom nastaju spermatogonije tipa B, prastanice koje se dalje diferenciraju u primarne spermatocite koje imaju 46 (44+XY) kromosoma. Prvom mejotičkom diobom reducira se broj kromosoma (23; 22+X ili 22+Y) te nastaju sekundarne spermatocite, od kojih drugom mejotičkom diobom nastaju spermatide. Spermatide ulaze u proces spermiogeneze, završni stadij stvaranja spermija. Tim procesom nastaju zreli spermiji i ostatna tjelešca, odnosno citoplazmatski višak koji su spermatide odbacile, a koji fagocitiraju Sertolijeve stanice (29-31). Svi ovi razvojni stadiji spermija obavijeni su Sertolijevim stanicama.

2.1.2 Epidemiologija i klasifikacija tumora testisa

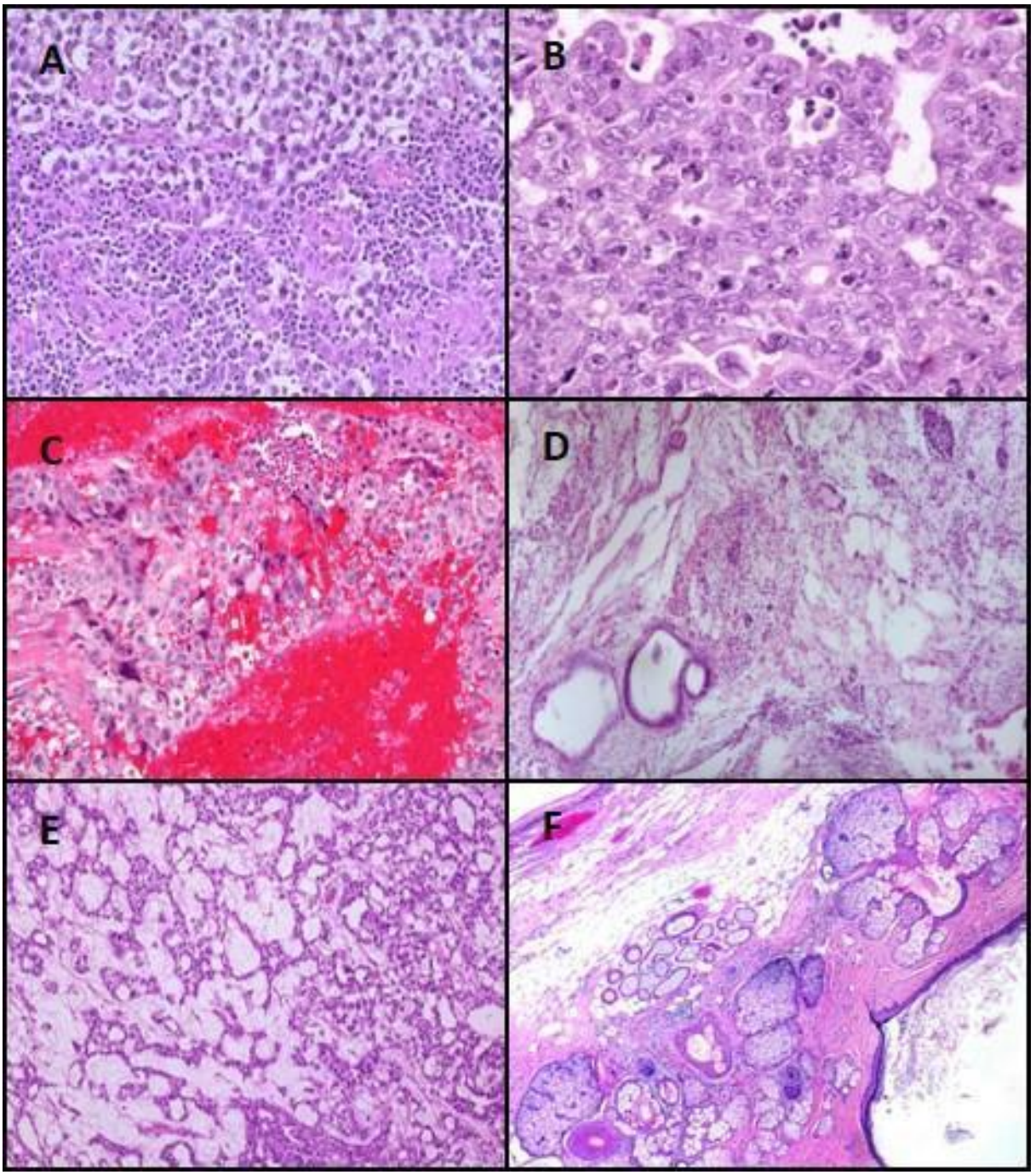
Testikularne neoplazije predstavljaju od 1% do 3% svih novodijagnosticiranih neoplazija, ali u mnogim bogatim društvima imaju izuzetan zdravstveni, socioekonomski, ali i demografski negativan učinak na društvo budući da se javljaju u muškaraca uglavnom između 15-45 godine života te predstavljaju istaknuti izvor pobola u najproduktivnijoj životnoj dobi muškarca (32). U posljednjih 20 godina u svijetu pokazan je zapanjujući porast učestalosti testikularnih neoplazija od čak 70% (33, 34). Istraživanja na hrvatskoj populaciji pokazala su da hrvatsko stanovništvo, u odnosu na drugo europsko i stanovništvo europskog podrijetla, ima srednju učestalost, ali ipak pokazuje brz i stalan godišnji porast učestalosti (1). Neki autori sugeriraju da stopa učestalosti testikularnih neoplazija možda stagnira ili čak pokazuje znakove pada u pojedinim populacijama (34, 35). Podaci praćeni kroz dulji period u hrvatskoj populaciji ne pokazuju takav učinak. Umjesto toga, učestalost testikularnih neoplazija je u stalnom porastu, a vjerojatno i sa najvećom stopom porasta u svijetu (1). Doista, "*model-based*" predviđanja u 40 zemalja, na temelju registriranih podataka o stanovništvu, procjenjuju da će godišnje oko 1 od 100 muškaraca biti dijagnosticirana testikularna neoplazija i to primarno u tri europske države sa najvišom stopom rizika, a među kojima je i Hrvatska (36).

Za razliku od dinamičnih promjena stopa incidencije, stopa mortaliteta od testikularnih neoplazija blago opada ili je relativno stabilna u većini zapadnih zemalja odnosno vodećih ekonomija svijeta (37, 38). Ipak, premda zdravstveni sustav primjenjuje najnovija dostignuća u tretmanu pacijenata, hrvatska populacija, kao i neke druge, ne pokazuju takav obrazac stopa mortaliteta, nego dapače značajan porast (1, 38).

Stoga se i dalje vode rasprave o različitim pristupima liječenju testikularnih neoplazija (39) unatoč činjenici da je u većini zemalja već početkom ovog stoljeća značajno unaprijeđena terapija u vidu kemoterapije, radioterapije i naprednih kirurških tehnika što je sve zajedno dovelo do stope izlječenja preko 95% novodijagnosticiranih pacijenata s tumorom testisa (40).

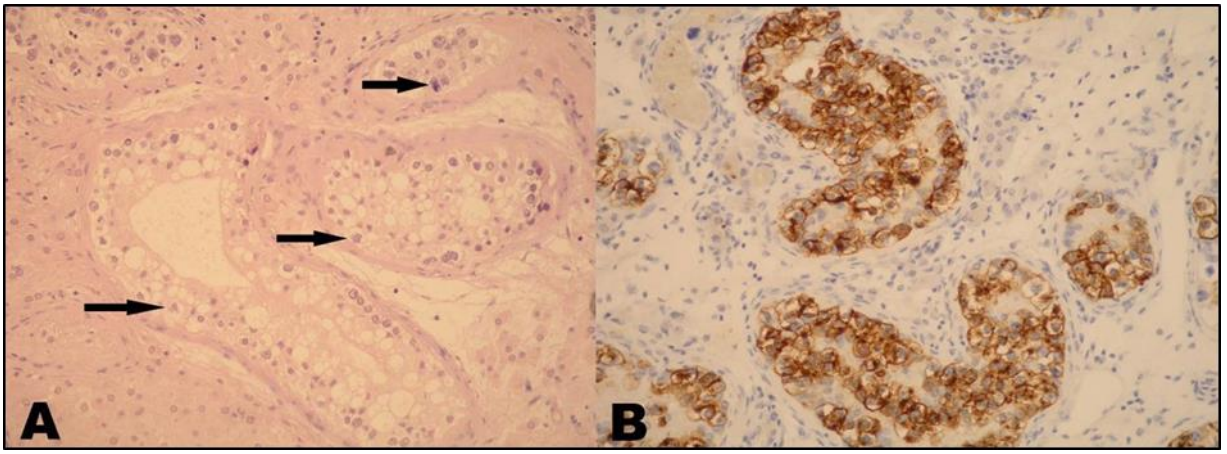
Tumori testisa se dijele na tumore zametnih stanica testisa (TZST), tumore hormonski aktivnih stanica kao što su Sertolijeve i Leydigove stanice te na tumore koji su metastazirali u testis. Budući da se spermiji i spermatide ne dijele, tumori moraju nastati iz stanica koje su mitotički/mejotički aktivne – spermatocita, spermatogonija ili fetalnih zametnih stanica koje su u nezrelom obliku zaostale unutar sjemenih kanalića odraslih osoba.

TZST se histološki dijele na 2 glavna tipa, seminome i neseminome, čija se incidencija okvirno udvostručila u zadnjih 40 godina, te čine ukupno 95% svih tumora testisa, uz zabilježeni godišnji porast od 3-6% u europskoj populaciji i populaciji europskog podrijetla. Seminomski tumori se obično razviju u kasnijim fazama života, u 4. i 5. desetljeću, i predstavljaju homogene neoplazije sastavljene od gonocita koje imaju karakteristike zametnih stanica i slabo invazivan fenotip. Neseminomi se pojavljuju među mlađim muškarcima, između 2. i 3. desetljeća života te su agresivniji. Neseminomi zapravo predstavljaju heterogenu skupinu tumora koji pokazuju značajne razlike u biološkim i histološkim značajkama. Tako primjerice, stanice tumora žumanjčane vreće pokazuju određeni stupanj diferencijacije i organiziraju se u tkivo slično žumanjčanoj vreći. Stanice koriokarcinoma također pokazuju određeni stupanj diferenciranosti i tkivne strukture, ali u smjeru razvoja placente. Teratomi su pak građeni od stanica koje mogu doseći čak i terminalni stupanj diferencijacije kao derivati triju zametnih listića (ektoderm, mezoderm i endoderm). U istu podskupinu neseminoma spada i embrionalni karcinom koji je pak građen od nediferenciranih stanica koje se nazivaju stanice embrionalnog karcinoma (EC). Stanice EC smatraju se malignom varijantom embrionalnih matičnih stanica (ES) jer dijele mnoge morfološke i biokemijske značajke s blastocistom i epiblastom. EC stanice su pluripotentne i imaju sposobnost diferencijacije u stanice različitih linija poput stanica embrionalnog i ekstraembrionalnog tkiva. Tumor koji uključuje komponentu dobro diferenciranih stanica teratoma i nediferenciranih tumorskih matičnih stanica embrionalnog karcinoma naziva se teratokarcinom (41) (Slika 4.).



Slika 4. Histologija tumora zametnih stanica testisa u čovjeka. Iako vuku zajedničko podrijetlo, TZST značajno se razlikuju u svojoj histologiji oponašajući morfologiju stanica i tkiva na čijoj su diferencijacijskoj liniji. A) Seminom. B) Embrionalni karcinom. C) Koriokarcinom. D) Teratokarcinom. E) Tumor žumanjčane vreće. F) Teratom. HE, različita povećanja. (Izvor: *Zbirka slika Zavoda za Biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*)

Kako TZST predstavljaju najveću skupinu tumora testisa i nastaju iz spolne prastanice, tj. primordijalne zametne stanice (PGC), njihova specifična biologija razvoja čini ih jedinstvenim modelom za proučavanje pluripotentnosti stanica i procesa tumorske diferencijacije (Slika 5.).



Slika 5. Tumor zametnih stanica testisa *in situ*. A) U pojedinim dijelovima nekih od sjemenih kanalića uočljive su karcinomske stanice (strelice). HE, 200X. B) Jasno vidljive pozitivne stanice karcinoma *in situ* (smeđe) u pojedinim sjemenim kanalićima. Stromalni dio testisa potpuno je negativan i ne pookazuje znakove infiltracije tumorskim stanicama niti poremećaj arhitekture tkiva. PLAP, 200X. (Izvor: *Buljubašić i sur. 2017)*

2.1.3 Etiologija tumora testisa

Točna etiologija bolesti nije poznata, ali geografske i rasne razlike u učestalosti, kao i promjene epidemioloških trendova u emigracijskim populacijama, sugeriraju da se uzročnici kriju u kombinaciji okoliša i genetičke podloge određene populacije. Za sada dokazani rizični čimbenici jesu kriptorhidizam, gonadalna disgeneza, neoplazija u kontralateralnom testisu, neplodnost, pozitivna obiteljska anamneza, testikularna mikrolitijaza i poneki okolišni čimbenici.

Osobe koje imaju kriptorhidni testis obolijevaju od testikularnih tumora 10 puta učestalije od drugih ljudi. Sama orhidopeksija ne umanjuje rizik. Testikularna mikrolitijaza je stanje karakterizirano depozitima kalcija te je povezana s mogućim nastankom testikularnog maligniteta (42, 43). Okolišni čimbenici kao što je prenatalno izlaganje dietilstilbestrolu

povećava relativni rizik od TZST-a za 2,8-5,3% (44). Osim dietilstilbestrola, dugotrajna izloženost polivinil-kloridu povećava vjerojatnost obolijevanja. Pozitivna obiteljska anamneza TZST-a je jedan od najjačih i najdosljednijih čimbenika rizika za ove tumore. Braća oboljelih imaju 8 do 10 puta veći relativni rizik u usporedbi s općom populacijom, očevi 4 puta, a sinovi 6 puta veći rizik (45, 46). Ovi veliki obiteljski rizici ukazuju na to da su nasljedna osjetljivost i okolišni čimbenici važni za nastanak ove bolesti.

2.1.4 Embriološka osnova razvoja tumora testisa

PGC je preteča zametne stanice te se može identificirati već u embriju gestacijske starosti 5-6 tjedana (47, 48). Upravljani KIT ligandom i njegovim receptorom KIT te kemokinom SDF1 i njegovim receptorom CXCR4, PGC kao spolne prastanice putuju iz proksimalnog epiblasta kroz mezenterij do spolnog nabora i postaju gonocite (49-52).

PGC i gonocite se mogu prepoznati prema biljezima matičnih stanica PLAP, NANOG, KIT, SOX2, SALL4 i POU5F. Gonocite i PGC su nediferencirane embrionalne zametne stanice, koje su prošle kroz proces DNA demetilacije u kojem je izbrisan njihov orginalni epigenomski uzorak. Navedeno je potrebno kako bi se razvile zametne stanice ovisno o spolu djeteta. U prisutnosti Y kromosoma, gonadalne matične stanice izražavaju transkripcijski faktor SRY, a njegov ciljani gen je *SOX9* koji dovodi do rasta Sertolijevih stanica (53). Upravo one stvaraju mikrookoliš potreban za diferencijaciju gonocita u pre-spermatogonije i spermatogonije. Tijekom procesa diferencijacije dolazi do gubitka ekspresije određenih gena uz ekspresiju novih poput *MAGE4A* (53-57). Tijekom tog procesa diferencijacije unutar sjemenih kanalića može nastati zloćudna transformacija spolnih stanica. Ta maligna alteracija je bila opisana kao neklasificirana intratubularna novotvorina spolnih stanica (engl. *intratubular germ cell neoplasia, unclassified type*, IGCNU), karcinom *in situ* (engl. *Carcinoma in* situ, CIS) a danas se prema WHO klasifikaciji koristi naziv neoplazija zametnih stanica *in situ* (engl. *Germ cell neoplasia in situ*, GCNIS). GCNIS su preteče nastanka kako seminomskih tumora tako i onih neseminomskih. Ako IGCNU (GCNIS) zadrže svoj fenotip i nastave se dijeliti kao primitivne spolne stanice koje nalikuju spermatogonijama ili fetalnim spermatocitama nastat će tumor koji se naziva seminom. Ako se te iste stanice aktiviraju i transformiraju u embrionalne stanice nastaju tzv. neseminomski tumori spolnih stanica. Jedno od osnovnih bioloških pitanja je kako tako različiti tumori nastaju iz stanica istog tipa (58).

Široko prihvaćena teorija koja pokušava objasniti nastanak GCNIS pretpostavlja da se osnovni poremećaj dogodio još *in utero*. Ometanje razvoja zametne stanice, smatra se, dovodi do zaustavljanja fetalne zametne stanice u stadiju gonocita. Kako gonocite imaju izbrisan prirodan epigenomski uzorak postaju osjetljive na mutacije za vrijeme replikacije DNA. Uz kombinaciju aktivacije onkogena i supresije gena supresora tumora, gonocite se transformiraju u GCNIS. Vjeruje se da intenzivna proliferacija GCNIS stanica započinje tijekom puberteta i mlađe odrasle dobi zbog utjecaja hormona. Nakon toga dolazi do progresije i razvoja invazivnog oblika TZST-a koji nakon nekoliko godina ili nekoliko desetljeća postaje klinički manifestan (59, 60).

2.1.5 Genetička osnova razvoja tumora zametnih stanica testisa

Somatske mutacije koje vode nastanku TZST uključuju deleciju gena, kromosomsku duplikaciju i gubitak heterozigotnosti (61). Neseminomi su tipično hipotriploidni, a seminomi su obično hipertriplodini (62). Izokromosom 12p je najčešća alteracija, koja se može naći u u 80% slučajeva seminoma i neseminoma, međutim postojanje te iste alteracije nije nužno potrebno za razvoj samog tumora (63). *KIT*, *TP53*, *KRAS/NRAS* i *BRAF* ubrajaju se pak u najčešće mutirane gene u TZST-u i smatraju se uključenima u patogenezu nastanka tumora.

Najčešće mutirani gen u TZST-u je *KIT*, protoonkogen smješten na kromosomu 4q11-q12. On je još poznat kao faktor rasta matičnih stanica, tirozin kinazni receptor koji se fosforilira nakon vezanja ligand, a ima ključnu ulogu u preživljavanju, proliferaciji i migraciji zametnih stanica (64-66). Normalna spermatogonija vrlo rijetko izražava *KIT*, dok je gotovo uvijek izražen u svim GCNIS, većini seminoma i nekim neseminomima. Pretpostavlja se da je proizvodnja KIT-a od strane malignih stanica jedna vrsta privremene autokrine i parakrine stimulacije rasta tumorskih stanica. Gen *KIT* je mutiran u 19% seminoma i 2% neseminomskih tumora. Dvije su studije do sada pokazala značajno veći postotak mutacije gena *KIT* u osoba s bilateralnim TZST, 93% odnosno 63,6% (67-69).

U TZST je pronađeno 8 predispozicijskih polimorfizama jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphisms*, SNPs) i to na 6 kromosomskih lokacija. Od svih njih samo su 5q31, 9p24 i 12q21 potvrđeni u više nezavisnih studija. 12q21 lokus ima značajno manju incidenciju u Afroamerikanaca u usporedbi s bjelačkom populacijom, što potencijalno može objasniti značajno manju incidenciju TZST-a u Afroamerikanaca (70, 71). Geni smješteni na tim

lokusima djeluju kao inhibitori mitogena i kao promotori apoptoze. Za sve te genomske varijante vjeruje se da sudjeluju u KITLG/KIT signalnom putu koji je jako osjetljiv na onkogene stimulanse. Iako su ti SNPs biološki važni, oni su odgovorni za samo 15% obiteljskog rizika (72).

Nadalje, dokazano je da razvoj GCNIS može uključivati aberantnu aktivaciju KITLG/KIT puta i prekomjernu ekspresiju embrionalnih transkripcijskih faktora kao što su NANOG i POU5F1, koji dovode do supresije apoptoze, povećane proliferacije i nakupljanja mutacija u gonocitima.

Osim gena čije mutacije dovode do promjena staničnog ciklusa, pronađene su mutacije u genima koji kodiraju estrogenske receptore. Pokazana je povezanost polimorfizama gena *ERα* s azospermijom i rizikom nastanka seminoma i metastaznog potencijala tumorskih stanica (73, 74).

Osim samih mutacija gena, sve se više istražuju promjene funkcije gena uslijed epigenetičkih promjena, koje su uobičajene u većini, ako ne i u svim zloćudnim novotvorinama.

2.1.6 Konvencionalna terapija tumora zametnih stanica testisa

TZST su visoko osjetljivi na kemoterapiju baziranu na cisplatini, uz iznimku teratoma. Načelno, stopa izlječenja je 95%, ako je liječenje započeto u ranim stadijima bolesti (75, 76). Cisplatina djeluje protutumorski, kovalentnim vezivanjem za DNA molekulu koja biva prepoznata od strane proteina koji sudjeluju u procesu popravka DNA, a što dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa i apoptoze (77).

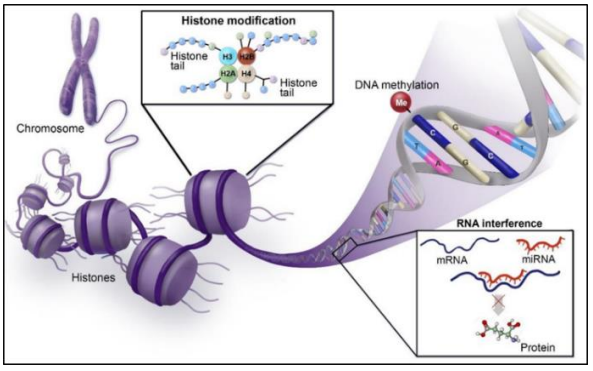
Seminomi morfološki i imunofenotipski sliče PGCs/gonocitima i osjetljivi su na zračenje i kemoterapiju baziranu na solima platine. Neseminomi su pak osjetljivi na kemoterapiju, ali ne i na zračenje.

Promatrajući TZST kao jedinstveni entitet, prognoza je odlična, a moguće je izliječenje u više od 90% slučajeva. Ipak, pojedini tipovi pokazuju visok stupanj smrtnosti.

2.2 Epigenetika

Epigenetika je znanstvena disciplina koja proučava mehanizme kontrole strukture kromatina i ekspresije gena odnosno regulaciju formiranja određenog fenotipa kao najboljeg mogućeg odgovora genotipa na zahtjeve okoliša u najširem smislu. Osim toga, epigenetika se bavi i pitanjem transgeneracijskog učinka naslijeđenih obrazaca ekspresije gena, koji roditelji putem spolnih stanica predaju potomcima u nizu generacija (78).

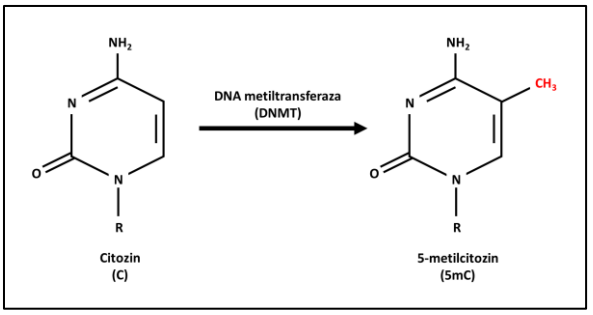
Regulacija ekspresije gena evolucijski je iznimno zahvalan mehanizam prilagodbe stanica na promjene u okolišu jer omogućava prilagodbu fenotipa bez gubitaka ili promjena u DNA sekvenci (15). U tom procesu sudjeluje nekoliko elemenata epigenetičkog puta. Prvi u tom putu su epigenatori – faktori okoliša koji pokreću mehanizme prilagodbe stanice. Mogu biti egzogeni ili endogeni, odnosno mogu dolaziti iz organizma ili iz njegovog okoliša. Djeluju na epigenetičke inicijatore koji određuju koji će dio genoma biti utišan ili aktiviran, kako bi prilagodba bila najprimjerenija. Ta promjena u obrascu ekspresije gena izvršava se putem epigenetičkih održivača koji će takav obrazac nadalje održavati stabilnim i omogućiti njegov prijenos na stanice kćeri, pa i na naredne generacije ako se promjena dogodila u spolnim stanicama (7). Epigenetičke održivače predstavljaju mehanizmi kontrole strukture kromatina i ekspresije gena; metilacija DNA, posttranslacijske modifikacije histona i RNA interferencija (RNAi) (Slika 6.).



Slika 6. Epigenetičke modifikacije. Epigenetička regulacija strukture kromatina i ekspresije gena ostvaruje se nizom molekularnih procesa; metilacijom DNA, posttranslacijskim modifikacijama histona te sustavom RNAi. (Izvor: *American Society of Hematology*, *www.hematology.org/research/ash-agenda-for-hematology-research/epigenetic-mechanisms*)

2.2.1 Metilacija DNA

Metilacija DNA označava adiciju metilne skupine na peti atom ugljika citozina primarno u dinukleotidnoj citozin-gvanin sekvenci (CpG), a reakcija se odvija uz pomoć enzima DNA metiltransferaze (DNMT). Takav citozin nazivamo 5-metilcitozin (5mC) (Slika 7.). On ima snažan utjecaj na aktivnost gena u čijoj se sekvenci nalazi. Naime, metilirani CpG dinukleotidi, koji se vrlo često nalaze unutar promotora, dovode to zatvorene konformacije kromatina (heterokromatina) i na taj način onemogućuju pristup transkripcijskim faktorima da se vežu na promotor što rezultira izostankom transkripcije i inaktivacijom gena. Stoga načelno možemo reći da su nemetilirani geni aktivni, a metilirani inaktivni. Metilacija CpG dinukleotida dakle, uvjetuje kompaktan heterokromatin i nije isključivo svojstvo kodirajućeg dijela genoma. Naime, u normalnim stanicama, 70-80% CpG dinukleotida je metilirano i locirano u CpG bogatim regijama repetitivnih sekvenci. To je vrlo bitno jer upravo njihova metilacija osigurava stabilnost genoma koja bi njihovim izrezivanjem i premještanjem unutar genoma mogla biti narušena (79). Ostale CpG bogate regije nazivamo CpG otocima, a nalaze se u promotorskim regijama više od polovine ljudskih gena čija je aktivnost, ali i regulacija ekspresije nužna za normalno funkcioniranje stanice i organizma u cijelosti (80).

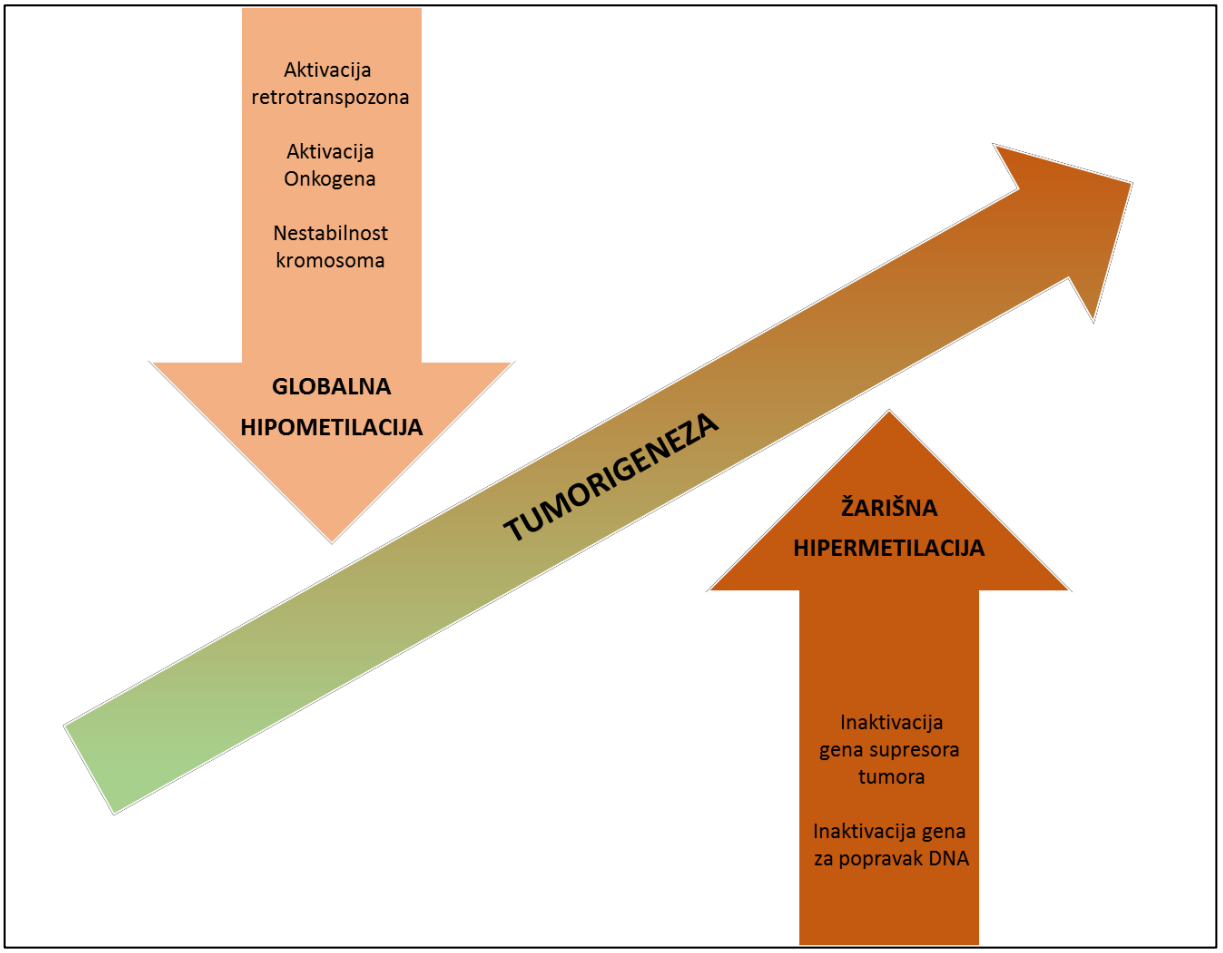


Slika 7. Konverzija citozina (C) u 5-metilcitozin (5mC). Metilacija DNA enzimatska je reakcija adicije metilne skupine na peti atom ugljika citozina, posredovana enzimima obitelji DNMT-a. (*Ljubaznošću autora Sinčić N.*)

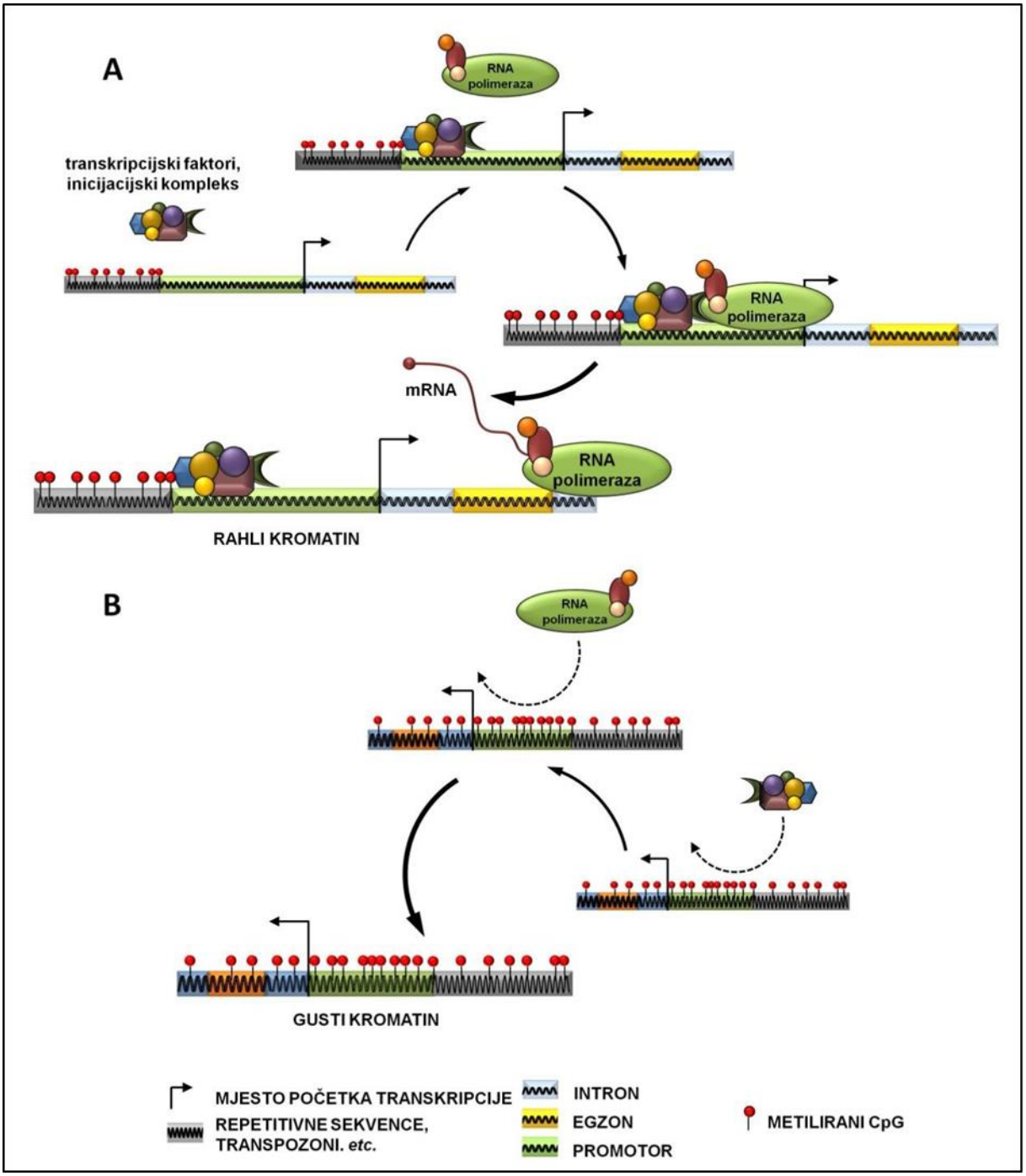
U tumorskim stanicama nalaze se značajna odstupanja u metilacijskom obrascu u odnosu na normalne stanice, kao što su globalna hipometilacija DNA i hipermetilacija promotorskih regija pojedinih gena, posebice njihovih CpG otoka (Slika 8.). Globalna hipometilacija može

rezultirati aktivacijom dijelova genoma koji su inače suprimirani, kao što su određeni onkogeni i repetitivni elementi, te tako dovesti do maligne transformacije stanice. Uistinu, danas se razina globalne metilacije DNA promatra kao potencijalni biljeg rizika razvoja neoplastične bolesti (7, 81).

Hipermetilacija CpG otoka u promotorskim regijama gena supresora tumora ili gena za popravak DNA također može biti inicijator tumorigeneze (Slika 9). Stanice kolorektalnog karcinoma primjerice pokazuju inhibiciju ekspresije posredovanu hipermetilacijom niza gena kao što su *MLH1*, *RB*, *P16*, *RARB* i *SFRP* (82).



Slika 8. Poremećen obrazac metilacije DNA u stanicama raka. Promjene ekspresije gena i nestabilnost kromatina u stanicama raka uzokovane su poremećenim metilacijskim obrascem u oba smjera odnosno globalnom hipometilacijom i žarišnom hipermetilacijom DNA. (*Ljubaznošću autora Sinčić N.*)



Slika 9. Utjecaj metilacije promotorske regije DNA na ekspresiju gena. Pojednostavljeni prikaz utjecaja prisutnosti 5mC u promotorskoj regiji gena na kondenziranost kromatina te mogućnost vezivanja transkripcijskog inicijacijskog kompleksa i RNA polimeraze. A) Demetilirani ili hipometilirani promotor gena. B) Hipermetilirani promotor gena. (Izvor: *Vlahović i Sinčić, Epigenetika – Mehanizmi genetske kontrole, skripta 2013*)

Ukratko, danas je općeprihvaćena hipoteza da ne postoji neoplastični tumor u čijim se stanicama ne može pronaći čitav niz epimutacija, posebice hipermetilacija DNA promotorskih regija gena (7).

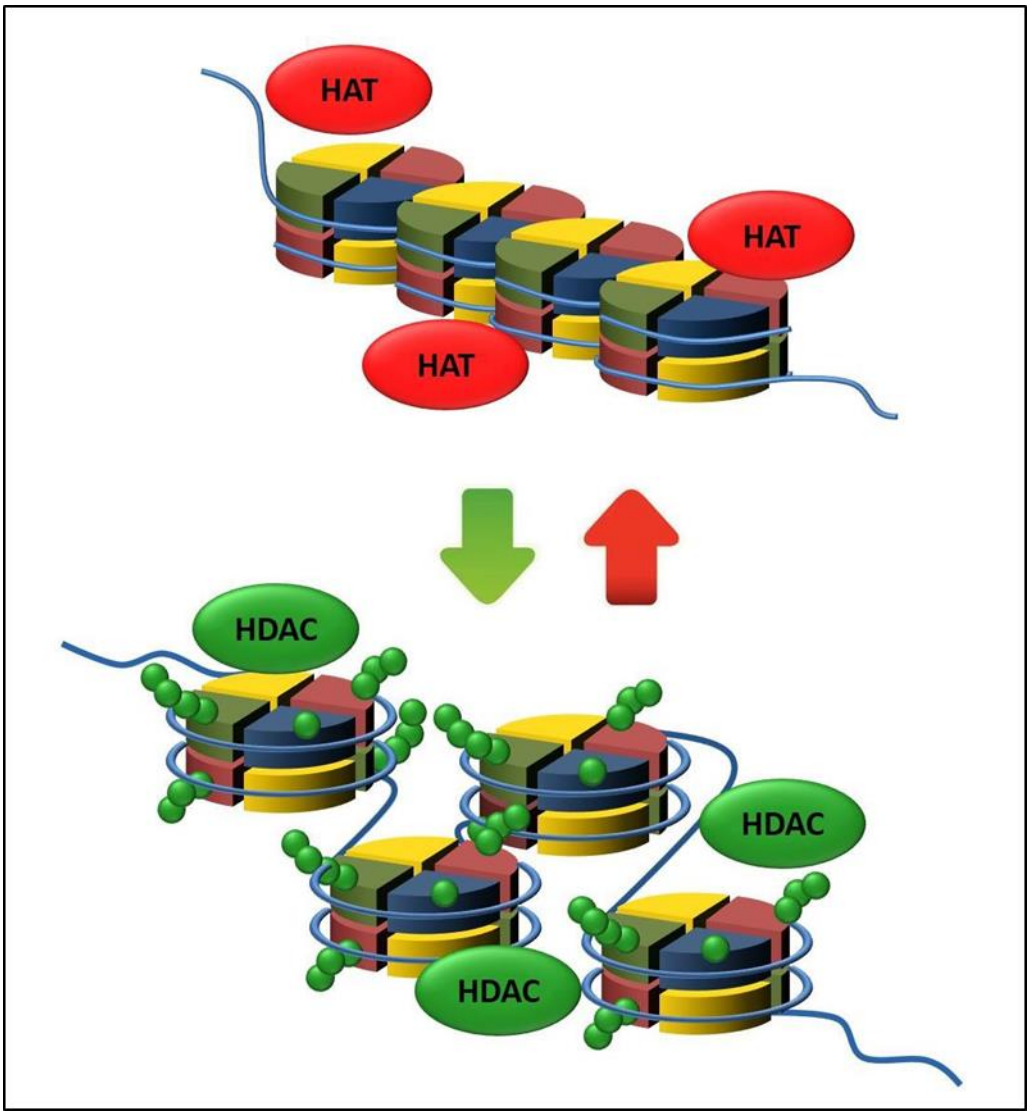
2.2.2 Histonske modifikacije

Posttranslacijske modifikacije histona drugi su epigenetički sustav koji uvjetuje strukturu kromatina i transkripcijsku aktivnost gena, a odnosi se na adiciju ili eliminaciju određenih kemijskih skupina na aminokiseline polipeptidnog lanca histonskog repa. Na taj način primarno se mijenjaju fizikalno-kemijska svojstva histona što dovodi do otvorene ili zatvorene strukture kromatina kojom se regulira dostupnost gena transkripcijskoj mašineriji. Ovisno o skupini koja se veže na histone, histonske modifikacije uključuju primarno acetilaciju, metilaciju, fosforilaciju, sumoilaciju i ubikvitinaciju, iako su opisane adicije i drugih ostataka. Najprominentnija posttranslacijska histonska modifikacija svakako je acetilacija histona. Ukratko, acetilacija se događa na lizinskim ostacima adicijom acetilne skupine podrijetlom od acetil koenzima A. Svaki od nukleosomskih histona sadrži globularnu jezgru i fleksibilan N-terminalni rep s nizom visoko konzerviranih lizinskih ostataka, koji su pozitivno nabijeni i imaju prirodni afinitet za molekulu DNA. Adicijom negativno nabijene acetilne skupine maskira se pozitivan naboj na lizinskom ostatku, smanjujući na taj način afinitet repa prema molekuli DNA čineći je izloženijom odnosno kromatin rahlijim. Ovaj se mehanizam pojačava većim brojem acetiliranih lizinskih ostataka koji dodatno privlače niz kromatin-remodelirajućih faktora što naposljetku dovodi do transkripcijski podatnog kromatina (83) (Slika 10.).

Općenito se smatra da acetilacija i fosforilacija histona opuštaju strukturu kromatina i omogućuju transkripciju gena. Sumoilacija uzrokuje čvršću vezanost molekule DNA za histone i inhibira transkripciju gena (Slika 10.). Metilacija i ubikvinacija mogu i aktivirati i inhibirati ekspresiju gena, ovisno o mjestu i zahvaćenom histonu (84). Tako metilacija H3K9, H3K27 i H4K20 rezultira ekspresijom gena, dok suprotni efekt ima metilacija H3K4, H3K26 i H3K79 (85, 86).

U tumorskim se stanicama, uz poremećen obrazac metilacije DNA, nalaze i epimutacije histonskih modifikacija. Štoviše, neke od njih mogu biti kritični događaj koji dovodi do tumorogeneze (86). Brojna istraživanja pokazala su da histonske deacetilaze uzrokuju inhibiciju ekspresije gena supresora tumora tj. acetilacija lizina na položaju 18 H3 (H3K18Ac) igra važnu ulogu u progresiji mnogih vrsta raka, uključujući karcinom dojke, debelog crijeva, pluća,

hepatocelularnog karcinoma, karcinoma gušterače, prostate i štitnjače (87). Nadalje, u stanicama raka dojke utvrđeno je da se tijekom procesa maligne transformacije stanica postupno smanjuju razine metilacije H3K9me2 i H3K9me3. Upravo se izmijenjeni metilacijski obrazac histona danas smatra kao potencijalni biomarker fenotipa tumora te prognoze ishoda bolesti (88).



Slika 10. Acetilacija i deacetilacija histona mijenjaju strukturu kromatina. Enzim HAT katalizira acetilaciju histona na točno određenim mjestima što za posljedicu ima eukromatizaciju kromatina te transkripcijsku aktivaciju gena. HDAC enzimi kataliziraju deacetilaciju histona čime doprinose heterokromatizaciji kromatina te posljedično transkripcijskoj inaktivaciji gena. (*Ljubaznošću autora Sinčić N.*)

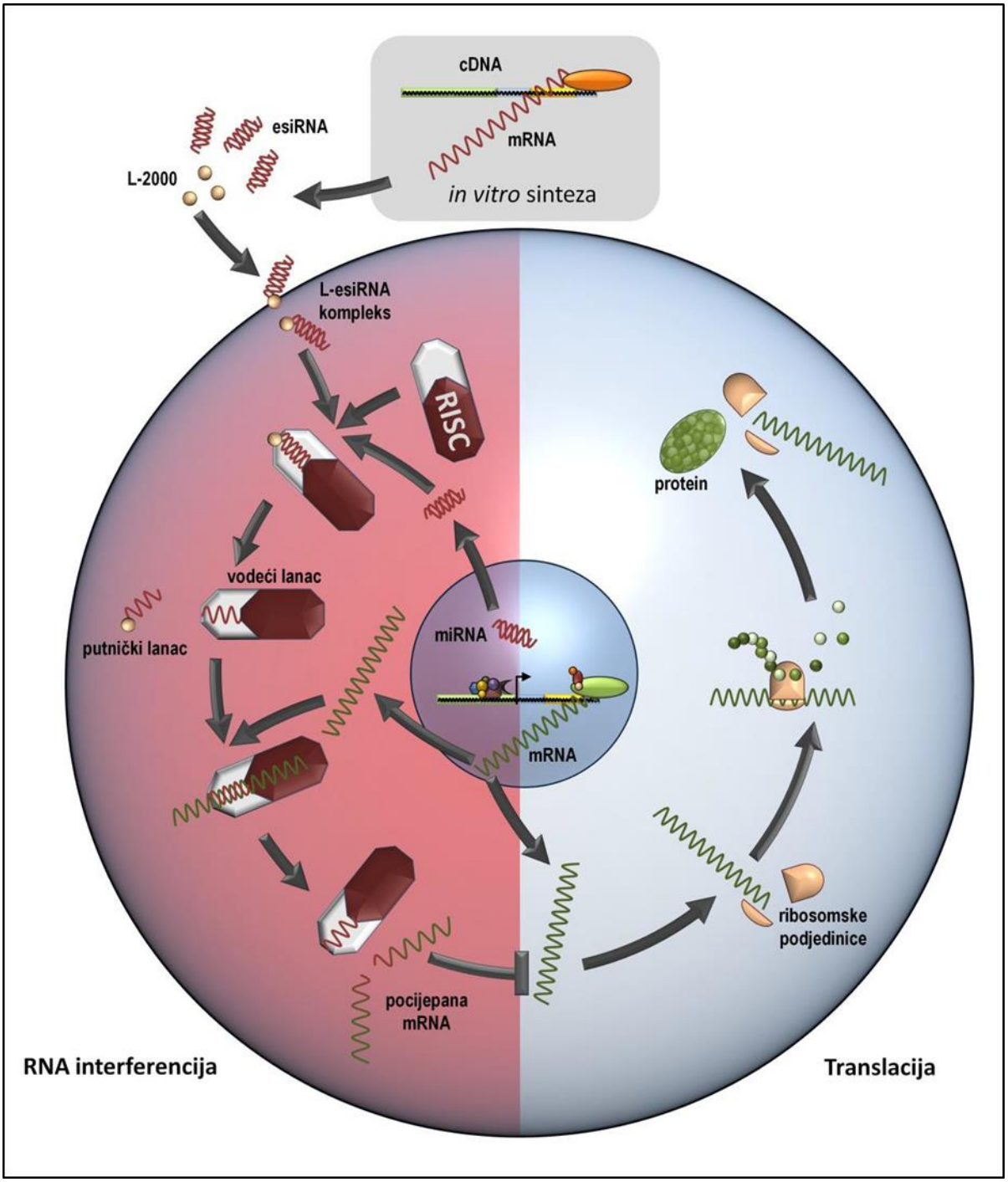
2.2.3 RNA interferencija

RNA interferencija (RNAi) je treći epigenetički sustav koji sudjeluje primarno u kontroli ekspresije gena, a temelji se na molekulama RNA koje se ne prevode do proteina, već se primarno komplementarno vežu na glasničku RNA (mRNA) čime onemogućuju njenu translaciju i sintezu proteina. RNA molekule koje ne kodiraju proteine nazivamo nekodirajuće RNA (ncRNAs), a gotovo 25% nekodirajućeg dijela genoma se prepisuje upravo u takve molekule. NcRNA koje sudjeluju u procesu inhibicije ekspresije gena na razini mRNA su: male interferirajuće RNA (engl. *small interfering RNAs*, siRNAs) i mikro RNA (engl. *microRNAs*, miRNAs). Dvolančane siRNA molekule mogu biti i endogenog i egzogenog porijekla. Zrele miRNA su jednolančane.

Zbog komplementarnih dijelova koji se međusobno sparuju, miRNA ima specifičnu konformaciju dvolančane ukosnice te je isključivo endogenog porijekla (89). I miRNA i siRNA vežu se na ATP ovisnu RNAazu III zvanu DICER koja ih cijepa na dsRNA (engl. *double-stranded* RNA) veličine 22 nukleotida. Izrezana dsRNA se veže na protein ARGONAUT kao dio RNA induciranog kompleksa utišavanja (engl. *RNA induced silencing complex*, RISC), koji odmotava dsRNA i pritom jedan lanac otpušta kao višak, a drugi ostaje u kompleksu i traži komplementarnu mRNA na koju će se vezati. Ukoliko se za mRNA veže proteinski kompleks s inkorporiranim dijelom miRNA doći će većinom do inhibicije translacije, a ukoliko se za mRNA veže proteinski kompleks s inkorporiranim dijelom siRNA doći će do njene razgradnje (90) (Slika 11.).

Deregulacija sustava RNAi može imati važnu ulogu u patogenezi brojnih bolesti, pa i u malignoj transformaciji stanice, djelujući na ekspresiju gena čija poremećena aktivnost može dovesti do promjena u proliferaciji, diferencijaciji ili apoptozi. S obzirom na ulogu koju imaju u karcinogenezi, razlikujemo dvije osnovne vrste miRNA: onkogene miRNA koje primarno inhibiraju ekspresiju gena supresora tumora te tumor supresijske miRNA koje inhibiraju translaciju proteina koji dovode do nekontrolirane diobe stanica i pojave tumora (91).

Budući da su epimutacije RNAi pronađene u nizu malignih tumora, poremećaji ovog epigenetičkog sustava u središtu su bazičnih istraživanja indukcije i progresije tumora, ali i translacijskih istraživanja novih dijagnostičkih i prognostičkih biomarkera onkoloških bolesti, kao i novih antitumorskih lijekova (85, 92).



Slika 11. Shematski prikaz RNAi. Egzogene i endogene siRNA molekule pokreću RNAi sustav koji za posljedicu ima inhibiciju ekspresije ciljnog gena na razini translacije mRNA u protein. (Izvor: *Vlahović i Sinčić, Epigenetika – Mehanizmi genetske kontrole, skripta 2013*)

2.3 Epigentika tumora testisa

Primarne zametne stanice prolaze u ranom stadiju svojega nastanka kroz fazu generalizirane demetilacije DNA koja može biti pasivna i aktivna. Pasivni oblik nastaje zbog nepostojanja redukcije DNMT zadužene za proces demetilacije. Što se tiče aktivnog procesa demetilacije predložena su dva moguća načina. Jedan sugerira da bi inicijator procesa mogao biti protein TET (engl. *ten eleven translocation protein*) koji pretvara 5mC u hidroksimetilirani citozin (5hmC). Naime, ekspresija TET1 i TET2 se podudara s brzim nestankom 5mC. Drugi mogući način bila bi izravna deaminacija 5mC-a u T posredovana AID/APOBECI. To inducira mutaciju nepravilnog sparivanja nukleotida T:G u DNA molekuli (93-96). DNA fetalnih zametnih stanica je generalizirano hipometilirana, ali nakon rođenja postupno postaje hipermetilirana. GCNIS i seminomi imaju nisku razinu DNA metilacije uz rahlu strukturu kromatina povezanu s visokom transkripcijskom aktivnošću (97). Diferenciraniji TZST, poput koriokarcinoma ili tumora žumanjčane vreće, imaju veći stupanj metilacije. Viši stupanj metilacije posebice se ističe u dobro diferenciranim stanicama teratoma. Različit opseg metilacije u različitim podtipovima TZST-a podupiru model razvoja tumora te skupine. Naime, smatra se da se GCNIS razvija u seminom i embrionalni karcinom, a koji se kasnije diferencira u ostale oblike neseminomskih tumora. Promjena metilacijskog statusa vjerojatno je povezana s ekspresijom gena *DNMT3B* čiji je proteinski produkt uobičajeno izražen u pluripotentnim embrionalnim stanicama i inducira *de novo* metilaciju. Smatra se da DNMT3B potiče diferencijaciju iz embrionalnog karcinoma u različite podtipove neseminoma katalizirajući metilaciju DNA niza gena.

Globalna DNA hipometilacija je karakterizirana globalnim gubitkom 5mC koja doprinosi malignoj transformaciji aktivacijom onkogena i latentnih retrotranspozona, kao što je LINE-1 (engl. *long interspersed nuclear elements 1*). Retrotranspozoni LINE-1 su vrlo aktivni u TZST i mogu dovesti do insercijskih mutacija, transkripcijske disregulacije, lomova DNA i povećane razine rekombinacija. Vjeruje se da promjene retrotranspozona LINE-1 pridonose genomskoj nestabilnosti i malignoj transformaciji. Studija iz 2010. pokazala je da se LINE-1 stupanj metilacije može naslijediti od roditelja i da je hipometilacija povezana s rizikom nastanka karcinoma testisa (98). Povezanost smanjene razine metilacije LINE-1 i TZST-a je jača u pacijenata sa seminomima i abilateralnim tumorima (99).

U usporedbi s normalnom spermatogonijom, genom stanica karcinoma *in situ* ostaje nemetiliran u odraslom testisu (100). Morfološke i imunohistokemijske studije pokazale su da GCNIS (CIS)

stanice nalikuju fetalnim zametnim stanicama. Naime, GCNIS stanice pozitivne su na transkripcijske faktore poput POU5F1(OCT3/4), NANOG-a, TIA-2, MYCL1, GDF3, DPPA4, KIT-a i TFAP2C, koji su povezani s pluripotentnošću embrionalnih matičnih stanica (101, 102). Oktamer vezujući transkripcijski faktor 4 (OCT4) i SOX2 su transkripcijski faktori koji imaju ključnu ulogu u održavanju pluripotencije embrionalnih matičnih stanica. OCT4 protein kodiran je genom *POU5F1* te je od kritične važnosti pri samoobnovi nediferenciranih embrionalnih matičnih stanica. Zbog toga se OCT4 često koristi kao biljeg nediferenciranih stanica. Ekspresija *POU5F1* mora biti precizno regulirana jer će bilo kakva pogreška dovesti do promjene u diferencijaciji. Premda je generalno primijećena vrlo niska razina DNA metilacije u stanicama GCNIS, dokazana je aktivnost DNA metiltransferaze 1. Bez obzira što su 5mC i 5hmC detektirani u primordijalnim zametnim stanicama, dokazano je da stanice GCNIS sadrže vrlo niske razine i
5mC i 5hmC, uz izostanak ekspresije TET proteina. Istraživanja su pokazala da GCNIS stanice posjeduju proteine koji olakšavaju DNA demetilaciju, poput AID/APOBECI i BER. Isti demetilacijski proteini su izraženi u fetalnim zametnim stanicama ali u značajno manje (97). Vjeruje se da je hipometilirano stanje povezano sa ekspresijom gena pluripotentnosti što može poticati proliferaciju GCNIS stanica, koje su izložene velikoj količini hormonske aktivnosti u postpubertetskom testisu. Sve te komponente nesumnjivo pridonose progresiji i invazivnosti tumora. Najčešće korišteni biljeg za detekciju GCNIS je PLAP (engl. *placental alkaline phosphatase*) (103).

Geni poput *ARF*, *APC*, *MGMT*, *RAR-beta2*, *CCNA1* i *hMLH1* su dokazano aberantno metilirani u tumorima testisa. Prema studiji iz 2012. slični uzorak metilacije su imali seminomi, neseminomi i normalne stanice testisa u sljedećim genima: *ARF*, *S100A2*, *SSBP2*, *ER-α* i *ER-β*. Zanimljivo, *SSBP2* i *ER-α* su imali veći stupanj metilacije u zdravim stanicama testisa, nego u tumorskim. *MGMT*, *VGF*, *ER-β* i *FKBP4* uglavnom su metilirani u neseminomskim tumorima, u usporedbi sa seminomima. *APC* i *hMLH1* su metilirani u obje vrste tumora, *APC* s većom frekvencijom i razinom metilacije, dok *hMLH1* samo s češćom frekvencijom. Još uvijek ostaje pitanje kako toliko histološki različiti tumori, seminomi i neseminomi, imaju slične citogenetske abnormalnosti te nastaju iz iste primarne stanice (104).

Kako je već navedeno, postoje dokazi da seminomi ostaju nemetilirani, dok ostali histološki tipovi TZST-a nastaju nakon procesa *de novo* metilacije, sugerirajući da mogu nastati iz zametnih stanica različitog stupnja diferencijacije, a čiji stupanj diferencijacije može određivati

daljnje promjene u metilaciji DNA (105). Smiraglia i suradnici su predložili model nastanka tumora gdje seminomi nastaju iz IGCNU stanica koje su nastale iz primordijalne zametne stanice koja je prošla proces globalne demetilacije, dok su neseminomi nastali iz IGCNU stanica koje su već prošle proces *de novo* metilacije (106). Međutim potrebna su još mnoga istraživanja kako bi se došlo do konačnog odgovora na to pitanje.

U seminomima je prisutna hipometilacija gena povezanih s nastankom tumora, kao što su primjerice *p16* i *APC*, dok je za neseminome karakteristična hipermetilacija tih istih gena. Jedan od potencijalnih regulatora DNA metilacije je gena *DNMT3B* za kojeg je također pronađena da različita ekspresija u različitim TZST podtipovima. Ti rezultati podupiru ulogu epigenetičke regulacije u TZST tumorogenezi. Smatra se da u nastanku tumora važnu ulogu imaju epigenetičke promjene gena koji djeluju slično kao tumor supresorski geni. Za sada je dokazana supresija gena *RASSF1A*, međutim pronađen je još jedan gen, *TESTISIN* (*PRSS21*) koji kodira glikozilfosfatidil inozitol povezanu serinsku proteazu koja se pojavljuje u tkivu testisa. Gen *PRSS21* u čovjeka se nalazi na 16. kromosomu i sastoji se od 6 egzona i 5 introna. Sadržava 5' CpG otok i 5' CpG bogatu regiju. Unutar gena se nalazi mnogo mjesta koje sadrže CpG dinukleotide koji potencijalno mogu biti metilirani. Gen nizvodno dodatno sadrži CpG dinukleotide u području transkripcije, koji u slučaju metilacije, mogu vezati metil-CpG vezajući protein (MeCP), kao što su MeCP2 i MeCP1, koji sudjeluju u represiji transkripcije (64). Pronađena je jaka povezanost između hipermetilacije 5' regije gena *PRSS21* i gubitka ekspresija mRNA *PRSS21* u stanicama tumora. Istraživanje Davisa i suradnika iz 2011. je u embrionalnom karcinomu identificiralo podakaliksin-like protein 1 (PODXL1), antiadhezivni protein izražen u agresivnim tumorima koji služi kao meta miR-199a-5p. PODXL1 je prekomjerno izražen u malignim testikularnim tumorima, a njegova inhibicija rezultira supresijom karcinomske invazije. MiR-199a je jače metilirana u seminomima. Hipermetilacija DNM3 introna dovodi do miR-199a depresije. Epigenetska alteracija u intronu DNM3 dovodi do disregulacije miR-199a, ali i *PODXL1*, a to bi mogao biti jedan od mehanizama razvoja testikularnog karcinoma (107). Kao direktna meta miR-199a-5p potvrđen je gen *MAFB*. Ekspresija gena *MAFB* je jača u karcinomskom tkivu testisa, dok se antiproliferacijska uloga miR-199a realizira kroz represije *MAFB* u TZST. Zajedno s antiinvazijskim efektom PODXLl, miR-199a djeluje kao tumor supresor u TZST (107). MiR-199a ima smanjenu osjetljivost u TZST- u zbog hipermetilacije svojeg promotora (108). Brojne analize pokazale su sličnu povezanost između kombinirane razine metilacije promotorske regije i rizika razvoja kako seminoma tako i neseminomskih tumora. U studiji iz 2012. ta je povezanost otkrivena i dokazana u seminomima uz nižu razinu

promotorske metilacije gena *KITLG* i visoke promotorske metilacije gena *BAK1*. Također, niža razina promotorske metilacije gena *DND1* povezuje se s povećanim rizikom nastanka seminoma (109). Povećana metilacija promotorske regije gena *PDE11A*, *SPRY4* i *BAK1* te smanjena promotorska metilacija gena *KITLG* u primarnim limfocitima je povezana s povećanim rizikom razvoja obiteljskog TZST-a (109). U promotorskoj regiji gena *PDE11A* je dokazano postojanje 7 CpG mjesta, a razine njihove metilacije su povišene u svim slučajevima TZST (109). Još jedan važan transkripcijski faktor je proteinski produkt gena *NANOG*, ključni regulator samoobnavljanja i održavanja pluripotentnosti u nediferenciranim embrionalnim matičnim stanicama (110, 111). Njegova ekspresija nije zabilježena u odraslom zdravom testisu (112). Visoko je izražen u seminomima i embrionalnim karcinomima, dok je vrlo malo ili gotovo neizražen u teratomima, tumorima žumanjčane vreće, koriokarcinomima i miješanim neseminomima. Sve to govori u prilog da metilacija CpG u NRR (*NANOG* regulatonim regijama) korelira s *NANOG* ekspresijom u zametnim stanicama tumora (113). NRR hipermetilacija u odraslom zdravom testisu mogao bi biti epigenetski mehanizam regulacije *NANOG* ekspresije kako bi se kontrolirao program pluripotentnosti i prevenirao razvoj maligniteta zametnih stanica (113). Pojedini signalni putevi, poput PIWI/piRNA put igraju kritičnu ulogu u razvitku muških zametnih stanica, stoga je njihova uloga proučavana u nastanku testikularnih TZS-a. Istraživanja su pokazala da metilacija na 5' promotorske regije CpG otoka dovodi do utišavanja gena *PIWIL1*, *PIWIL2*, *PIWIL4* i *TRDI1* u primarnim testikularnim tumorima (114). Specifična hipermetilacija CpG otoka u genima je povezana s piRNA što dovodi do njihove transkripcijske inaktivacije u karcinomu testisa. Najvažnije je da epigenetička inaktivacija PIWI-klase proteina i povezanih proteina TDRD1 u tumorogenezi nastaje u kontekstu smanjene ekspresije piRNA i DNA hipometilacije LINE1. Zanimljivo, epigenetičke promjene PIWI proteina nastaju i u muškoj neplodnosti, što bi se moglo dovesti u povezanost neplodnosti i nastanka karcinoma testisa (115, 116). Dodatno, studije X kromosoma su pokazale nisku razinu metilacije u seminomima i više razine metilacije u neseminomima, osobito u diferenciranijim oblicima tumora (117, 118). Kako je već navedeno, CpG hipermetilacija otoka rezultira u promjeni strukture kromatina i smanjuje transkripciju. Međutim, pojedine studije upozoravaju da bez obzira na različiti stupanj metiliranosti različitih gena, samo 20% gena pokazuje povezanost hipermetilacije i genske ekspresije (107).

Dosadašnja istraživanja također su pokazala promjene u ekspresiji gena koji kodiraju za proteine uključene u proces metilacije DNA. Ukratko, postoje 3 vrste DNA metiltransferaza. DNMT1 održava metilaciju tijekom DNA replikacije te na taj način pridonosi stabilnosti genske ekspresije

roditeljskih stanica u stanicama kćerima. U procesu diferencijacije proteini DNMT3A i DNMT3B prenose metilne grupe na citozinske ostatke u tijeku razvoja i diferencijacije zametnih stanica. Analize su zabilježile povećanu razinu ekspresije gena *DNMT3A* u seminomima, dok je razina *DNMT1* i *DNMT3B* jednaka. Drugi autori navode povećanu razinu DNMT3B u neseminomskim karcinomima (119).

Histonske modifikacije H3K9me2 i H3K27me3 su obje povezane s restriktivnom kromatinskom strukturom i nisu pronađene u GCNIS stanicama tumora testisa. Suprotno navedenom, H14K34ac se nalazi u GCNIS i stanicama seminoma, stoga bi potencijalno mogao služiti kao dijagnostički biljeg tih maligniteta.

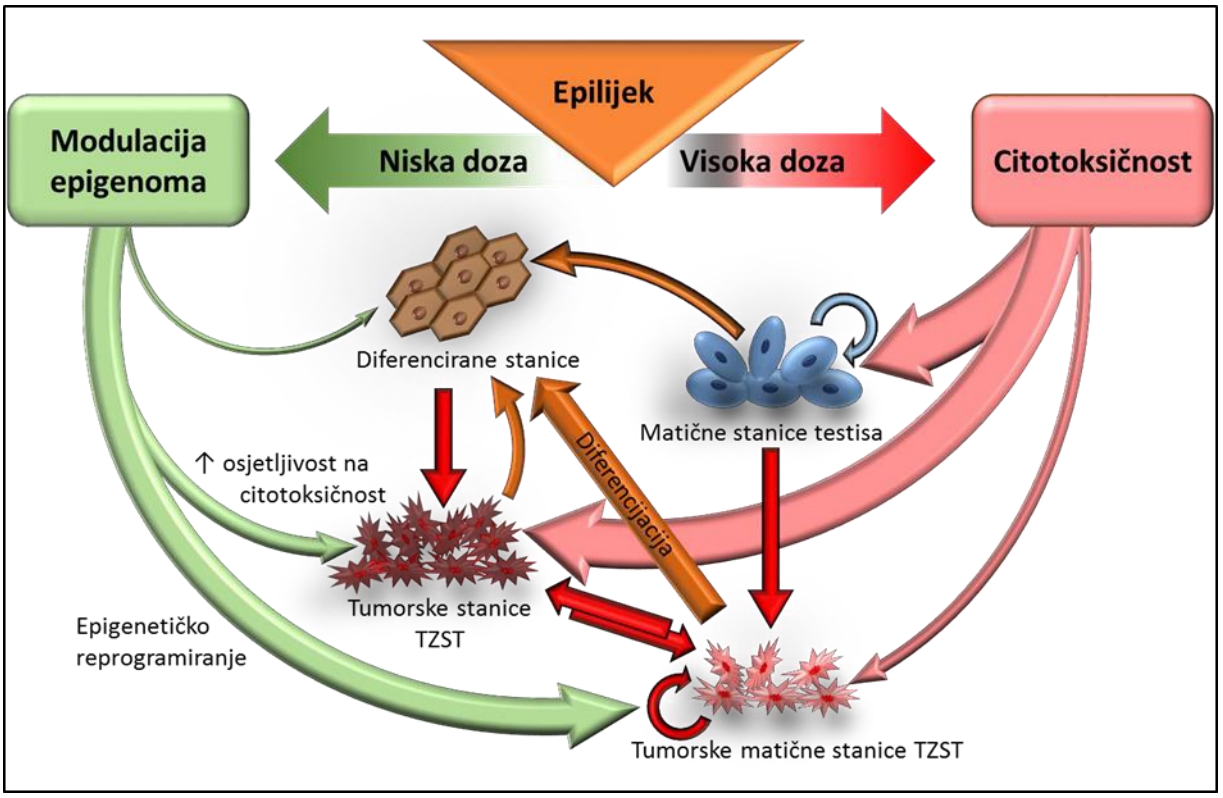
2.4 Epigenetička terapija tumora zametnih stanica testisa

Osim konvencionalne terapije, u liječenju TZST-a pokušavaju se iskoristiti pozitivni terapijski učinci pojedinih epigenetičkih lijekova. Tako se primjerice mogu koristiti niže doze 5azaC-a čiji mehanizam djelovanja uključuje demetilaciju i reekspresiju tumor supresorskih gena (120). Drugi mehanizam uključuje poticanje apoptoze zbog izravnog ili neizravnog 5-azaC posredovanog DNA oštećenja (121, 122). TZST stanice su visoko osjetljive na inhibitor DNA metilacije 5-aza-CdR. Taj je odgovor povezan s značajno većim razinama DNMT3B-a. (Slika 12.).

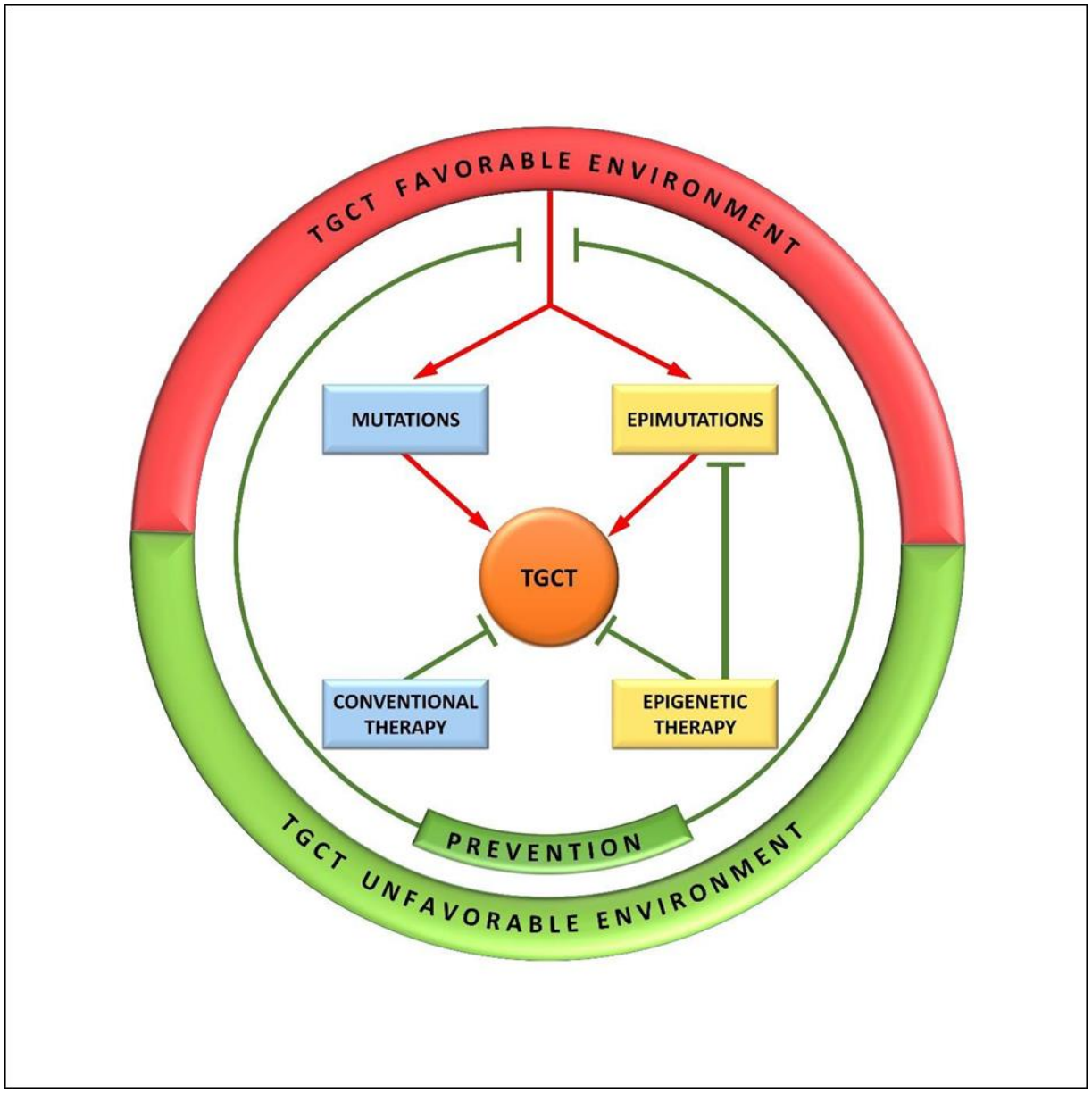
Nadalje, u procesu liječenja moguća je kemorezistencija na konvencionalne lijekove. Rezistencija TZST-a na kemoterapiju povezuje se s kariotipskim aberacijama, mutacijama pojedinog gena te epigenetičkom regulacijom genske ekspresije. Uistinu, potvrđena je povezanost metilacijski statusa pojedinih gena i tumorske kemorezistencije. Općenito, nediferencirani tumori, često hipometilirani, puno su osjetljiviji na kemoterapiju od dobro diferenciranih tumora. *In vitro*, demetilacija DNA seminomskih staničnih linija je dovela do povećane ekspresije staničnih biljega *NANOG* i *POU5F1*. Hipermetilacija promotora gena *RASSF1A* i *HIC1* povezana je s rezistencijom na kemoterapiju, dok je hipermetilacija gena *MGMT* i *RARB* povezana s visokom osjetljivošću tumora na terapiju. Gen *RASSF1A* djeluje kao negativni regulator rasta stanica, dok *HIC1* kodira transkripcijski faktor koji djeluje kao tumor supresor (123, 124). Osim tih gena dokazano je da potpuna hipermetilacija promotora *MGMT* gena djeluje povoljno na uspješnost liječenja cisplatinom (125). Za sada se relativno malo zna

o epigenetičkoj osnovi kemoterapeutske osjetljivosti TZS.

Upravo iz navedenog, jasna je težnja da se istraže novi koncepti terapije i proširi paleta potencijalnih lijekova u liječenju TZST, u čemu se mnogo očekuje upravo od epigenetički aktivnih tvari odnosno epilijekova (126, 127) (Slika 13.).



Slika 12. Shematski prikaz djelovanja epigenetičkih lijekova. U okviru biologije TZST, ovisno o dozi, epigenetički lijekovi ostvaruju različite biološke učinke poput stimulacije diferencijacije tumorskih matičnih stanica, ali i citotoksičnog djelovanja. (*Ljubaznošću autora Sinčić N.*)

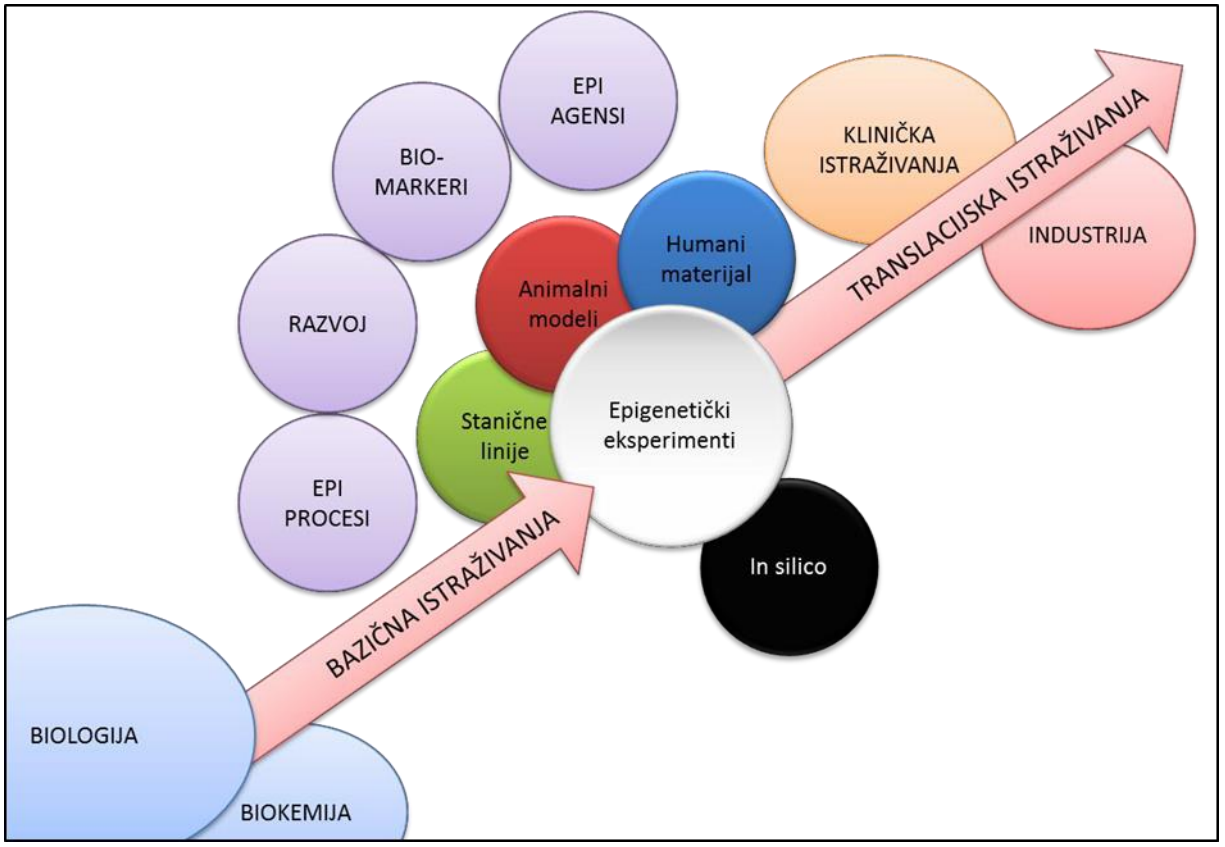


Slika 13. Prikaz odnosa rizičnih faktora razvoja tumora testisa te terapijskih pristupa. Mutacije i epimutacije, inducirane su makro ili mikro okolišem povoljnim za razvoj TZST-a. Povoljno okruženje može biti "zagađeno" različitim poznatim ili nepoznatim čimbenicima kao što su mutageni ili pak čimbenicima koji epigenetički ometaju ekspresiju gena. Mutacije su ireverzibilne i potencijalno vertikalno nasljedne. S druge strane, epimutacije su reverzibilne zbog čega bi ciljana epigenetska terapija mogla vratiti maligno transformirane stanice u fiziološko stanje odnosno liječiti tumor obnavljanjem fiziološkog obrasca ekspresije gena. (Izvor: *Buljubašić i sur. 2017)*

2.5 Epigenetički lijekovi

Koncept epigenetičke terapije, posebice onkoloških bolesti, razvijao se paralelno s razvojem epigenetike kao znanstvene discipline i jačao sveobuhvatnijim razumijevanjem epigenetičkih procesa i aberacija u okviru tumorske biologije (Slika 14.).

Prvi epigenetički lijek primijenjen u medicinskoj kliničkoj praksi bio je 5-azacitidin (5azaC). Naime, nakon niza istraživanja, 2004. godine napokon je odobren za kliničku primjenu od američke Agencije za hranu i lijekove u protokolu liječenja mijelodisplastičnog sindroma te akutne i kronične mijeloične leukemije (128, 129). Uz kontinuirane izmjene i dopune terapijskih protokola, 5azaC se koristi i danas (130, 131).



Slika 14. Prikaz znanstvenih područja uključenih u razvoj epigenetičke terapije. Razvoj epigenetičkih lijekova zahtjeva iznimnu interdisciplinarnost te suradnju bazičnih i kliničkih znanosti. (*Ljubaznošću autora Sinčić N.*)

Na temelju niza uspjeha u liječenju, primarno hematoloških onkoloških bolesti, a u skladu s principima epigenetičke terapije, ali i konceptom personalizirane medicine, razvile su se nove discipline poput farmakoepigenetike i farmakoepigenomike, čiji uzlet i značajniji doprinos kliničkoj medicinskoj praksi i to ne samo onkoloških bolesti tek očekujemo (132-135) (Slika 15.).

Epigenetic drugs and their targets

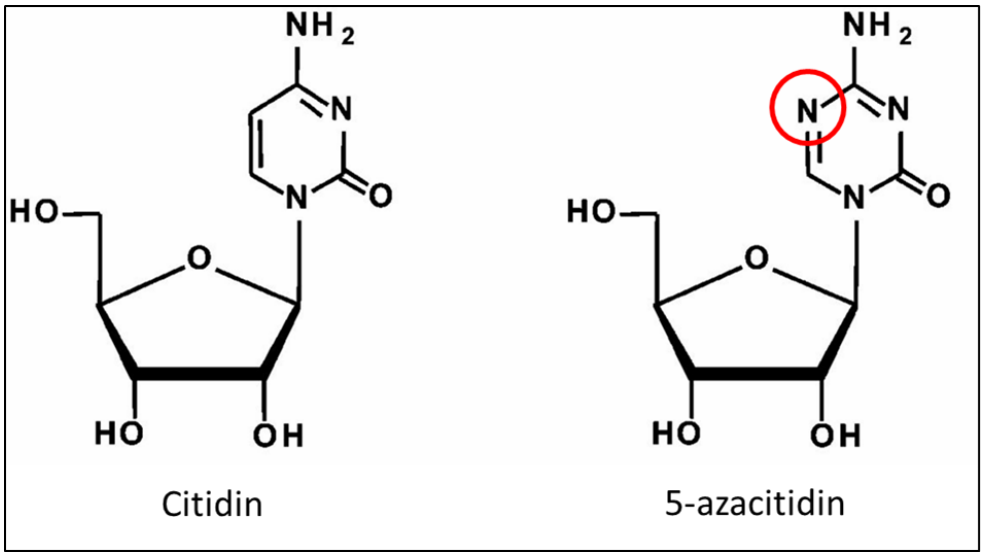
Compound	Target(s)	Epigenetic target function	Development status	Clinical trials
Decitabine	DNMT1	DNA methylation writer	FDA approved	NCT01786343
Azacitidine	DNMT1	DNA methylation writer	FDA approved	NCT02399917
Guadecitabine	DNMT1	DNA methylation writer	Phase	NCT02348489
4-Thio-2-deoxycytidine	DNMT1	DNA methylation writer	Phase	NCT02423057
ASTX727	DNMT1	DNA methylation writer	Phase	NCT02103478
AG-120	IDH1	Produces cofactor for DNA methylation eraser (TETs)	Phase	NCT02989857
AG-221	IDH2	Produces cofactor for DNA methylation eraser (TETs)	Phase	NCT02677922
AG-881	IDH1 and IDH2	Produces cofactor for DNA methylation eraser (TETs)	Phase	NCT02492737
IDH305	IDH1	Produces cofactor for DNA methylation eraser (TETs)	Phase	NCT02987010
FT-2102	IDH1	Produces cofactor for DNA methylation eraser (TETs)	Phase	NCT02719574
BAY1436032	IDH1	Produces cofactor for DNA methylation eraser (TETs)	Phase	NCT02746081
IDH1 peptide vaccine	IDH1	Produces cofactor for DNA methylation eraser (TETs)	Phase	NCT02454634
Belinostat	HDACs	Histone acetylation eraser	FDA approved	NCT02381548
Vorinostat	HDACs	Histone acetylation eraser	FDA approved	NCT02042989
Romidepsin	HDACs	Histone acetylation eraser	FDA approved	NCT01590732
Panobinostat	HDACs	Histone acetylation eraser	FDA approved	NCT02899715
Valproic acid	HDACs	Histone acetylation eraser	FDA approved (non-cancer indication)	NCT02446652
KA2507	HDAC6	Histone acetylation eraser	Phase	NCT03008018
ACY-241	HDACs	Histone acetylation eraser	Phase	NCT02400242
Tucidinostat	HDACs	Histone acetylation eraser	Phase	NCT02482753
CKD-581	HDACs	Histone acetylation eraser	Phase	NCT03051841
CUDC-907	HDACs	Histone acetylation eraser	Phase	NCT02307240
CXD101	HDACs	Histone acetylation eraser	Phase	NCT01977638
EDO-S101	HDACs	Histone acetylation eraser	Phase	NCT02576496
Givinostat	HDACs	Histone acetylation eraser	Phase	NCT01761968
MPTOE028	HDACs	Histone acetylation eraser	Phase	NCT02350868
OBP-801	HDACs	Histone acetylation eraser	Phase	NCT02414516
Resminostat	HDACs	Histone acetylation eraser	Phase	NCT02953301
Tefinostat	HDACs	Histone acetylation eraser	Phase	NCT02759601
AR-42	HDACs	Histone acetylation eraser	Phase	NCT02569320
Entinostat	HDACs	Histone acetylation eraser	Phase	NCT02115282
Mocetinostat	HDACs	Histone acetylation eraser	Phase	NCT02805660
Ricolinostat	HDACs	Histone acetylation eraser	Phase	NCT02091063
ABBV-075	BETs	Histone acetylation reader	Phase	NCT02391480
BMS-986158	BETs	Histone acetylation reader	Phase	NCT02419417
GSK2820151	BETs	Histone acetylation reader	Phase	NCT02630251
INCB054329	BETs	Histone acetylation reader	Phase	NCT02431260
INCB057643	BETs	Histone acetylation reader	Phase	NCT02711137
TEN-010	BETs	Histone acetylation reader	Phase	NCT01987362
ZEN003694	BETs	Histone acetylation reader	Phase	NCT02705469
OTX015	BETs	Histone acetylation reader	Phase	NCT02698189
CPI-0610	BETs	Histone acetylation reader	Phase	NCT02986919
FT-1101	BETs	Histone acetylation reader	Phase	NCT02543879
GSK525762	BETs	Histone acetylation reader	Phase	NCT02964507
MAK683	EED	Interaction with histone methylation writer (EZH2)	Phase	NCT02900651
Tazemetostat	EZH2	Histone methylation writer	Phase	NCT02860286
CPI-1205	EZH2	Histone methylation writer	Phase	NCT02395601
DS-3201	EZH2, EZH1	Histone methylation writers	Phase	NCT02732275
GSK2816126	EZH2	Histone methylation writer	Phase	NCT02082977
Pinometostat	DOT1L	Histone methylation writer	Phase	NCT02141828
Tranylcypromine	KDM1A	Histone methylation eraser	FDA approved (non-cancer indication)	NCT02717884
GSK2879552	KDM1A	Histone methylation eraser	Phase II	NCT02929498
INCB059872	KDM1A	Histone methylation eraser	Phase II	NCT02712905

Data were obtained from www.clinicaltrials.gov on 2/1512017.

Slika 15. Popis relevantnijih epigenetičkih lijekova. Navedeni lijekovi koriste se u kliničkoj praksi ili se nalaze u režimu kliničkih ispitivanja. (Izvor: *Kelly i Issa 2017*)

2.5.1 5-azacitidin

Analog citozina, 5-azacitidin (5azaC) otkriven je polovicom prošloga stoljeća (slika 16). Riječ je o sintetičkom spoju, analogu pirimidinskog nukleozida citozina, koji na petom mjestu pirimidinskog prstena umjesto ugljika ima atom dušika. Nedugo nakon otkrića, postao je iznimno važno oruđe u rukama istraživača zbog snažnih učinaka na biološke procese posebice embriogeneze i tumorigeneze (136-140).



Slika 16. Molekularna struktura citidina i 5-azacitidina. (Prilagođeno prema: *Yoo i sur. 2004*)

Premda je 5azaC nestabilan u vodenim otopinama, u pH neutralnim vodenim otopinama poluživot 5azaC-a je 21 dan na +4 °C, 37 sati na +20 °C odnosno 7 sati na 37 °C. Međutim, istraživanja na stanicama pokazala su da je aktivnost 5azaC-a dugotrajna u *in vitro* sustavima, a posljedice njegova djelovanja na fenotip stanica dugoročne (141).

Dva su glavna mehanizma djelovanja 5azaC, citotoksičnost kao posljedica integracije u RNA odnosno DNA te epigenetičko djelovanje induciranja hipometilacije DNA (142, 143). Indukcija hipometilacije DNA, čini se, zahtijeva niže doze 5azaC od doza potrebnih za indukciju citotoksičnosti (144). Ipak, mehanizam demetilacije dobro je poznat dok se oko mehanizma

kojim 5azaC postiže citotoksični efekt još uvijek vode rasprave (128).

5azaC konkurira citidinu i ugrađuje se tijekom replikacije u DNA. Zbog toga se najjači biološki učinak očekuje upravo u stanicama koje su bile izložene 5azaC u S fazi staničnoga ciklusa. Ugradnjom 5azaC onemogućena je metilacija DNA na tom CpG dinukleotidu budući da 5azaC ne može primiti metilnu skupinu (145). Međutim, važniji mehanizam kojim 5azaC potiče demetilaciju DNA je degradacija DNMT-a. Naime, kompleks DNMT i 5azaC integriran u DNA lanac prepoznaje mašinerija popravka DNA te se pokreće enzimski kataliziran proces degradacije DNMT. Time dolazi do smanjenja koncentracije DNMT u stanici te posljedične demetilacije DNA. Stari lanac zadržava metilacijske biljege, ali je prijenos metilacijskog obrasca na novosintetizirani lanac poremećen ili potpuno odsutan u dijelovima genoma (140, 141, 146).

Proteklih godina, dokazan je i dodatni epigenetički učinak 5azaC i to na postranslacijske histonske modifikacije (147) posebice acetilaciju. Naime, dokazano je da 5azaC izaziva hiperacetilaciju histona (148). Sukladno tomu, transkripcija HAT1 znatno je intenzivnija u stanicama izloženim 5azaC, što upućuje na osovinu: izloženost modifikatoru - prekomjerna ekspresija HAT1 - posljedična hiperacetilacija histona - povećana transkripcija gena. Tu mogućnost dodatno podupire paralelno smanjenje ekspresije HDAC1 (149). Navedena otkrića ne začuđuju budući da je poznato da su postranslacijske histonske modifikacije histona integralna komponenta kontrole genske ekspresije i usko vezana uz procese metilacije DNA (150).

Biološki učinci 5azaC, posebice u *in vitro* sustavima, uvelike su poznati. Ipak, 5azaC se i danas često koristi u istraživanjima i to u okviru istraživanja različitih bioloških i fizioloških procesa, komparacijskim istraživanjima drugih tvari, ali i potencijalne nove upotrebe 5azaC, posebice u medicinskoj praksi (151-153).

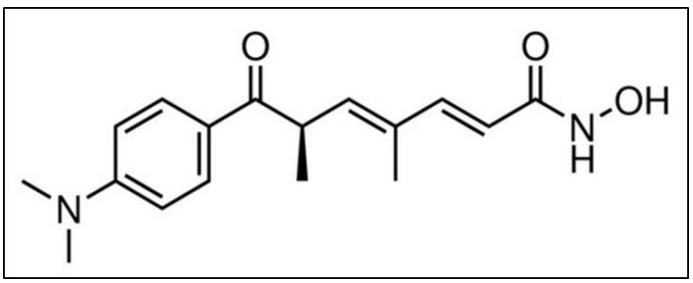
U kulturama embrionalnih stanica 5azaC potiče diferencijaciju i to ponajviše u smjeru hondrogeneze, adipogeneze i miogeneze (154, 155). U kulturama srčanih mišićnih stanica potiče transdiferencijaciju u poprečnoprugaste mišićne stanice (156). Predtretman tkiva predklijetki miša 5azaC, u naknadnoj kulturi s niskom koncentracijom seruma, izazvao je transdiferencijaciju u skeletni mišić, dok je u mediju s dodatkom inzulina i deksametazona inducirao adipogenezu (156). Stromalne stanice koštane srži potiče pak u diferencijaciju upravo

u kardiomiocite (157). Nakon skoro 20 godina istraživanja, dokazano je da kulturi stanica kardiomiosfera 5azaC, u kombinaciji sa askorbinskom kiselinom, snažno potiče diferencijaciju stanica u funkcionalne kardiomiocite i to, čini se, preko supresije WNT signalnoga puta (158). Navedeno istraživanje navodi mogućnost potencijalne primjene 5azaC-a u složenom protokolu liječenju kardiovaskularnih bolesti.

Pored navedenih i ostalih bioloških učinaka u *in vitro* sustavima, čini se da 5azaC da iskazuje specifičan učinak ovisan o vrsti medija korištenog u kulturi, ali i staničnog modela te vrste iz koje stanice potječu. Naime, 5azaC u kulturi zametka štakora *in vitro* inducira diferencijaciju u čitav niz dobro razvijenih derivata mezoderma. Ektodermalna se pak linija razvija primarno u rane neuroblaste, dok endodermalna linija ne pokazuje uopće promjene naspram netretiranih kontrola (159). Suprotno navedenom, u kulturama štakorskog zametka bez seruma, 5azaC inhibira rast, ali i diferencijaciju (137). Različiti učinci zabilježeni su i u istraživanjima utjecaja 5azaC na proliferacijsku aktivnost stanica. Tako je primjerice zabilježen inhibicijski učinak 5azaC na proliferaciju mioblasta (155), ali i indukcija proliferacije mezenhimskih matičnih stanica u kulturi (160). Navedena istraživanja sugeriraju moguće probleme potencijalne primjene 5azaC u onkološkoj i regenerativnoj medicini.

2.5.2 Trihostatin A

Fungicid TSA veže se na aktivno mjesto HDAC što ga čini jednim od najsnažnijih reverzibilnih inhibitora procesa histonske deacetilacije odnosno promotora acetilacije histona i posljedične indukcije ekspresije gena (161) (Slika 17.).



Slika 17. Kemijska struktura Trihostatina A. TSA je prirodni derivat hidroksamske kiseline izolirane iz bakterije roda *Streptomyces*. (Izvor: *STEMCELL Technologies, www.stemcell.com/trichostatin-a.html*)

Premda generalno gledajući potiču gensku ekspresiju, HDACi primarno djeluju antiproliferacijski i proapoptozno te se intenzivno istražuju mogućnosti njihove primjene u okviru onkološke terapije (19, 162-164). U istraživanjima je dokazano i njihovo protuupalno djelovanje te se provode translacijska istraživanja njihove primjene kao imunomodulatora kod niza bolesti poput reumatoidnog artritisa, osteoartritisa, psorijaze, multiple skleroze i reakcije odbacivanja transplantiranog tkiva i organa (162, 165).

Antitumorsko djelovanje TSA dokazano je u nizu istraživanja koja se nastavljaju i danas. Ta se istraživanja oslanjaju na poznate učinke TSA opisane u *in vitro* sustavima: inhibicija proliferacije, indukcija apoptoze i diferencijacije stanica. Tako je, primjerice, opisano usporavanje razvoja fibroze jetrenog tkiva *in vitro*, povezane s povećanim rizikom razvoja hepatocelularnog karcinoma, što je kroz 20 godina istraživanja kulminiralo boljim razumijevanjem mehanizma i potvrdom istog efekta u modelu *in vivo*. Slijede istraživanja potencijalne kliničke primjene TSA s ciljem usporavanja progresije ili čak reverzije fibroze jetre (166, 167).

Istraživanja na stanicama raka gušterače pokazala su da TSA potiče ekspresiju citokeratina i drugih proteina citoskeleta u stanicama raka. TSA potiče keratinizaciju i apoptozu, ali i inhibiciju ekspresije gena povezanih sa sintezom proteina i energetikom stanice. Ukratko, navedena istraživanja ukazuju na proapoptozno i antiproliferacijsko djelovanje TSA u stanicama raka *in vitro* (168).

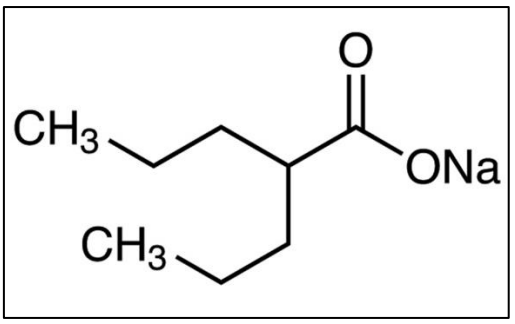
Istraživanja na stanicama karcinoma štitnjače pak pokazala su da TSA, kao i niz srodnih lijekova, smanjuje vijabilnost tumorskih stanica *in vitro* i to primarno, čini se, inhibicijom ekspresije onkogena *HMGA2* i *TTF1* (169). Istraživanja na stanicama raka gušterače upućuje na proapoptozni učinak TSA i to poglavito u matičnim stanicama raka, što uvelike nadahnjuje daljnja istraživanja (170). TSA je u navedenom istraživanju inducirao hiperacetilaciju H3 i H4 te smanjio ekspresiju *HDAC-1*, *HDAC-7*, *HDAC-8*, ali i *DNMT3B* što ukazuje na potencijalnu povezanost TSA sa sustavom metilacije DNA.

Ipak, iako istraživanja upućuju na pozitivne učinke TSA, primarno u indukciji apoptoze tumorskih i tumorskih matičnih stanica, postoje i istraživanja koja upozoravaju na kontroverzno potencijalno kancerogeno djelovanje TSA. Naime, hematopoezne matične stanice iz krvi

pupčane vrpce tretirane TSA ukazuju na blago povišenu proliferaciju koja je u relativno zanemarivom neskladu s opisanim djelovanjem TSA na matične stanice općenito. Međutim, ovo je istraživanje pokazalo da TSA inducira povećanje ekspresije gena *CDKN1C*, *CEBPα*, *HOXA9*, *MN1*, *DLK1* i ostalih gena usko vezanih za leukemiju. Ukratko, postoje upozorenja da TSA može imati i leukemogeno, a potencijalno i prokancerogeno djelovanje (171).

2.5.3 Valproat

Povijest kontinuirane uporabe valproične kiseline (VAL) (engl. *valproic acid*, VPA) u znanosti, a kasnije i medicini, relativno je duga, posebice u usporedbi s drugim farmakološkim tvarima. Valproična kiselina (Slika 18.) korištena je kao organsko otapalo u znanstvenim istraživanjima gotovo 100 godina prije nego je slučajno zabilježen njen pozitivan učinak na konvulzije u animalnom modelu epilepsije inducirane pentilentetrazolom. Ta rana klinička iskustva opisivala su sposobnost valproične kiseline da zaustavi ili prevenira napadaje u pacijenata s generaliziranom epilepsijom što je naposlijetku rezultiralo uvođenjem valproata (VAL) kao lijeka širokog spektra u standardnu terapiju epilepsije. Širenjem primjene VAL u terapiji epilepsije, slučajno se ustanovilo da liječenje epilepsije VAL smanjuje i napadaje migrene u pacijenata s navedenim komorbiditetom. Sličnu povijest ima i zapažanje da VAL ima i antimanijski učinak. Ta su, i ina, zapažanja, preko niza istraživanja, dovela do širenja indikacija za koje se danas u kliničkoj praksi propisuje VAL (172).



Slika 18. Kemijska struktura valproične kiseline. Valproična kiselina je razgranata masna kiselina kratkog lanca i derivat valerične kiseline. Najčešće se koristi u obliku natrijeve soli. (Izvor: *TCI Europe N.V., www.tcichemicals.com/PL/en/p/S0894*)

Ipak, kao i svaki drugi lijek, VAL pokazuje i štetne učinke u pacijenata. Uobičajeni štetni učinci VAL uključuju dobivanje na težini, gastrointestinalne simptome, sedaciju, tremor i blagi porast jetrenih enzima (173). Ozbiljna toksičnost jetre je rijetka kod odraslih osoba, ali zahtjeva kontinuirano promatranje jetrenih funkcija tijekom terapije (174). Mnogi štetni učinci, čini se, povezani su s dozom i mogu se ukloniti smanjenjem doze. Međutim, postoje i iznimno ozbiljne medicinske opasnosti koje su posljedica upotrebe VAL. Tako, primjerice uvođenje valproata u terapiju povećava rizik od samoubojstva (175). VAL je također i teratogen te je posebno povezan s defektom neuralne cijevi. Pojedina istraživanja povezuju izloženost VAL -u *in utero* i sa smanjenjem verbalne inteligencije. Navedeni učinci, uz vjerojatan povećani rizik od sindroma policističnih jajnika, ograničavaju upotrebu valproata kod žena u trudnoći (173).

Upravo istraživanja teratogenog učinka VAL i njegovih analoga te istraživanja mehanizma njihova djelovanja, pokazala su da se teratogeni učinak ostvaruje mehanizmima uključenima i u razvoj tumora odnosno neoplastične transformacije stanica i progresije tumora. Tako su zapravo, otkrivena antitumorska svojstva VAL i njegovih analoga. Ova važna otkrića bila su temelj za razvoj novih smjernica i koncepata u liječenju onkoloških bolesnika. Ipak, dok se farmakokinetičke studije pokazuju konačnima, tek treba, čini se, ponovno ispisati sveobuhvatna farmakodinamička poglavlja koja opisuju djelovanje VAL i njegov učinak na stanične sustave, čovjeka u cjelini, njegovo zdravlje i zdravlje njegovog potomstva (172, 176, 177).

Nakon gotovo pola stoljeća kliničke primjene, otkriveno je da VAL ima iznimno snažan epigenetički učinak (178-180). Taj se učinak pokazuje toliko snažnim da se VAL danas navodi kao primjer u objašnjavanju koncepta „epigenetičke toksičnosti“ (181). Naime, VAL djeluje na enzime ukjučene u histonske posttranslacijske modifikacije. Tako, primjerice, izravno inhibira histonsku deacetilazu 1 (HDAC1). U terapijskim dozama, VAL oponaša inhibitor histonske deacetilaze TSA, uzrokujući hiperacetilaciju histona u genomu stanica u sustavima *in vitro*. Na taj način, VAL potiče reorganizaciju kromatina iz heterokromatina u eukromatin što za posljedicu ima transkripcijsku aktivnost gena koji su prethodno bili transkripcijski inaktivni. Ukratko, VAL inhibirajući HDAC enzime potiče ekspresiju gena (179). Danas je poznato da, dok je TSA inhibitor svih HDAC enzima, VAL inhibira HDAC I i HDAC IIa enzimsku obitelj čime ostvaruje svoj protutumorski učinak (182).

Tako je primjerice dokazano da VAL, kao HDAC inhibitor, suprimira rast stanica raka dojke *in vitro* inducirajući apoptozu stanica i zaustavljajući stanični ciklus u G1 fazi. Ovi efekti

pokazali su se ovisnima o vremenu i koncentraciji valproata. Zabilježeno je povećanje aktivnosti kaspaze-3 i kaspaze-9, ali ne kaspaze-8, te promjena u profilu eksprimiranih gena. Tako je primjerice povećana ekspresija gena *p21*, a smanjena ciklina *D1*. Ukratko, ovi rezultati pokazali su da VAL kao HDACi može suzbiti rast stanica raka induciranjem apoptoze i zaustavljanjem staničnog ciklusa u G1 fazi (183).

Slični rezultati opisani su i u istraživanjima staničnih kultura drugih tumora. Tako je primjerice istraživanje na stanicama raka jajnika pokazalo da se stanična proliferacija smanjuje s rastućom koncentracijom VAL. Analiza staničnog ciklusa pokazala je višu stopu apoptoze i faze G0/G1 staničnog ciklusa u stanicama raka tretiranih valproatom. Dodatno, razine ekspresije proteina WWOX i P27 bile su povišene. Važno je naglasiti da je VAL inhibirao rast ksenotransplantata tumora *in vivo* te ponovno povećao ekspresiju WWOX-a i P27. Autori zaključuju da valproat inhibira maligni potencijal stanične linije karcinoma jajnika HO8910 inhibiranjem stanične proliferacije, ometanjem staničnog ciklusa i promicanjem apoptoze što ga čini potencijalno učinkovitim u kliničkom liječenju raka jajnika (184).

Nadalje, i*n vitro* istraživanja pokazala su da VAL povećava acetilaciju histona H3 unutar *CXCL12* promotora gena čime reaktivira ekspresiju gena *CXCL12* u tri linije raka debelog crijeva. Posljedično se smanjuje migracijska sposobnost stanica raka. U *in vivo* modelima, VAL je smanjio broj crijevnih tumora u *APC* mutantnim miševima za preko 50%. Usporio je rast ksenograftnih tumora te istodobno reaktivirao ekspresiju gena *CXCL12*. Autori zaključuju da su istraživanja VAL od iznimnog kliničkog interesa. Osim što pokazuju opravdanost njihova uvođenja u onkološku terapiju, agensi koji promoviraju ili održavaju acetilaciju histona putem HDAC inhibicije potencijalno mogu pomoći i u smanjenju incidencije primjerice raka debelog crijeva, osobito u obiteljima s visokim rizikom (185). Ovo potonje, iznimno je zanimljivo u paraleli s potencijalnom upotrebom VAL u cilju prevencije razvoja ili barem kliničke manifestacije teratoma i ostalih TZST.

2.5.4 siRNA

RNAi sustav pokušava se translirati u kliničku praksu posebice u okviru antitumorske terapije. Naime, dokazano je da *in vitro* sintetizirane miRNA, siRNA i shRNA (engl. *short hairpin RNA*) molekule, ukoliko specifično sintetizirane, koče translaciju specifičnih mRNA odnosno inhibiraju ekspresiju specifičnog gena od interesa (89).

Ipak, valja spomenuti da je nedavno razvijena nova tehnologija manipulacije sekvencama gena koja mijenjajući samu sekvencu DNA ili interakcijom s metilacijom DNA mijenja ekspresiju gena. Ta se tehnologija temelji na korištenju CRISPR (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) i CRISPR-pridruženih proteina 9 (Cas9) (CRISPR/Cas9). CRISPR/Cas9 sustav prihvaćen je od znanstvene i stručne javnosti bez presedana u nedavnoj znanstvenoj povijesti i to za različite primjene. Za razliku od RNAi, CRISPR/Cas9 sustav pokazuje kiruršku preciznost u uvođenju nasljednih insercija i delecija u eukariotski genom. Kombinacija popularnosti i vrhunskih performansi CRISPR/Cas9 sustava ugrožava status RNAi tehnologije i čak, sukladno mišljenjima ponekih znanstvenika, prijeti RNAi tehnologiju „poslati u povijest“ prije nego li je značajno zaživjela u kliničkoj praksi. Ipak, komparacijske studije upozoravaju na zaključak da će RNAi i dalje zauzimati specifične domene biomedicinskih istraživanja i kliničkih primjena, te da se te dvije tehnologije međusobno nadopunjuju umjesto da se ugrožavaju (186, 187).

Istraživanja kliničke primjene RNAi molekula i modulatora RNAi sustava posebno su osnažena tzv. hipotezom fenomena onkogene ovisnosti odnosno hipotezi prema kojoj se, unatoč poremećajima brojnih gena, tumor razvija i progredira zahvaljujući jednom jedinom ili svega nekolicini transkripcijski aktivnih gena (188). Stoga je prednost lijekova iz ove skupine što mogu specifično ciljati i inhibirati ekspresiju gena odgovornog za progresiju tumora, ukoliko je on poznat (89).

Poznato je da RNAi aktivne tvari zaustavljaju stanični ciklus i induciraju apoptozu tumorskih stanica. Brojne pretkliničke studije potvrdile su uspjeh ovih lijekova u utišavanju gena ključnih za rast, metastaziranje, angiogenezu i rezistenciju tumorskih stanica na konvencionalnu antitumorsku terapiju. Selektivnost ovih lijekova iznimna je u usporedbi s ostalim epigenetičkim, a posebice konvencionalnim onkološkim lijekovima, zbog čega su pojave neželjenih učinaka kod pacijenata rijetke (189).

Unatoč visokoj selektivnosti, niskom riziku od nuspojava te relativno niskoj cijeni proizvodnje, postoje barijere koje priječe široku uporabu RNAi lijekova. Svakako jedna od najvećih prepreka je dostava lijeka do ciljnih stanica i tkiva. Naime, nakon uvođenja u organizam, serumske nukleaze vrlo brzo razgrađuju i uništavaju ove male RNA molekule. Pored navedenog, kada i stignu do ciljnih tkiva, RNAi molekule vrlo teško prolaze kroz staničnu membranu zbog svoje relativno velike molekularne mase i negativnog naboja. Ovi problemi pokušavaju se zaobići

konjugiranjem ovih molekula s raznim nosačima što bi ih učinilo stabilnijima, dovelo do tumorskog tkiva u terapijskoj koncentraciji i omogućilo njihov prodor u stanicu. Smatra se da bi nanotehnologija mogla ponuditi najprihvatljivija rješenja transporta RNAi lijekova te se trenutno uistinu mnogo ulaže u nanotehnološka rješenja u okviru RNAi terapije poput razvoja nanogelova (190).

Poseban problem kod primjene RNAi terapije je imunosni odgovor organizma. Naime, aktivacija interferonskog sustava putem RNA molekula otežava određivanje optimalne doze RNAi lijekova, doze koja bi balansirala između terapijskog učinka i podnošljivosti za pacijenta. Upravo su određivanje terapijske doze i podnošljivosti glavni ciljevi kliničkih studija koja se provode. Za sada, istraživanja pokazuju dobru podnošljivost i niski stupanj toksičnosti ovih lijekova. Stoga se može očekivati kako će liječenje posredovano RNAi molekulama biti primjenjivo u antitumorskoj terapiji budućnosti (90, 190, 191)

2.6 Sustav kultiviranja zametka i model teratoma miša *in vitro*

Nakon oplodnje, zametak prolazi kroz niz procesa ranog embrionalnog razvoja kako bi ostvario vlastiti rast i razvoj. Zatvoren u zonu pelucidu, zametak ne interagira značajno sa stanicama majke i te procese provodi autonomno. Međutim, nakon izlaska iz zone pelucide odnosno implantacije, *in vivo* razvoj zametaka sisavaca ovisan je o okolišu u samom uterusu, gdje mu je za razvoj omogućena, između ostalih, mehanička i nutritivna potpora. Prva fetalno-majčinska interakcija se stvara tijekom implantacije blastociste u uterus. Trofoblast zametka prolazi kroz procese proliferacije i diferencijacije, kao i majčine uterusne decidualne stanice što rezultira nastankom placente. Popratno se zametak povezuje sa žumančanom vrećom pomoću vitelinih žila i kasnije s placentom preko derivata alantoisa (192).

In vitro sustav razvoja zametaka primarno se razvio kao odgovor na problematiku kompleksnog mikrookoliša u uterusu i anatomskih specifičnosti koje ograničavaju izravnu eksperimentalnu manipulaciju zamecima. S vremenom su tehnike unaprijeđene te se u znanstvenim istraživanjima kultura *in vitro* pokazala kao uspješna metoda u kojoj se može manipulirati i čitavim postimplantacijskim zamecima. Ipak, prema Tamu, za uspješnost metode trebaju se zadovoljiti 3 uvjeta (193):

1. Zametak se mora eksplantirati iz uterusa kako bi se moglo provesti promatranje u

eksperimentu.

2. Eksplantirani zametak mora se staviti u uvjete *in vitro* koji će omogućiti da razvoj (rast i morfogeneza) takovog zametka bude periodički komparabilan sa razvojem zametka *in utero*.

3. Eksperiment mora osigurati kontinuirano praćenje razvoja eksplantata kao i mogućnost izravne manipulacije embrionalnim tkivima u svrhu proučavanja razvojnih procesa.

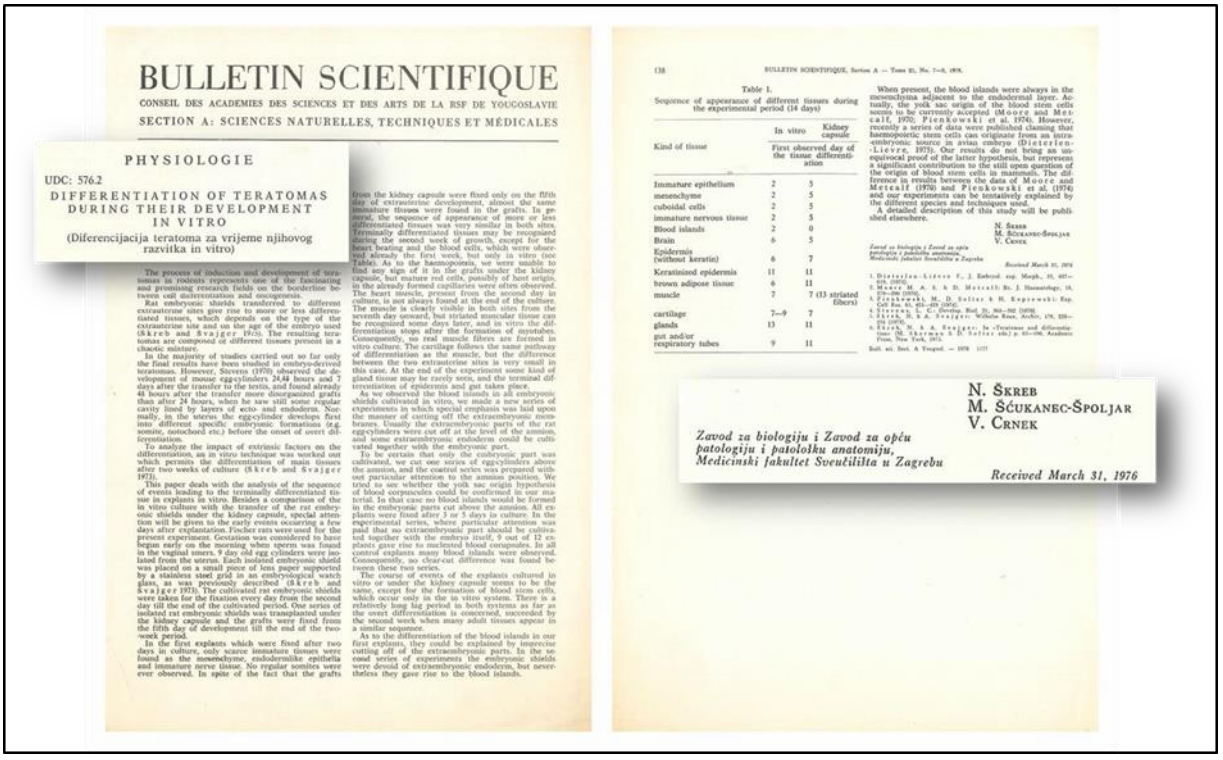
Inicijalni pokušaji kulture postimplantacijskog zametka na stadiju neurule sežu do 30-ih godina prošlog stoljeća (194-196), kada su neurule kultivirane na krvnom ugrušku s dodatkom ekstrakta zametaka, na podlogama tkivnih kultura u cirkulirajućem mediju. Usprkos važnosti navedenih eksperimenata, značajan napredak u razvoju kulture *in vitro* postimplantacijskih zametaka ostvaren je kultiviranjem cijelih zametaka sa embrionalnim ovojnicama (engl. *whole embryo culture*) (197). Štakorski zameci stari 9,5 dana ili mišji zameci stari 8,5 dana izolirani su iz uterusa i kultivirani u 100% štakorskom serumu, odnosno u kombinaciji mišjeg i štakorskog seruma u omjeru 50:50, u staklenim cilindričnim bocama za kulturu. Sustav je uključivao inicijalno tretiranje 2 minute s 5% O_2 (5% CO_2, 90% N_2), a potom agitaciju na rotatoru (30 rpm) na 37 °C. Nakon 24 sata zameci su tretirani sa 20% O_2 (5% CO_2, 75% N_2), potom 30% te naposljetku sa 40% O_2 (5% CO_2, 55% N_2) nakon 28 sati. U ovom modelu analizirani su uvjeti kultiviranja (npr. temperatura, vlažnost) te je optimiran sastav medija za kulturu (198). Navedenim pokusom ustanovljeno je da je sastav seruma jedan od ključnih elemenata *in vitro* sustava (199) kao i cirkuliranje medija, dostupnost nutrijenata i sastav plinova u termostatu (198, 200). Slični uvjeti kultiviranja uz modifikacije u sastavu seruma utvrđeni su i za zametak miša (201). Za zametke koji se razvijaju od stadija gastrulacije do neurulacije pokazao se dobar jednostavni statični ili rotirajući, tzv. *roller* sustav (202-205). Ipak, ako se prati organogeneza, medij za kulturu mora biti u stalnoj cirkulaciji (206).

Ovako ustanovljeni uvjeti za kulturu cijelog zametka bili su dovoljni za istraživanje ranog razvoja postimplantacijskog zametka sisavaca jer *in vitro* razvoj reflektira situaciju *in utero* što je pokazano na razvoju oka (207). U ovom modelu 70-80% zametaka na ranom stadiju primitivne pruge razvilo se do stadija sa 5-10 somita, a 85-90% zametaka na stadiju sa 5-10 somita razvilo se do stadija sa 30-34 somita nakon 48 sati u kulturi. To je omogućilo istraživanje procesa gastrulacije, neurulacije, kraniofacijalne morfogeneze i somitogeneze (193). Ovi modeli pokazali su se iznimno vrijednima u istraživanjima patofiziologije teratogeneze kao i ispitivanje teratogenog učinka i potencijala različitih tvari (208).

Ipak, u navedenim kulturama, zameci su kultivirani s ekstraembrionalnim ovojnicama što utječe

na sastav medija te posljedično mijenja mikrookoliš zametka (199). Zato su uz postojeći model kulture cijelog zametka Škreb i Švajger razvili sustav gdje se zametak kultivira bez ekstraembrionalnih ovojnica, dakle samo gastrulirajući zametak u užem smislu riječi tj. zametni cilindar (tri zametna listića, ektoderm, mezoderm, endoderm). U tom modelu, eksplantirani postimplantacijski zametni cilindri štakora i miša u gastrulacijskom periodu (E7,5 za miša, E9,5 za štakora) mogu se kultivirati do 14 dana na površini vlažnog lećnog papirića na metalnoj mrežici. Tako pozicionirani zameci razvijaju se na granici tekuće i plinovite faze sustava. Ovakav sustav osigurava odlične uvjete za proliferaciju i diferencijaciju derivata zametnih listića u kulturi *in vitro* u prisutnosti seruma kao dodatka mediju (41, 209). Otkriveno je da se i štakorski i mišji zameci bolje razvijaju u štakorskom serumu, jer je za mišje zametke mišji serum toksičan.

Tijekom ta dva tjedna, zameci se razvijaju u trilaminarnom teratomu slične strukture (Slika 19.). U prvom tjednu kulture zameci primarno rastu, a stanice proliferiraju, prolaze kroz rane diferencijacijske procese te se organiziraju u tkiva različitog stupnja diferenciranosti. Tijekom drugog tjedna primarno se nastavljaju diferencijacijski procesi. U tom periodu jedan dio stanica porijeklom iz određenog zametnog lisića dostiže čak i stupanj terminalne diferencijacije. Upravo taj nalaz upozorio je na polivalentnost ovog modela. Naime, pored istraživanja elementarnih razvojnih procesa u sisavaca, ovaj model reprezentativan je *in vitro* model za istraživanje bioloških procesa u okviru biologije tumora posebice TZST odnosno teratoma (210). Stoga je ovaj model priznat kao eksperimentalni *in vitro* model teratoma koji sadrži tkivne derivate triju zametnih listića na različitom stupnju diferenciranosti i u nepravilnom rasporedu (5).



BULLETIN SCIENTIFIQUE

CONSEIL DES ACADEMIES DES SCIENCES ET DES ARTS DE LA RSF DE YOUGOSLAVIE

SECTION A: SCIENCES NATURELLES, TECHNIQUES ET MÉDICALES

PHYSIOLOGIE

UDC: 576.2

DIFFERENTIATION OF TERATOMAS DURING THEIR DEVELOPMENT IN VITRO

(Diferencijacija teratoma za vrijeme njihovog razvitka in vitro)

Table I.

Sequence of appearance of different tissues during the experimental period (14 days)

Kind of tissue	In vitro	Kidney capsule
	First observed day of the tissue differentiation	
Immature epithelium	2	5
mesenchyme	2	5
cuboidal cells	2	5
immature nervous tissue	2	5
Blood islands	2	0
Brain	6	5
Epidermis (without keratin)	6	7
Keratinized epidermis	11	11
brown adipose tissue	6	11
muscle	7	7 (13 striated fibers)
cartilage	7–9	7
glands	13	11
gut and/or respiratory tubes	9	11

N. ŠKREB
M. SĆUKANEC-ŠPOLJAR
V. CRNEK

Zavod za biologiju i Zavod za opću patologiju i patološku anatomiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Received March 31, 1976

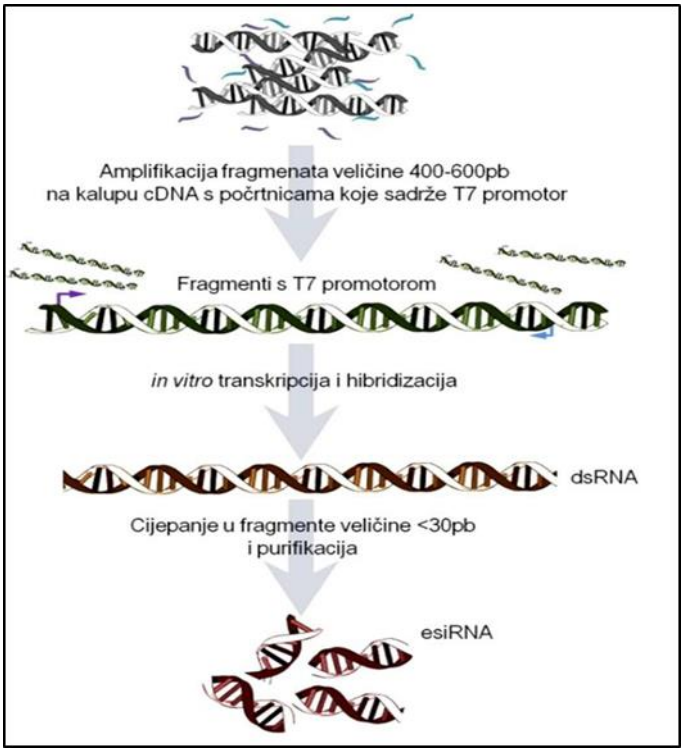
Slika 19. Izvorni opis napredovanja diferencijacije u teratomu *in vitro*. Otisak rada u kojemu se opisuje *in vitro* model kulture gastrulirajućeg zametka kao eksperimentalni model teratoma *in vitro*. (Izvor: *Biblioteka Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*)

3 EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio istraživanja proveden je sukladno pozitivnim propisima Republike Hrvatske i u skladu s pravilima struke koristeći uhodane i optimizirane laboratorijske protokole odnosno upute proizvođača, znanstvene materijale, tehnologiju i infrastrukturu.

3.1 Sinteza esiRNA

Endoribonukleazom pripravljene RNA molekule (engl. *endoribonuclease-prepared siRNA*, esiRNA) sintetizirane su kako bi se komplementarno vezale na glasničke RNA molekule gena *Nanog* (92-532 transkripta XM_132755.3), *Oct3/4* (355-825 transkripta NM_013633.1), *Trrap* (2886-3392 transkripta NM_133901.2) i *Gfp* (132-591 PEGfp-N3 sekvencije). U postupku sinteze esiRNA korištene su početnice odabrane prema podacima RIDDLE baze podataka (211). EsiRNA molekule sintetizirane su prema opisanom protokolu (212, 213) (Slika 20.). RNA su izolirane iz mišjih embrionalnih matičnih stanica (klon 18 1/10). Molekule cDNA, dobivene postupkom reverzne transkripcije, korištene su u prvoj PCR reakciji. Za svaki je navedeni gen napravljena zasebna PCR reakcija s gen specifičnim početnicama (Tablica 1.) pod opisanim uvjetima: 5 ciklusa na temperaturi sparivanja 60 °C, 5 ciklusa na temperaturi sparivanja 62 °C i 25 ciklusa na temperaturi sparivanja 65 °C. Sljedeća PCR reakcija učinjena je korištenjem uobičajenih početnica za dovršenje T7 promotorske sekvencije (Tablica 2.) pod opisanim uvjetima: 40 ciklusa na temperaturi sparivanja (engl. *annealing*) 60 °C.



Slika 20. Prikaz protokola sinteze esiRNA. EsiRNA sintetizirana je uhodanim kućnim laboratorijskim protokolom koristeći tehnologiju sinteze pomoću T7 promotora. (*Ljubaznošću autora Sinčić N.)*

Tablica 1. Popis gena i početnica korištenih u PCR reakcijama sinteze esiRNA. Ovako konstruirane esiRNA komplementarne su ciljnim mRNA gena od interesa prema podacima RIDDLE baze podataka. Koso ispisani segmenti početnica pripadaju sekvenciji T7 promotora, dok masnnim slovima ispisani dijelovi odgovaraju sekvencijama specifičnih za gene od interesa.

BROJ ESEJA	GEN	POČETNICE	
1.	*Oct3/4*	F	5'-*TCACTATAGGGAGAGAG***AGGGAACCTCCTCTGAGC**-3'
		R	5'-*TCACTATAGGGAGAC***TGATTGGCGATGTGAGTGAT**-3'
2.	*Nanog*	F	5'-*TCACTATAGGGAGAG***ATGCCTGCAGTTTTTCATCC**-3'
		R	5'-*TCACTATAGGGAGAC***GTGCTGAGCCCTTCTGAATC**-3'
3.	*Trrap*	F	5'-*TCACTATAGGGAGAG***GGTCATCTACGAAGGCCTCA**-3'
		R	5'-*TCACTATAGGGAGAC***TGGGCATTTAGTTCGAGGTC**-3'
4.	*Gfp*	F	5'-*TCACTATAGGGAGAG***CCTGAAGTTCATCTGCACCA**-3'
		R	5'-*TCACTATAGGGAGAC***TGCTCAGGTAGTGGTTGTCG**-3'

Tablica 2. Popis početnica za dovršenje T7 promotorske sekvencije. Kako bi se dovršila replikacija T7 promotorske regije korištene su uobičajne početnice za ovaj postupak, a prikazane u ovoj tablici.

POČETNICE	
F	5'-GCTAATACGACTCACTATAGGGAGAG-3'
R	5'-GCTAATACGACTCACTATAGGGAGAC-3'

Dobiveni amplikoni korišteni su u postupku transkripcije *in vitro* čime su dobivene dvolančane molekule RNA. Uslijedio je korak kidanja dvolančanih RNA molekula pomoću *E. coli* RNaze3 (5 μg na 100 μL reakcijske otopine). Dobiveni su esiRNA fragmenti veličine <25 pb. Veličina fragmenata provjerena je elektroforezom u 4% agaroznom gelu. Molekule esiRNA precipitirane su izopropanolom i naposljetku otopljene u dH2O.

3.2 Kultura tumora zametnih stanica *in vitro*

U istraživanju su korištene ženke i mužjaci visokosrođene populacije laboratorijskog miša soja C3H u dobi od 3-6 mjeseca standardne mase i kontroliranog optimalnog zdravstvenog stanja, iz vlastitog uzgoja. Na njima nije izvođena nikakva istraživačka manipulacija. Mužjaci su bili korišteni isključivo u postupku parenja s ciljem dobivanja zametaka i niti jedan nije eutanaziran zbog potreba ovog istraživanja. Gravidne su ženke bile eutanazirane kako bi se izolirali gastrulirajući zameci.

3.2.1 Izolacija zametaka

Uzorkovanje zametaka iz laboratorijskih životinja provedeno je na uzgojenim miševima iz Nastambe za laboratorijske životinje Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (HR-POK-010), u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/06), Izmjenama i dopunama Zakona o zaštiti životinja (NN 37/13) i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13). Prije početka istraživanja dobiveno je pozitivno rješenje nadležnog Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te Ministarstva poljoprivrede RH. U istraživanju je korišteno ukupno 102 ženki laboratorijskog miša soja C3H

iz vlastitog uzgoja, starosti od 2.5 do 3.5 mjeseca te tjelesne mase oko 25 g. Mužjaci su korišteni isključivo za parenje te na njima nije provedena nikakva eksperimentalna manipulacija.

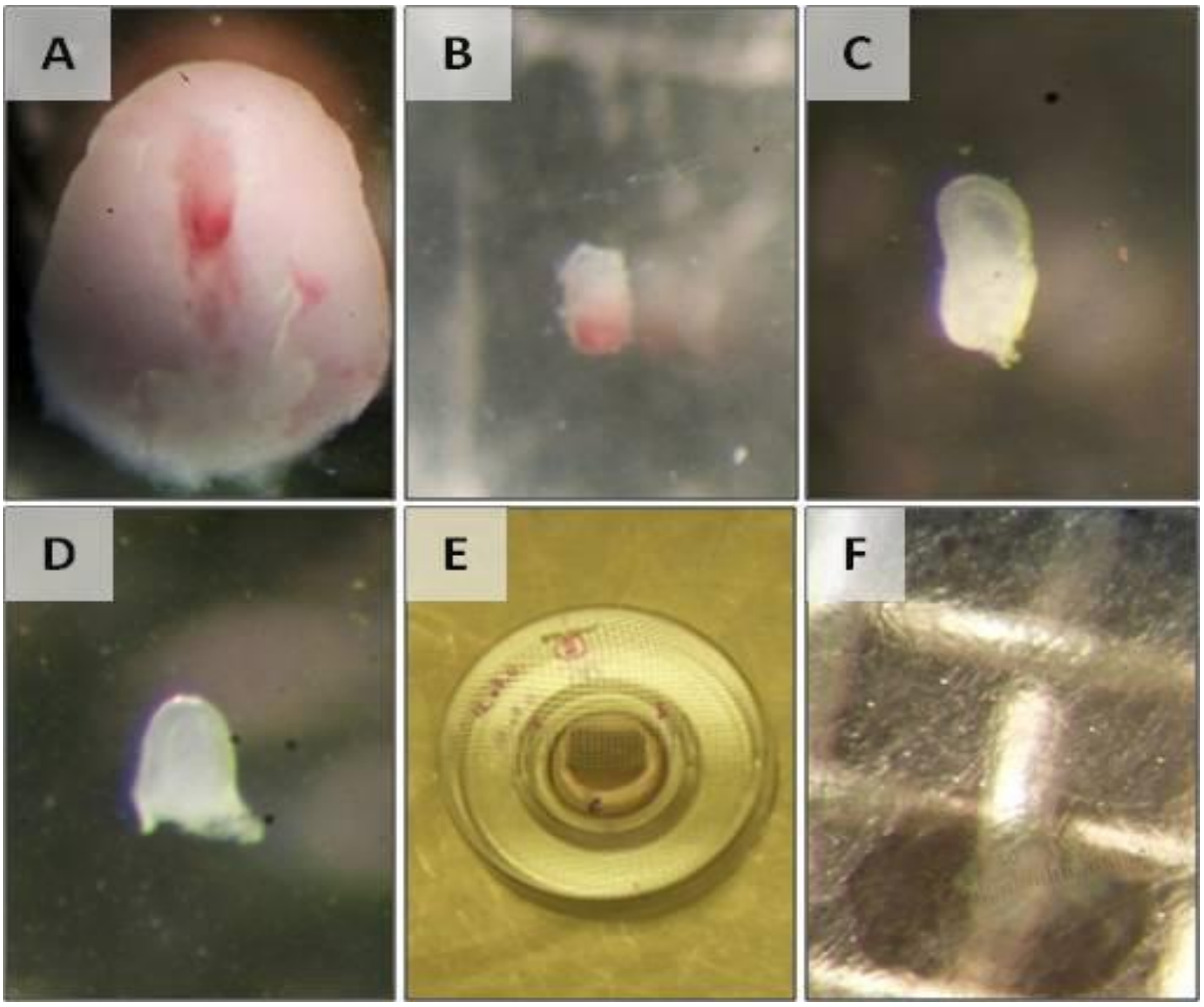
Za dobivanje zametaka u fazi gastrulacije, mužjaci su uvečer stavljeni na parenje u kavez sa ženkama, a sutradan ujutro određena je prisutnost vaginalnog čepa. Dan nalaza vaginalnog čepa označen je kao 0. dan graviditeta, odnosno 0,5. dan starosti zametka.

Ujutro 7. dana trudnoće zameci su stari 7,5 dana i nalaze se u stadiju gastrulacije. Ženke su žrtvovane cervikalnom dislokacijom. Trbušna stijenka dezinficirana je 70% etanolom radi aseptične izolacije uterusa. Otvaranjem trbušne stijenke pristupilo se uterusu. Nakon odvajanja od mezometrija, rogovi uterusa su izolirani i isprani u sterilnom PBS-u u Petrijevoj zdjelici. Na rogovima uterusa uočavaju se zadebljanja zbog deciduoma.

Daljnji postupak izolacije rađen je u sterilnim uvjetima pod binokularnom lupom. Urarskim pincetama otvoren je uterus i izolirani su deciduomi (Slika 21.). Pojedini deciduom je pažljivo otvoren finim urarskim pincetama čime se pristupilo zametnom cilindru. Nakon što je zametni cilindar izoliran, pincetom je odvojen parijetalni list žumanjčane vreće s Reichertovom membranom od ektoplacentalnog konusa. Zatim su zameci pomoću "*braking*" pipete prebačeni u urno staklo s čistim PBS-om. Nadalje, zametak je prerezan wolframovim iglicama na razini amniona čime je odvojen ekstraembrionalni dio od zametnog cilindra. Zametni su cilindri pomoću braking pipete prebačeni u urno staklo s čistim PBS-om.

U ovom istraživanju upotrijebljen je zametni cilindar, no u daljnjem tekstu koristi se riječ zametak.

Određeni broj zametaka pohranjen je bez dodavanja krio-prezervativa u krio-epruvete u tekući dušik za potrebe daljnjih analiza. Ta je eksperimentalna skupina označena kao „zametak“ ili oznakom „Z“.



Slika 21. Prikaz *in vitro* pokusa. A) Deciduom otvoren u medijani s prikazom zametka. B) Izolirani zametak s ektoplacentalnim konusom. C) Zametak s ekstraembrionalnim dijelom. D) Zametni cilindar u stadiju gastrule. E) Sustav za kulturu zametaka s centralnim bunarom ispunjenim medijem u koji je pozicionirana potporna mrežica prekrivena lećnim papirićem na koji se nasađuje zametak. F) Zametni cilindar nasađen u sustav za kulturu zametka. (Izvor: *Zbirka slika Zavoda za Biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*)

3.2.2 Tretiranje zametaka

Nakon izolacije i ispiranja u PBS, zameci su pod binokularnom lupom (disekcijskim mikroskopom) pomoću *braking* pipete prebačeni u urna stakla s 250 μL eksperimentalnog medija u cilju tretiranja zametaka epigenetički aktivnim tvarima. Eksperimentalni mediji predstavljaju osnovni kultivacijski medij (Eaglov minimalni esencijalni medij-MEM) sa štakorskim serumom u odnosu 1:1, vidi 3.2.3) obogaćen sa pojedinom epigenetički aktivnom supstancijom (Tablica 3.). Eksperimentalni mediji obogaćeni *esi*RNA molekulama

moraju sadržavati i dodatak transfekcijskog agensa Lipofectamina 20000 (vidi niže). Eksperimentalni mediji bili su svježe priređeni unutar 4 sata prije tretiranja zametaka. Tretiranje epigenetički aktivnim tvarima trajalo je 120 minuta bez agitacije na sobnoj temperaturi u sterilnim uvjetima. Po isteku vremena tretiranja, zameci su prebačeni u sustav kultiviranja zametaka *in vitro* na granicu tekućine i zraka.

Tablica 3. Eksperimentalni mediji korišteni u *in vitro* pokusima. Izolirani zameci tretirani su u eksperimentalnim medijima s različitim aktivnim tvarima u prikazanim koncentracijama.

Eksperimentalni medij (skupina)	Epigenetički aktivna tvar	Koncentracija	Proizvođač	Medij
1	5-azacitidin	30 μM	Sigma-Aldrich	Kultivacijski medij
2	VAL	1 mM	Sigma-Aldrich	Kultivacijski medij
3	TSA	33 nM	Sigma-Aldrich	Kultivacijski medij
4	esi*Oct*3/4	12,5 pmol	Vlastita sinteza	Kultivacijski medij
5	esi*Nanog*	12,5 pmol	Vlastita sinteza	Kultivacijski medij + L2000
6	esi*Trrap*	12,5 pmol	Vlastita sinteza	Kultivacijski medij + L2000
7	esi*Gfp*	12,5 pmol	Vlastita sinteza	Kultivacijski medij + L2000

Eksperimentalni mediji obogaćeni esiRNA molekulama, pored kultivacijskog medija, sadržavali su i transfekcijski agens Lipofectamin 20000 (L2000) (Invitrogen, Cat. No. 11668-019) u finalnoj koncentraciji od 0,25%. Ti su mediji izrađeni prema prilagođenim uputama proizvođača: L2000 (0.25%/ukupni volumen po urnom staklu) i svježi sterilni Eaglov minimalni esencijalni medij (49,4 μL po urnom staklu) pomiješaju se u L-MEM otopinu koja se inkubira

5 minuta na sobnoj temperaturi. U međuvremenu pripremljena je esiRNA-MEM otopina. Volumen koji sadrži esiRNA (12,5 pmol) pomiješan je s MEM-om do ukupnog volumena 50 µL esiRNA-MEM otopine. Otopine L-MEM i esiRNA-MEM međusobno su zamiješane unutar 25 minuta od pripreme otopine L-MEM. Miješanjem navedenih otopina dobivena je esiRNA-L-MEM (100 µL po urnom staklu) koji je inkubiran 20 minuta na sobnoj temperaturi uz povremenu laganu trešnju. Treća komponenta eksperimentalnog esiRNA medija za tretman, S-MEM (150 µL po urnom staklu), dobiven je miješanjem MEM-a i svježeg štakorskog seruma u omjeru 5:1. Naposljetku, eksperimentalni esiRNA medij dobiven je mješanjem S-MEM-a i esiRNA-L- MEM-a (esiRNA+kultivacijski medij+L2000).

Kontrolna skupina zametaka bila je podvrgnuta istom eksperimentalnom protokolu tretiranja, ali je umjesto eksperimentalnog korišten samo kultivacijski medij (vidi 3.2.3) bez epigenetički aktivne supstance.

3.2.3 Kultiviranje zametka *in vitro*

Za kultiviranje zametaka *in vitro* upotrijebljene su jednokratne sterilne plastične Petrijeve zdjelice za kulturu organa (Falcon 3037) promjera 60x15 mm sa zdencem u sredini. U udubinu zdenca postavljena je nehrđajuća mrežica trokutastog oblika. Mrežica je savijenim vrhovima bila odignuta 5 mm od dna zdenca. Na mrežicu je polažen trokutasti komadić odmašćenog poroznog lećnog papira čiji su vrhovi slobodno padali preko rubova mrežice u medij. U zdenac je uliveno 250 µL kultivacijskog medija (vidi niže). Na papir su "*braking*" pipetom nasađena po 4 zametka nakon provedenog tretmana. Dan postavljanja zametaka u sustav *in vitro* označen je 0. danom kulture. U prstenastu udubinu oko zdenca ulivena je sterilna dH2O koja je smanjila isparavanje kultivacijskog medija tijekom kultiviranja u inkubatoru. Eksplantati su proveli 7 dana u inkubatoru na 37 °C u atmosferi koja sadrži 5% CO2 i 95% zraka uz maksimalnu zasićenost vlagom. Tijekom kulture, kultivacijski se medij mijenjao svakih 48 sati. Po isteku 7 dana kultiviranja, eksplantati su podvrgnuti primarnoj obradi ovisno o potrebama daljnjih histoloških ili molekularnih analiza.

Osnovni kultivacijski medij bio je Eagleov minimalni esencijalni medij (MEM) sa štakorskim serumom u omjeru 1:1. Eaglov MEM jest kemijski definirani medij bez proteina, a sadrži 13 aminokiselina, 8 vitamina, glukozu, penicilin, streptomicin i fenolsko crvenilo (indikator pH), te Hanksove soli za održavanje neutralnog pH konstantnim. Čuvan je na +5 °C,

a svaka tri tjedna mu je dodan L-glutamin u koncentraciji od 29,2 mg/100 mL MEM-a budući da se L-glutamin s vremenom raspada. Štakorski je serum dobiven od tri mjeseca starih mužjaka štakora soja Fisher nakon anesteziranja u CO_2 komori. U aseptičnim uvjetima otvorena je trbušna šupljina, preparirana abdominalna aorta te je iz njene bifurkacije izvađena krv u sterilnu epruvetu s Na-citratom kao antikoagulansom. Životinja je iskrvarena do uginuća. Puna je krv potom centrifugira na 4000 rpm 15 minuta. Nakon centrifugiranja serum je inaktiviran zagrijavanjem na 56 °C kroz 30 minuta te steriliziran filtriranjem kroz 0,22 μm Milipore filter, alikvotiran i čuvan na -20 °C.

3.3 Mjerenje rasta tumora u kulturi *in vitro*

Rast pojedinog tumora praćen je mjerenjem njegovog većeg (dV) i manjeg (dM) promjera pomoću okularnog mikrometra u binokularnoj lupi. Promjeri su mjereni neposredno nakon nasađivanja u sustav *in vitro* 0. dana kulture te svakodnevno tijekom sljedećih sedam dana kulture *in vitro.* Korištenjem dobivenih vrijednosti promjera tumora, izračunate su površine eksplantata za svaki dan trajanja kulture *in vitro* prema jednadžbi:

$$P_T = dV \times dM \times 28^2 \times \pi/4$$

P_T označava površinu tumora, a dV i dM veći i manji promjer.

Vrijednosti površina tumora tijekom rasta tumora normirane su na vrijednost površine dotičnog eksperimentalnog teratoma (zametka) dobivene 0. dana kultiviranja prema jednadžbi:

$$P^n_{TX} = P_{TX}/P_{E0}$$

P^n_{TX} označava normiranu vrijednost površine tumora X dana kultiviranja, P_{TX} označava realnu vrijednost površine tumora X. dana kultiviranja, a P_{T0}. vrijednost realne površine dotičnog tumora 0. dana kultiviranja. Grafički su u rezultatima prikazane vrijednosti P^n_{TX}.

3.4 Eksplantacija teratoma i klasična histologija

Tumori dobiveni kultivacijom zametaka *in vitro* posljednjeg su dana kulture (7. dan) isprani u PBS-u te pod mikroskopom odvojeni od lećnog papirića. Potom su stavljeni u fiksativ St. Marie (96% etanol, 1% ledena octena kiselina) koji je bio ohlađen na +4 °C. Nakon 24 sata isprani

su u PBS-u, dehidrirani provođenjem kroz uzlazni niz etanola (96% i 100%, sve 2 x 20 minuta) i benzol (1 x 30 minuta), ksilol (1 x 30 minuta) te uklopljeni u parafin na 56 °C. Parafinski su blokovi potom čuvani na +4 °C. Rezanjem parafinskih blokova na rotacijskom mikrotomu dobiveni su serijski rezovi debljine 5 μm koji su položeni na silanizirana stakla. Rezovi predviđeni za klasična histološka bojanja pohranjeni su na 37 °C dok su rezovi predviđeni za imunohistokemijske metode bojanja čuvani na +4 °C.

U izradi HE histoloških preparata korišteni su kiseli hemalaun po Mayeru (1,5 g hematoxylin, 1000 mL dH_2O, 0,2 g $NaJO_3$ ili KJO_3, 50,0 g $KAl(SO_4)_2$, 50,0 g $C_2H_3Cl_3O_2$, 1,0 g limunska kiselina) i 0,5% eozin uz dodatak kapi ledene octene kiseline.

HE histološki preparati tkiva uklopljenih u parafin izrađeni su prema sljedećem protokolu: ksilol I. (99%) 5 -10 minuta, ksilol II. (99%) 5 – 10 minuta, etanol (100%) I. 4 – 5 minuta, etanol (100%) II. 4 – 5 minuta, etanol (96%) I. 4 – 5 minuta, etanol (96%) II. 4 – 5 minuta, etanol 70% I. 4 – 5 minuta, dH2O 4 – 5 minuta, hemalaun 3 minute, ispiranje u dH2O, ispiranje u vodovodnoj vodi (vH2O), vH2O 20 – 30 minuta, dH2O 5 minuta, eozin 0,5 – 1 minuta, ispiranje u etanolu (70%) I., ispiranje u etanolu (70%) II., ispiranje u etanolu (96%) I., ispiranje u etanolu (96%) II., etanolu (100%) I. 0,5 – 1 minuta, etanolu (100%) II. 0,5 – 1 minuta, ksilol (99%) I. 0,5 minute, ksilol (99%) II. 0,5 minute, ksilol (99%) III. 10 minuta, ksilol (99%) IV. 20 minuta. Obojeni histološki preparati uklopljeni su u Kanada balzam te sušeni u termostatu na 37°C kroz 48 sati.

3.5 Analiza ekspresije gena na razini proteina imunohistokemijskom metodom i morfometrijom

Analiza ekspresije gena od interesa na razini proteina provedena je detekcijom prisutnosti proteina u tkivu tumora metodom imunohistokemije, a dobiveni su signali kvantificirani metodom morfometrije.

3.5.1 Imunohistokemija

Na histološkim preparatima detektirani su proteinski produkti pomoću specifičnih primarnih

protutijela (Tablica 4.) upotrebom peroksidaza–anti-peroksidaza metode uz vizualizaciju DAB kromogenom (diamino benzidin tetraklorid) (DAKO).

Imunohistokemijski preparati tkiva uklopljenih u parafin izrađeni su prema sljedećem protokolu: ksilol I. (99%) 5 -10 minuta, ksilol II. (99%) 5 – 10 minuta, etanol (100%) I. 4 – 5 minuta, etanol (100%) II. 4 – 5 minuta, etanol (96%) I. 4 – 5 minuta, etanol (96%) II. 4 – 5 minuta, etanol (70%) I. 4 – 5 minuta, dH2O 4 – 5 minuta, PBS 10 minuta, vodikov peroksid (3%) 5 minuta u mraku, PBS 5 minuta, serum (10%) 30 minuta (Tablica 5.), isprati u PBS-u, BSA (Sigma) (4%) 30 minuta, primarno protutijelo (Tablica 4.) u otopini BSA (1%) 75 minuta na sobnoj temperaturi, PBS 5 minuta tri puta, odgovarajuće biotinilirano sekundarno protutijelo (Tablica 6.) 20 minuta na sobnoj temperaturi, PBS 5 minuta tri puta, streptavidin konjugiran s peroksidazom iz repe (engl. horseradish peroxidase, HRP) (Dako) (0,33%) 15 minuta, PBS 5 minuta tri puta, DAB kromogen 1 minuta, dH_2O 10 minuta, hemalaun 3 minute, ispiranje u dH2O, ispiranje u vH_2O, vH2O 20 – 30 minuta, dH_2O 5 minuta, ispiranje u etanolu (70%) I., ispiranje u etanolu (70%) II., ispiranje u etanolu (96%) I., ispiranje u etanolu (96%) II., etanol (100%) I. 0,5 – 1 minuta, etanol (100%) II. 0,5 – 1 minuta, ksilol (99%) I. 0,5 minuta, ksilol (99%) II. 0,5 minuta, ksilol (99%) III. 10 minuta, ksilol (99%) IV. 20 minuta. Obojeni imunohistokemijski preparati uklopljeni su u Kanada balzam te sušeni u termostatu na 37°C 48 sati.

Histološki preparati koji tijekom imunohistokemijskog protokola nisu inkubirani s primarnim protutijelima korišteni su kao negativne kontrole.

3.5.2 Morfometrija

Svi su preparati pregledani pod malim povećanjem (40X). Procjena imunopozitiviteta je utvrđena na velikom povećanju (200X) pod svjetlosnim mikroskopom tehnikom semikvantitativne analize. Procjena imunopozitiviteta stanica temeljila se na postotku pozitivnih stanica: 0 (<2%), 1 (2-10%), 2 (>10%). Svi preparati bili su pregledani neovisno i od strane iskusnog patologa (Ulamec M., KBC Sestre Milosrdnice) i pristupnika, nakon usklađivanja kriterija. Sve nedoumice i razlike rješavane su ponovnim pregledom i usklađivanjem. Prilikom analize lokalizacije imunohistokemijskog signala, bili su konzultirani hemalaun- eozinski preparati.

Tablica 4. Popis primarnih protutijela korištenih u analizi ekspresije gena metodom imunohistokemijske (IHC) analize tkiva. Za potrebe analize intenziteta proliferacije, apoptoze i diferencijacije stanica metodom IHC korišten je niz primarnih protutijela sukladno optimiziranim koncentracijama.

ANTIGEN	BILJEG	PODRIJETLO (IZOTIP) PROTUTIJELA	RAZRJEĐENJE	KATALOŠKI BROJ	PROIZVOĐAČ
Ki-67	proliferacije	zec (poliklonalno)	1:500	ab15580	Abcam
Kaspaza-3 (aktivna forma)	apoptoze	zec (poliklonalno)	1:300	cst#9661	Cell Signaling
Gfap	matičnih stanica ektoderma	zec (poliklonalno)	1:300	ab68428	Abcam
Neurofilament	matičnih stanica ektoderma	zec (poliklonalno)	1:500	ab40796	Abcam
Nestin	matičnih stanica neuroektoderma	miš (monoklonalno)	1:1000	ab6142	Abcam
Citokeratin-15	diferenciranih stanica dermoektoderma	zec (monoklonalno)	1:100	ab52816	Abcam
Hnf4α	matičnih stanica endoderma	miš (monoklonalno)	1:50	ab41898	Abcam

Tablica 5. Popis seruma korištenih u analizi ekspresije gena metodom imunohistokemijske analize tkiva. Kako bi se spriječila vizualizacija lažno pozitivnog IHC signala, korištena je uobičajna metoda inkubacije tkiva serumom adekvatnim sukladno korištenom sekundarnom protutijelu.

PODRIJETLO KORIŠTENOG SEKUNDARNOG PROTUTIJELA	PODRIJETLO ODGOVARAJUĆEG SERUMA	PROIZVOĐAČ
zec	zec	Imunološki zavod, Zagreb, Hrvatska
koza	koza	Imunološki zavod, Zagreb, Hrvatska

Tablica 6. Popis sekundarnih protutijela korištenih u analizi ekspresije gena metodom imunohistokemijske analize tkiva. Sukladno korištenim primarnim protutijelima, korištena su adekvatna sekundarna protutijela konjugirana s biotinom.

ANTIGEN	KONJUGAT	PODRIJETLO (IZOTIP) PROTUTIJELA	RAZRJEĐENJE	KATALOŠKA OZNAKA	PROIZVOĐAČ
mišja protutijela	Biotin	Zec (poliklonalno)	1:1000	Ab97046	Abcam
zečja protutijela	Biotin	koza (poliklonalno)	1:1000	Ab97051	Abcam

3.6 Analiza ekspresije gena na razini proteina metodom otiska po Westernu

Kako bi se osigurala dovoljna količina tkiva za potrebe analize proteina metodom otiska po Westernu, tumori tretirani istom epigenetički aktivnom tvari sabrani su u jedinstveni uzorak.

3.6.1 Referentni uzorak eksperimentalnog teratokarcinoma miša *in vivo*

Za potrebe analize ekspresije gena na razini proteina metodom otiska po Westernu, korišten je arhivski uzorak eksperimentalnog teratokarcinoma (TCa) miša *in vivo*, dobiven transplantacijom izoliranog zametnog cilindra u stadiju gastrulacije pod čahuru bubrega singeničnog odraslog miša. Nakon 28 dana po transplantaciji zametnog cilindra, miš primatelj bio je žrtvovan i tumor izoliran te pohranjen na -80 °C, a sve sukladno standardnoj metodi dobivanja eksperimentalnog TCa u miša *in vivo* (214).

3.6.2 Homogenizacija tkiva

Za potrebe analize proteina metodom otiska po Westernu, sedmi dan kulture *in vitro* lećni je papir s tumorima pincetom prebačen u Petrijevu zdjelicu s PBS-om. Nakon 5 minuta ispiranja u većem volumenu PBS-a na sobnoj temperaturi uz laganu agitaciju, tumori su pod binokularnom

lupom uz pomoć oštrice skalpela pažljivo odignuti s lećnog papira i prebačeni u sterilnu epruvetu volumena 0,5 mL. U epruvetu je prethodno stavljeno 100 μL homogenizacijskog pufera za radioimunoprecipitacijsku analizu (RIPA) (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 0,5% Na-Deoxycholate, 1% TX-100, pH 8,0) uz dodatak 1% 0,5 M EDTA pH 8,0 i 4% koktela inhibitora proteaza (Complete EDTA-free Protease Inhibitor, Roche). U jednu epruvetu zbirno je sabrano između 35 i 40 jednako tretiranih tumora kako bi se osigurala dovoljna količina proteina za analizu, budući da je analiza ekspresije gena na proteinskoj razini metodom otiska po Westernu izrađena korištenjem jednog zbirnog uzorka po eksperimentalnoj grupi. Tijekom prikupljanja tumora, već prikupljeni tumori u epruvetii s puferom čuvani su na -80 °C. Prilikom sabiranja novih tumora, kolekcijska je epruveta bila držana na ledu što je omogućavalo lagano otapanje homogenizacijskog pufera, ali i održavanje ukupnog uzorka na niskoj temperaturi. Po dovršetku prikupljanja novih tumora (maksimalno trajanje postupka je bilo jedan sat), kolekcijska je epruveta kratko centrifugirana i pohranjena na -80 °C. Po dovršetku prikupljanja tumora, u svaku kolekcijsku epruvetu dodano je 10 sterilnih staklenih kuglica promjera 1,0-1,51 mm (Retsch). Homogenizacija je provedena na vibracijskom homogenizatoru (Bertin) u trajanju od 2 minute na 5000 rpm.

3.6.3 Mjerenje koncentracije proteina

Odmah nakon homogenizacije, određena je koncentracija proteina u homogenatima metodom pomoću bicinkoninične kiseline (BCA, Sigma) (215). U tu svrhu po 5 μL homogenata razrijeđeno je s dH_2O do konačnog volumena 25 μL (razrjeđenje 1:5). Uzorci su inkubirani 30 minuta na 37 °C s 200 mL otopine dobivene miješanjem BCA s 4%-tnom otopinom $CuSO_4x5H_2O$ (Sigma) u volumnom omjeru 8:1. Nakon što su uzorci ohlađeni na sobnu temperaturu, intenzitet obojenja otopine izmjeren je pri valnoj duljini od 562 nm na spektrofotometru Uvikon 860 (Kontron Instruments). Koncentracija proteina u uzorcima očitana je iz baždarnog pravca. Kao standardna otopina proteina rabljena je otopina BSA u dH_2O (područje koncentracija 100 – 1000 μg/mL, odnosno 0,01 – 1,0 mg/mL). Uzorci standardne otopine, kao i otopine uzoraka, priređeni su i očitani u duplikatu. Nakon mjerenja koncentracije, koncentracije proteina uvećane su u vakuumskom koncentratoru (Eppendorf) 20 minuta na 30 °C. Krajnja količina proteina u uzorku izračunata je kao umnožak izmjerene koncentracije i volumena.

3.6.4 SDS elektroforeza i metoda otiska po Westernu

Ovisno o krajnjoj koncentraciji, izračunati volumen homogenata prebačen je u novu sterilnu epruvetu 1,5 mL te razrijeđen sa homogenizacijskim puferom kako bi se dobio jednak ukupni volumen od 35 µL i jednaka krajnja koncentracija od 1,6 µg/µL u svim uzorcima. Tako normalizirani homogenati iste koncentracije korišteni su dalje u analizama, a dodan im je odgovarajući volumen Laemmli pufera 4X (0,1875 M Tris HCl, 20% glicerol, 5% β-merkaptoetanol, 6% SDS, bromfenol plavo [Sigma] 0,1%, u dH_2O, pH 6,8) do konačnog volumena od 47 µL (odnosno konačne koncentracije proteina 1,2 µg/µL). Tako priređeni uzorci prokuhani su 5 minuta na 96 °C i pohranjeni na -20 °C do daljnje upotrebe.

Priređeni uzorci normaliziranih inaktiviranih homogenata tkiva podvrgnuti su diskontinuiranoj denaturirajućoj gel-elektroforezi proteina provedenoj u 5% sabijajućem i 15% razdvajajućem poliakrilamidnom gelu, debljine 0,5 mm, prema metodi po Laemmliju (216). Pritom je korišten Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad). U pojedinu je jažicu unijeto po 15 µL uzorka. Uzorak kaleidoskopskog proteinskog markera Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards (BioRad) nanošen je u volumenu od 5 µL.

Elektroforezom razdvojeni proteini prenešeni su na PVDF Immobilon membranu (Millipore) u uređaju za vlažan elektroforetski prijenos Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) sukladno uputama proizvođača u trajanju od 45 minuta. Membrane su potom uzdužno razrezane na nekoliko dijelova kako bi trake PVDF Immobilon membrane uključivale područje očekivanog položaja proteina od interesa.

Trake membrana su inkubirane 1 sat u puferu za blokiranje membrane [3% BSA (Sigma) u TBST puferu: 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20 (Roth), u dH_2O, pH 7,5], u svrhu sprječavanja nespecifičnog vezanja proteina na slobodna vezna mjesta na membrani. Potom su trake membrana, izrezane skalpelom na staklenoj podlozi, izložene specifičnim primarnim protutijelima u određenim koncentracijama (Tablica 7.) na +4 °C uz kontinuirano gibanje na treskalici kroz 24 sata. Sva primarna protutijela priređena su u otopini 3% BSA/TBST. Membrane su zatim isprane (3 puta po 15 min) u puferu TBST te potom izložene vezanju odgovarajućeg sekundarnog protutijela (Tablica 7.) na sobnoj temperaturi uz kontinuirano gibanje tijekom 45 minuta na sobnoj temperaturi. Po ispiranju membrane 3 puta po 15 minuta u puferu TBST, iste su inkubirane s reagensom za pojačanu kemiluminiscenciju

Immobilon Western (Millipore) prema uputama proizvođača, a zatim su vizualizirane korištenjem ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) i računalnog programa Image Lab™ 6.0 (Bio-Rad). Isti računalni program korišten je za analizu denzitometrijskog signala po principu: dobivena denzitometrijska vrijednost razine pojedinog analiziranog proteina u uzorku normirana je na relativnu vrijednost razine signala referentnog proteina (Histon H2B ili α-Tubulin), a dobivena vrijednost normirana na standardni uzorak (eksperimentalni TCa miša *in vivo*) prema jednadžbi:

$$CUX = DUX \times DSH/DUH \times DSX$$

pri čemu CUX označava razinu proteina od interesa u analiziranom tkivu, DUX denzitometrijsku vrijednost razine proteina od interesa u analiziranom uzorku, DSH denzitometrijsku vrijednost razine referentnog proteina u standardnom uzorku, DUH denzitometrijsku vrijednost razine referentnog proteina u analiziranom uzorku, a DSX denzitometrijsku vrijednost razine proteina od interesa u standardnom uzorku.

Dobiveni CUX svake skupine dalje je normiran na CUX kontrolne skupine, a dobivene su vrijednosti dalje grafički prikazane i opisane u rezultatima.

Ukoliko je bilo potrebno, membranska je traka bila izložena postupku uklanjanja protutijela nakon vizualizacije, kako bi se ista membrana iskoristila za detekciju drugog proteina pomoću adekvatnog protutijela. Postupak uklanjanja protutijela proveden je sukladno uobičajenom protokolu: membrana je inkubirana 45 minuta na 50 °C uz laganu agitaciju u otopini za uklanjanje protutijela (20 mL 10% SDS, 12,5 mL 0,5M Tris-HCl, 67,5 mL H_2O, 0,8 mL β-merkaptoetanol), potom isprana 5 puta u TBST puferu u trajanju od 5 minuta te naposljetku blokirana u 3% BSA-TBST 1 sat na sobnoj temperaturi. Ovako obrađena membrana priređena je za ponovnu detekciju proteina pomoću protutijela te je navedeni protokol detekcije ponovljen kako je opisano.

Tablica 7. Popis korištenih primarnih i sekundarnih protutijela u metodi otiska po Westernu. Za potrebe analize intenziteta proliferacije i apoptoze te prisutnosti populacije matičnih stanica te diferencijacije stanica metodom IHC korišten je niz primarnih protutijela sukladno optimiziranim koncentracijama.

ANTIGEN	BILJEG	PRIMARNO PROTUTIJELO (KAT. BROJ)	PROIZVOĐAČ	RAZRJEĐENJE	SEKUNDARNO PROTUTIJELO (KAT. BROJ)	PROIZVOĐAČ	RAZRJEĐENJE
Pcna	proliferacije	Ab15497	Abcaın	1:1000	Ab97051	Abcaın	1:20000
Kaspaza-3 (aktivna forma)	apoptoze	Ab13847	Abcaın	1:500	Ab97051	Abcaın	1:20000
Oct3/4	matičnih stanica	Ab109183	Abcaın	1:1000	Ab97051	Abcaın	1:20000
AcH3K9	acetilacije histona	Ab10812	Abcaın	1:500	Ab97051	Abcaın	1:20000
Histon H2B	referentni protein	sc-8650	Santa Cruz Biotechnology	1:200	sc-2033	Santa Cruz Biotechnology	1:10000

3.7 Analiza ekspresije gena na razini mRNA

Kako bi se osigurala dovoljna količina tkiva za potrebe analize mRNA metodama qPCR i ddPCR, tumori tretirani istom epigenetički aktivnom tvari sabrani su u jedinstveni uzorak. Na isti način sabrani su i zametni cilindri u jedinstveni uzorak označen kao „Z“.

3.7.1 Homogenizacija tkiva

Za potrebe analize ekspresije gena na razini mRNA, 7. dan kulture *in vitro* lećni je papir s tumorima pincetom prebačen u Petrijevu zdjelicu s PBS-om. Nakon 5 minuta ispiranja u većem volumenu PBS-a na sobnoj temperaturi uz laganu agitaciju, tumori su pod binokularnom lupom uz pomoć oštrice skalpela lagano odignuti s lećnog papira i prebačeni u sterilnu epruvetu volumena 1,5 mL. U tubicu je prethodno stavljeno 100 µL Trizola (TaKaRa).

U jednu epruvetu zbirno je sabrano između 25-35 jednako tretiranih tumora kako bi se osigurala dovoljna količina mRNA za analizu. Također, u jednu epruvetu zbirno je sabrano oko 40 zametnih cilindara kako bi se osigurala dovoljna količina mRNA za analizu (skupina označena kao „Z“). Tijekom prikupljanja tumora, već prikupljeni tumori u tubici s puferom čuvani su na -80 °C. Prilikom sabiranja novih tumora, kolekcijska je epruveta bila držana na ledu što je omogućavalo lagano otapanje homogenizacijskog pufera, ali i održavanje ukupnog uzorka na niskoj temperaturi. Po dovršetku prikupljanja novih tumora (maksimalno trajanje postupka je bilo 1 sat), kolekcijska je tubica kratko centrifugirana i pohranjena ponovno na -80 °C. Po dovršetku prikupljanja tumora dodano je 1 mL trizola u uzorke i promiješano pipetiranjem. Uzorak je pušten 5 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se ujednačila temperatura, zatim je dodano 200 μL kloroforma, uzorak je dobro protresen 15 sekundi i opet ostavljen 5 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorak je centrifugiran na 12 000 *g* 15 minuta na 4 °C, pipetom je odvojen gornji sloj s RNA u novu sterilnu eruvetu od 1,5 mL. Uzorku je dodano izopropanola u jednakom volumenu koliko ima uzorka, dobro promiješano 20 sekundi i ostavljeno na sobnoj temperaturi 10 minuta. Uzorak je centrifugiran na 12 000 *g* 10 minuta, odvojen je supernatant i u jednakom volumenu dodano 75% hladnog etanola. Uzorak je dobro promješan vorteksiranjem i zatim centrifugiran na 7 500 *g* 5 minuta. Supernatant je odbačen, a uzorak ostavljen nekoliko minuta na sobnoj temperaturi u otvorenoj epruveti kako bi se osušio, nakon čega je dodano 30 μL vode bez RNaze (engl. *RNase-free*) kako bi se resuspendirao. Zbog mogućnosti da izolati RNA sadrže i male količine DNA koje bi mogle biti detektirane kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze nakon reverzne transkripcije, izolati RNA podvrgnuti su razgradnjom deoksiribonukleazom prema uputama proizvođača. Konačna reakcijska smjesa sadržavala je 1x pufer za razgradnju DNAzom1 (2 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 20 mM Tris, pH 8,4), 0,1 U/μL DNaze1 i 7 μL izolata RNA. Smjese su inkubirane 15 min pri sobnoj temperaturi, a potom je DNaza inaktivirana dodatkom 1 μL 25 mM EDTA i inkubacijom 10 min pri 65 °C. Izolati RNA pohranjeni su na -80 °C do daljnje uporabe.

3.7.2 Mjerenje koncentracije RNA

Za potrebe mjerenja koncentracije RNA uzet je po 1 μL izoliranog uzorka i izmjeren na NanoDrop 2000 spektrofotometru (Thermo Scientific). Uzorci su zatim normirani na koncentraciju od 200 ng/μL sa vodom bez RNaze i spremljeni na -80 °C do daljnje analize.

3.7.3 Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija provedena je pomoću AffinityScript qPCR cDNA Synthesis Kita (Agilent Technologies), prema uputama proizvođača. Konačna reakcijska smjesa volumena 20 μL sadržavala je 1,2 μg ukupne RNA (odnosno 6 μL izolata RNA nakon tretmana DNazom1), 3 μL oligo (dT) primera, 10 μL First strand master miksa i 1,0 μL AffinityScript RT/RNase Block enzyme miksa. Uzorci su inkubirani 5 minuta na 25 °C kako bi se dogodilo prijanjanje primera, 15 minuta na 42 °C da se reakcija pokrene i zatim 5 minuta na 95 °C kako bi se reakcija okončala. Uzorci cDNA su pohranjeni na -20 °C, a prije postupka kvantitativnog PCR su razrijeđeni vodom bez RNaze na c=30 ng/μl.

3.7.4 qPCR

Ekspresija mišjih gena *Nanog*, *Trrap*, *Oct3/4*, *SOX2*, *SOX17*, *SIX3*, *BRACHYURY*, *EOMES*, *NESTIN*, *MyoD*, *GATA4*, *FGF5*, *CER1* i *NODAL* analizirana je kvantitativnim, qPCR-om na instrumentu ABI PRISM 7300 Sequence Detector (Applied Biosystems), uz korištenje *RPLP0* kao referentnog gena (Tablica 8.).

Reakcijske smjese za kvantitativni PCR ukupnog volumena 25 μL odpipetirane su u pločicu s 96 jažica za kvantitativni PCR. Svaki je uzorak sadržavao reagens Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies; sadrži: SureStart *Taq* DNA-polimerazu), „*forward*“ (naprijed, iz engl.) i „*reverse*“ (obratno, unatrag, iz engl.) početnice za odabrani gen u odgovarajućim koncentracijama, referentnu boju te 2 μL otopine cDNA. Kvantitativni PCR odvijao se pri sljedećim uvjetima: 10 minuta na 95 °C, zatim 10 minuta na 95 °C i potom 40 ciklusa od po 30 sekundi na 95 °C (denaturacija dvolančane DNA) i po 1 minuta na 60 °C (sparivanje lanaca i sinteza DNA).

Prije no što se pristupilo analizi pojedinih uzoraka, istom metodom uz korištenje RNA tretirane DNazom1 kao kalupa za PCR potvrđena je uspješnost razgradnje po izolaciji zaostale DNA u izolatima RNA, odnosno utvrđeno je da nije prisutno umnažanje lančanom reakcijom polimeraze na uzorcima RNA.

Tablica 8. Popis korištenih početnica u metodi analize ekspresije gena na razini mRNA pomoću RT-PCRa. Za analizu ekspresije pojedinog gena na razini mRNA, korištene su uobičajne početnice sukladno literaturi.

GEN	BILJEG	POČETNICE
Nanog	zametnih matičnih stanica	F 5'-TTG CTT ACA AGG GTC TGC TAC T-3' R 5'-ACT GGT AGA AGA ATC AGG GCT-3'
Oct3/4	zametnih matičnih stanica	F 5'-AGT TGG CGT GAC TTT GC-3' R 5'-CAG GGC TTT CAT GTC CTG G-3'
Sox2	zametnih matičnih stanica	F 5'-GCG GAG TGG AAA CTT TTG TCC-3' R 5'-CGG GAA GCG TGT ACT TAT CCT T-3'
Sox17	endoderma	F 5'-CGA GCC AAA GCG GAG TCT C-3' R 5'-TGC CAA GGT CAA CGC CTT C-3'
Six3	neuroektoderma	F 5'-CCG GAA GAG TTG TCC ATG TTC-3' R 5'-CGA CTC GTG TTT GTT GAT GGC-3'
Brachyury	mesoderma	F 5'-CTC GGA TTC ACA TCG TGA GAG-3' R 5'-AAG GCT TTA GCA AAT GGG TTG TA-3'
Eomes	mesoderma	F 5'-CCT GGT GGT GTT TTG TTG TG-3' R 5'-TTT AAT AGC ACC GGG CAC TC-3'
Nestin	neuroektoderma	F 5'-CCC TGA AGT CGA GGA GCT G-3' R 5'-CTG CTH CAC CTC TAA GCG A-3'
Myod	mišića	F 5'-CCA CTC CGG GAC ATA GAC TTG-3' R 5'-AAA AGC GCA GGT CTG GTG AG-3'
Gata4	endoderma	F 5'-CCC TAC CCA GCC TAC ATC G-3' R 5'-ACA TAT CGA GAT TGG GGT GTC T-3'
Fgf5	ektoderma	F 5'-GCT GTG TCT CAG GGG ATT GT-3' R 5'-CAC TCT CGG CCT GTC TTT TC-3'
Cer1	zametnih matičnih stanica	F 5'-CTC TGG GGA AGG CAG ACC TAT-3' R 5'-CCA CAA ACA GAT CCG GCT T-3'
Nodal	zametnih matičnih stanica	F 5'-CCT GGA GCG CAT TTG GAT G-3' R 5'-ACT TTT CTG CTC GAC TGG ACA-3'
Rplp0	referetni gen	F 5'-TCC AGG CTT TGG GCA TCA-3' R 5'-CTT TAT CAG CTG CAC ATC ACT CAG A-3'

Svaki uzorak analiziran je kvantitativnim PCR-om u triplikatu. U svrhu procjene jačine ekspresije svakog gena, vrijednosti C_T (engl. *treshold cycle*), dobivene za testirani gen normirane su na vrijednosti dobivene za kontrolni gen *rplp0* u istom uzorku cDNA (ΔC_T). Kako bi se usporedile jačine ekspresije testiranog gena u tretiranim uzorcima u odnosu na kontrolni uzorak, broj dva potenciran je na negativnu razliku vrijednosti ΔC_T tretiranog i kontrolnog uzorka ($\Delta\Delta C_T$). Dakle, promjena razine ekspresije (engl. *relative fold ratio*, RFR) izračunata je prema jednadžbi:

$$RFR = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

pri čemu je $\Delta\Delta C_T$= (C_T testirani gen – C_T kontrolni gen) tretirani uzorak – (C_T testirani gen – C_T kontrolni gen) kontrolni uzorak.

3.7.5 ddPCR

U proceduri generiranja dropleta (kapljica) u srednji red ddPCR DG8 droplet generacijske kazetice odpipetirano je 20 μL reakcijske smjese za ddPCR. Reakcijska smjesa sadrži nukleinske kiseline, početnice, probe i ddPCR supermix, sukladno uputama proizvođača (BioRad) (Tablica 9.).

Nakon nanošenja ddPCR reakcijske smjese, odpipetirano je 70 μL ulja za generiranje dropleta u donji red DG8 kazetice te je nanešena brtva na DG8 kazeticu i pokrenut proces generiranja dropleta u QX200 droplet generatoru, sukladno uputama proizvođača (BioRad).

U vremenskom periodu do oko 2,5 minute droplet generator generira oko 20 tisuća dropleta po uzorku za 8 uzoraka. Nakon što su dropleti generirani prebačeni su multikanalnom pipetom u pločicu s 96 jažica za kvantitativni PCR. Nakon što su svi uzorci prebačeni u pločicu za PCR, pločica je zabrtvljena aluminijskom folijom na PX1 zabrtvljivaču PCR pločica metodom toplinskog brtvljenja. Nakon brtvljenja PCR pločica je prebačena u PCR uređaj Bio-Rad C1000 touch deep well. PCR reakcija se dovijala prema sljedećim uvjetima: 10 minuta na 95 °C (aktivacija polimeraze), i potom 40 ciklusa od po 30 sekundi na 95 °C (denaturacija dvolančane DNA) i po 1 minutu na 60 °C (sparivanje lanaca i sinteza DNA). Promjena temperature svih ciklusa je postavljena na 2,5 °C/s kako bi se osiguralo da svi dropleti postignu zadanu temperaturu u svakom koraku PCR reakcije. U svakom dropletu se odvijala prostorno odjeljena PCR reakcija. Potom se na QX200 čitaču dropleta očitavalo dali su dropleti pozitivni na jednom od 2 kanala. Analiza rezultata dobivenih na QX200 čitaču dropleta je napravljena korištenjem QuantaSoft programskog paketa (BioRad).

Tablica 9. Popis korištenih početnica u metodi analize ekspresije gena na razini mRNA pomoću dd-PCRa. Za analizu ekspresije pojedinog gena na razini mRNA, korištene su uobičajne početnice sukladno literaturi.

GEN	BILJEG	POČETNICE
Nanog	zametnih matičnih stanica	F 5'-TTG CTT ACA AGG GTC TGC TAC T-3' R 5'-ACT GGT AGA AGA ATC AGG GCT-3'
Oct3/4	zametnih matičnih stanica	F 5'-AGT TGG CGT GGA GAC TTT GC-3' R 5'-CAG GGC TTT CAT GTC CTG G-3'
Sox2	zametnih matičnih stanica	F 5'-GCGGAG TGG AAA CTT TTC TCC-3' R 5'-CGG GA-A GCG TGT ACT TAT CCT T-3'

3.8 Analiza metilacije DNA

Kako bi se osigurala dovoljna količina tkiva za potrebe analize metilacije DNA nije bilo potrebno sabirati tumore u jedinstveni uzorak, već je u svakoj pokusnoj skupini analiziran određen broj pojedinačnih tumora.

3.8.1 Homogenizacija tkiva i mjerenje koncentracije DNA

Za homogenizaciju tkiva korišten je uhodani protokol (217). Pojedinačni tumor oštricom je skalpela prebačen u 0,5 mL epruvetu (vidi ranije) u koju je dodano 300 µL pufera za izolaciju DNA (TE pH 9, 0,1 µg/µL Proteinaza K i 0,25% Nonidet P40). Svi uzorci inkubirani su na 56 °C preko noći. Uzorci su nakon inkubacije zagrijani na 95 °C u trajanju od 10 minuta kako bi se inaktivirala Proteinaza K. Koncentracija DNA izmjerena je na spektrofotometru NanoDrop 20000 (Thermo Scientific). Izračunati volumen homogenata dekantiran je u sterilnu epruvetu 1,5 mL te dodan izračunat volumen mQH2O kako bi se postigla ujednačena koncentracija svih uzoraka od 50 ng/µL. Ti su alikvoti dalje korišteni u postupku analize metilacije DNA pirosekvenciranjem, te pohranjeni na -20 °C. Homogenati su također

pohranjeni na -20 °C kao rezervni materijal.

3.8.2 Bisulfitno tretiranje DNA

Genomska DNA modificirana je reakcijom bisulfitne konverzije. Natrij bisulfit nemetilirane citozine, preko prvotne konverzije u uracile, mijenja u timine čime se epigenetička oznaka prebacuje u sekvencu DNA (174). Bisulfitna konverzija provedena je na uzorcima DNA zametaka, TCa i teratoma pomoću Epitect Bisulfite Kita (Qiagen) prema uputama proizvođača. Po 20 µL uzorka DNA (supernatanti koncentracije DNA 50 ng/µL) odnosno 1000 ng stavljeno je u PCR epruvetu. Dodano je 85 µL Bisulfite Mix-a i 35 µL DNA Protect Buffera i dobro promiješano. PCR epruvete su položene u PCR stroj te je pokrenut slijedeći program: 95 °C 5 minuta, 60 °C 25 minuta, 95 °C 5 minuta, 60 °C 85 minuta, 95 °C 5 minuta, 60 °C 2 sata i 55 minuta te 4 °C do 20 sati. Nakon navedenog koraka, ukupan volumen svakog uzorka iz PCR epruvete prebačen je u zasebnu sterilnu epruvetu od 1,5 ml. U svaki uzorak je dodano 310 µL pufera BL i promiješano, zatim je dodano 250 µL 96% etanola i promiješano, cjelokupni sadržaj epruvete je prebačen u zasebnu EpiTect spin kolumnu. Spin kolumne su centrifugirane na maksimalnoj brzini 1 minutu, filtrat je odbačen. U spin kolumne je dodano 500 µL *wash* pufera, centrifugirane su na maksimalnoj brzini 1 minutu i filtrat je odbačen. U spin kolumne je dodano 500 µL desulfonacijskog pufera i ostavljeno na sobnoj temperaturi 10 minuta, nakon čega su uzorci centrifugirani na maksimalnoj brzini 1 minutu i filtrat je odbačen. Dva puta je ponovljen korak pranja, u svaku spin kolumnu je dodano 500 µL pufera za ispiranje, centrifugirano na maksimalnoj brzini 1 minutu i filtrat je odbačen. Spin kolumne su prebačene u nove kolekcijske tubice od 2 ml i centrifugirane na maksimalnoj brzini 1 minutu, kako bi se uklonila preostala tekućina. Spin kolume su prebačene u sterile tubice od 1,5 mL, 20 µL *elution* pufera je dodano na membranu kolumne, inkubirano na sobnoj temperaturi 1 minutu i centrifugirano na 15 000 g 1 minutu, korak elucije je ponovljen epruvete sa 40 µL eluirane bisulfitno konvertirane DNA koncentracije 25 ng/µL su pohranjene na -20 °C za daljnju analizu.

3.8.3 PCR i agarozna elektroforeza

Klasičnom PCR reakcijom amplificirane su promotorske regije gena odnosno repetitivni elementi od interesa. Ukupno je korišteno 4 eseja već uspostavljenih u laboratoriju. Početnice su osmišljene na temelju podataka UCSC Genome Bioinformatics Genome Browser Gateway sukladno standardnom protokolu dizajniranja početnica (Tablica 10.). U svim reakcijama

korišten je PyroMark PCR Kit (Qiagen) prema uputama proizvođača. Svi eseji provedeni su prema temeljnom obrascu PCR reakcije u volumenu 25 µL: 95 °C 15 minuta/ 95 °C 30 sekundi – prijanjanje 30 sekundi – 72 °C 30 sekundi 50 ciklusa/ 72°C 10 minuta / +18 °C ∞. Elektroforezom na 2% agaroznom gelu u 1xTAE puferu, koristeći 5 µL PCR produkata, identificirani su uzorci s uspješnom amplifikacijom DNA. Uspješno amplificirani uzorci pohranjeni su na +4 °C do postupka pirosekvenciranja.

Tablica 10. Popis korištenih početnica u amplifikaciji fragmenata DNA PCR-om namjenjenih za analizu metilacije DNA pirosekvenciranjem. Za analizu metilacije DNA pojedinog gena odnosno repetitivne sekvence, korištene su uobičajne početnice za amplifikaciju željenog fragmenta sukladno literaturi.

GEN	BILJEG	POČETNICE		TEMPERATURA PRIJANJANJA	KONSTRUKTOR
Oct3/4	matičnosti	R	5'-BIO-ATC TAC CTA TAT CTT CCA A-3'	50,0 °C	Eurofins Scientific
		F	5'-TGT TAA TAG GTT TTG TGG T-3'		
Nanog	matičnosti	R	5'-BIO-AAC CCA CAC TCA TAT CAA-3'	50,0 °C	Eurofins Scientific
		F	5'-AAT TTA TAG GGT TGG TGG-3'		
Sox2	matičnosti	R	5'-BIO-AAC TTC CTA ACA TCC CAC-3'	54,0 °C	Eurofins Scientific
		F	5'-GTT TGG GTT TGT TTG GTG-3'		
Mml	Globalne metilacije DNA	R	5'-BIO-CTC ACC AAA AAT CTT AAA ATC C-3'	61,8 °C	Eurofins Scientific
		F	5'-GGT TTG ATT TGG GGT ATA AGT-3'		

3.8.4 Pirosekvenciranje

Pirosekvenciranje je provedeno korištenjem PyroMark Q24 Advanced pirosekvencera (Qiagen), PyroMark Q24 Advanced Software računalnog programa (Qiagen), PyroMark Q24 vakuumske radne stanice (Qiagen), PyroMark Q24 Advanced Reagents kitova (Qiagen), PyroMark Denaturation Solution (Qiagen), PyroMark Wash Buffer (Qiagen) te adekvatnih početnica za pirosekvenciranje (Sigma-Aldrich) (Tablica 11.). Pirosekvenciranje je provedeno prema uputama proizvođača odnosno niže navedenom protokolu. Korišteno je ukupno 4 eseja već uspostavljenih u laboratoriju. Za analizu obrasca metilacije DNA pojedinog gena u pojedinu jažicu PCR pločice prebačeno je 20 μL PCR produkata pojedinog uzorka. Pločica je kratko centrifugirana kako bi se volumeni PCR produkta spustili na dno jažica. U svaku jažicu dodano je 2 μL zrnaca sefaroznih kuglica (GE Healthcare), 18 μL miliQ vode i 40 μL otopine za vezivanje. PCR pločica postavljena je na termomikser na 1400 rpm minimalno 10 minuta na sobnoj temperaturi. U međuvremenu pripremljena je pločica za pirosekvenciranje. U svaku jažicu pločice za pirosekvenciranje stavljeno je 20 μL otopine sekvencijske početnice za pojedini gen odnosno repetitivni element (sekvencijska početnica razrijeđena u *annealing* puferu na koncentraciju 0,375 mM). PCR pločica fiksirana je na vakuumsku radnu stanicu. Nastavci s filtrima vakuumske četke umetnuti su u jažice PCR pločice na 30 sekundi. Pod uključenim vakuumom, četka vakuumske pumpe umočena je u 70% etanol na 5 sekundi, pufer za denaturaciju na 5 sekundi te u pufer za ispiranje na 10 sekundi. Nakon ispiranja, četka vakuumske pumpe postavljena je neposredno iznad prethodno pripremljene pločice za pirosekvenciranje te je isključen vakuum. Četka vakuumske pumpe umočena je u jažice pločice za pirosekvenciranje s blagom trešnjom kako bi se zrnca gela s vezanim PCR produktima otpustili u otopine sekvencijskih početnica za pojedini gen. Nakon zagrijavanja na termomikseru (5 minuta na 80 °C bez trešnje) uslijedilo je pirosekvenciranje.

U međuvremenu, kazeta pirosekvencera je priređena te su u računalni program uneseni svi potrebni parametri, sukladno uputama proizvođača.

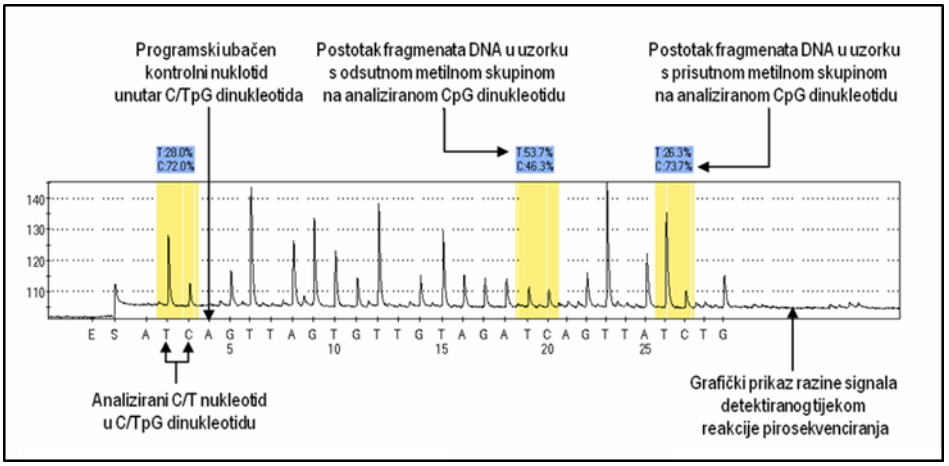
Tablica 11. Popis korištenih početnica u analizi metilacije DNA pirosekvenciranjem. Za analizu metilacije DNA pojedinog gena odnosno repetitivne sekvence, korištene su uobičajene početnice za pirosekvenciranje amplificiranog fragmenta sukladno literaturi.

GEN	BILJEG	SEKVENCIJSKE POČETNICE	KONSTRUKTOR
Oct3/4	matičnosti	5'-TGA AGG TTT TTT GGG GT-3'	Eurofins Scientific
Sox2	matičnosti	5'-TGT ATT TGT ATT TTT GG-3'	Eurofins Scientific
Nanog	matičnosti	5'-GGA GGA GTA GGA TTT ATT-3'	Eurofins Scientific
Mml	globalne metilacije DNA	5'-GGT TTG ATT TGG GGT ATA AGT-3'	Eurofins Scientific

Nakon pirosekvenciranja, analizirani su pirogrami (Slika 22.) te je uslijedio izračun prosječne razine metilacije određenog analiziranog uzorka tkiva prema prikazanoj jednadžbi:

MX=MU/NCpG

pri čemu MX označava prosječne razine metilacije određenog analiziranog uzorka tkiva, MU ukupan zbroj razina metilacije DNA analiziranih CpG točaka, dok NCpG broj analiziranih CpG točaka.



Slika 22. Prikaz pirografa. Podaci metilacije DNA prikazani na pojedinom pirografu dobiveni su PyroMark Q24 Advanced Software računalnog programa (Qiagen).

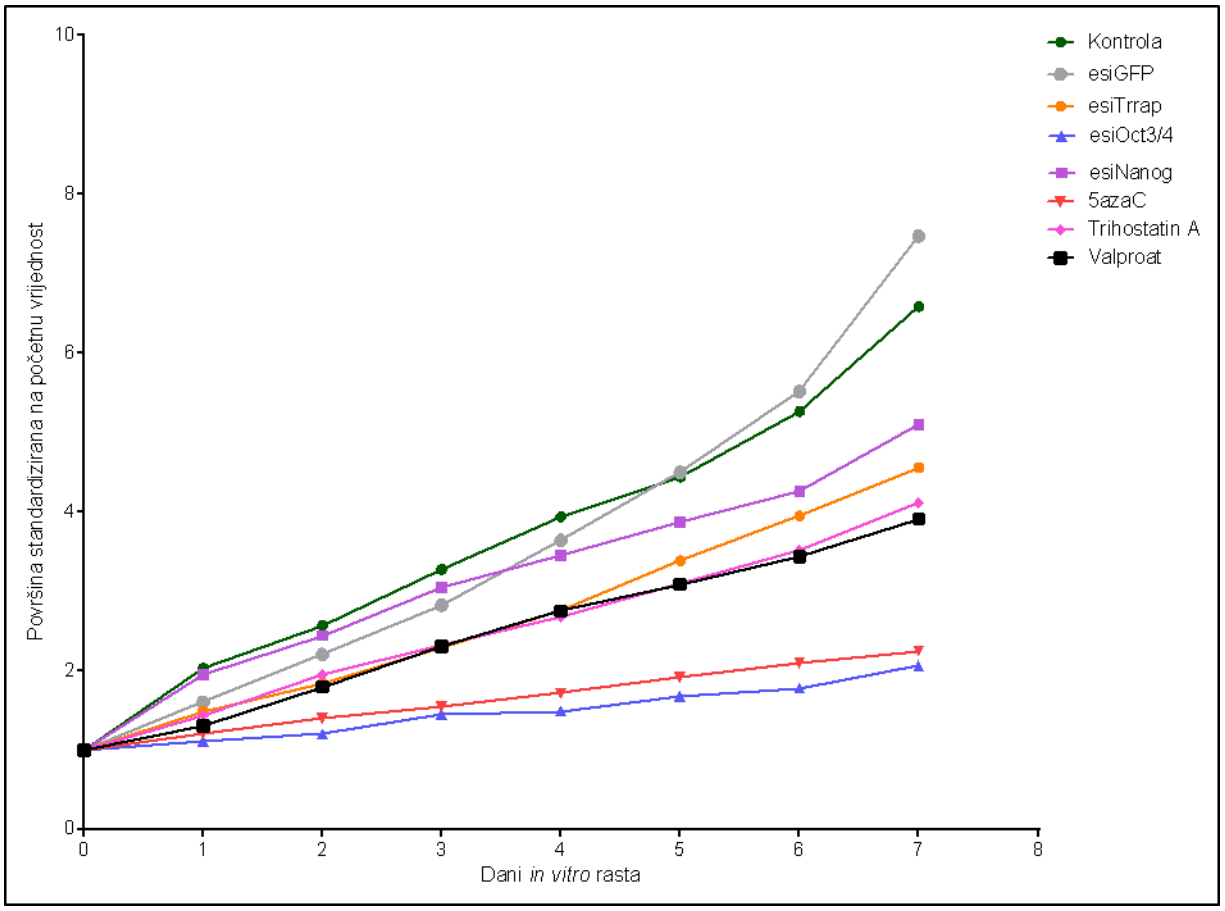
3.9 Statistička obrada podataka

Rezultati su obrađeni u računalnom programu GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, USA) za Windows operativni sustav. Broj licence je GPW6-278912-RLMU-966F4. Mjere centralne tendencije (aritmetička sredina) kao i mjere disperzije (standardna pogreška) opisane su koristeći deskriptivnu statistiku. Za normalno raspoređene rezultate korišteni su parametrijski, a za ostale neparametrijski testovi. Za određivanje statističke značajnosti razlika u rastu *in vitro* koristili smo One-sample t test. Za određivanje statističke značajnosti usporedbom više eksperimentalnih skupina korišten je 1way ANOVA Kruskal-Wallisov test. Za analizu statističke značajnosti u usporedbama dviju skupina koristili smo Mann-Whitney U test. Statistički značajni rezultati smatrani su oni čija je $p<0,05$ (dvostrani test). U određivanju statističke značajnosti među skupinama koje predstavljaju zbirni uzorak, korištena je uobičajna metoda dvostrukog smanjenja i dvostrukog povećanja normirane vrijednosti. Detaljnija objašnjenja statističkih metoda i matematičkih izračuna navedena su i objašnjena u pripadajućim paragrafima poglavlja „Eksperimentalni dio“ i „Rezultati“.

4 REZULTATI

4.1 Rast eksperimentalnog tumora zametnih stanica *in vitro*

Eksperimentalni tumor zametnih stanica *in* vitro, odnosno eksperimentalni teratom *in vitro*, pokazuje stabilan rast u korištenom sustavu kultiviranja kontrolnih zametaka, pa su tijekom sedam dana teratomi kontrolne skupine ostvarili povećanje svoje površine od preko šest puta. Sličan intenzitet rasta pokazali su teratomi skupine zametaka tretirane esi*Gfp* (metodološka kontrola), koji pokazuju da tehnologija esiRNA sustava ne interferira s rastom teratoma u ovako postavljenom *in vitro* sustavu (Slika 23.) (Tablica 12.).



Slika 23. Rast teratoma *in vitro*. Površine teratoma *in vitro* mjerene svaki dan tijekom 7 dana kultiviranja normirane su na vrijednost površine pojedinog zametka na 0. dan kulture. Prikazane su srednje vrijednosti.

U usporedbi s kontrolom, 5azaC ostvario je iznimno jak statistički značajan inhibicijski učinak na rast teratoma. Tako je pokazano da teratomi zametaka tretiranih 5azaC u prosjeku nisu uspjeli ostvariti niti udvostručenje svoje površine tijekom 7 dana kulture. Dapače, primjećeno je da je podosta teratoma upravo doživjelo smanjenje svoje površine odnosno da je 5azaC smanjio tumorsku masu *in vitro*. Ipak, 5azaC nije ostvario najjači zabilježeni inhibicijski učinak u ovom istraživanju. Premda statistički jednako značajno kao i 5azaC, prema grafičkim podacima, najsnažniji inhibicijski efekt na rast teratoma *in vitro* ostvario je esi*Oct3/4*. Prosječni rast esi*Oct3/4* tretiranih teratoma ne prelazi 1,5 puta početne površine. Kao i kod 5azaC tretiranih tumora, velik broj esi*Oct3/4* tretiranih teratoma pokazalo je potpuni izostanak rasta ili čak pad površine tumora odnosno smanjenje tumorske mase.

Tablica 12. Tablični prikaz statističke analize rasta teratoma *in vitro*. Podaci rasta testirani su na normalnost distribucije te vrijednosti pojedine skupine međusobno uspoređene adekvatnim statističkim testom.

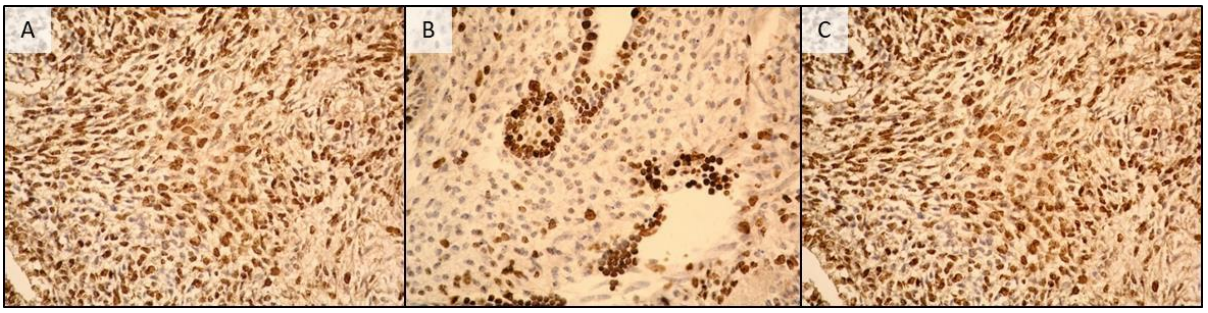
		Kontrola	GFP	5azaC	Valproat	Trihostatin	esiOct	esiNanog	esiTrrap
D'Agostinov i Pearsonov test normalnosti	K2	0,1055	0,9151	0,6128	0,8461	0,2561	0,3439	0,09863	0,6811
	P vrijednost	0,9486	0,6328	0,7361	0,655	0,8798	0,842	0,9519	0,7114
	Prođen test normalnosti (alpha=0.05)?	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA
	P vrijednost značajan?	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Wilcoxonov test	Teoretski medijan	3,608	3,608	3,608	3,608	3,608	3,608	3,608	3,608
	Realni medijan	3,608	3,232	1,633	2,53	2,498	1,47	3,25	2,519
	Diskrepanca	-4,4E-16	-0,376	-1,976	-1,079	-1,111	-2,138	-0,358	-1,089
	W	1	-2	-36	-32	-32	-36	-12	-24
	Sum pozitivnih r.	18,5	17	0	2	2	0	12	6
	Sum negativnih r.	-17,5	-19	-36	-34	-34	-36	-24	-30
	P vrijednost (two tailed)	0,9688 (1)	0,9453	0,0078	0,0234	0,0234	0,0078	0,4609	0,1094
	Egzaktno ili estimirano??	Egzaktno	Egzaktno	Egzaktno	Egzaktno	Egzaktno	Egzaktno	Egzaktno	Egzaktno
	Statistički značajno (alpha=0.05)?	NE	NE	DA	DA	DA	DA	NE	NE

Zameci tretirani s HDACi, VAL i TSA, ostvaruju statistički značajnu inhibiciju rasta teratoma u odnosu na kontrolu i, zanimljivo, pokazuju gotovo identičan obrazac rasta *in vitro*.

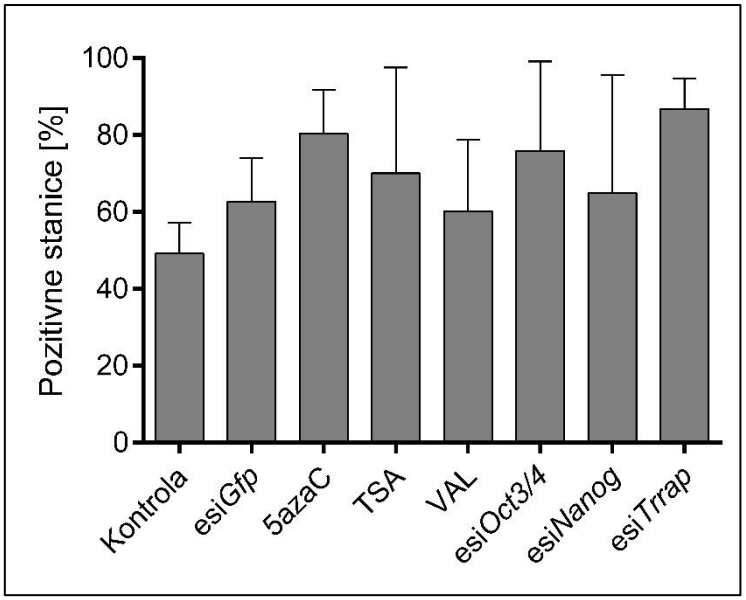
Za razliku od esi*Oct3/4*, esi*Nanog* i esiTrrap, iako su smanjili intenzitet tumorskog rasta, nisu ostvarili statistički značajnu inhibiciju. Tretirani esi*Nanog*-om pokazuju dapače jednak obrazac i intenzitet rasta teratoma prva 3 dana kao i kontrolna skupina. Zaostatak u rastu ostvaren je posljednja 3 dana kulture. Tako da naposljetku, esi*Nanog* tretirani pokazuju velik zaostatak u rastu teratoma 7. dana kulture. Ipak, promatrano kroz cjelokupni period kultiviranja, ne postoji statistički značajan inhibicijski učinak. Krivulja rasta teratoma nastalih iz esi*Trrap* tretiranih zametaka u samom početku kultiviranja odvaja se od krivulje rasta kontrolne skupine. Ipak, kroz 7 dana kultiviranja pokazuje stabilan i linearan rast, manji od onog u kontrolnih teratoma, ali statistički usporediv.

4.2 Proliferacijska aktivnost tumora zametnih stanica *in vitro*

Statističkom analizom podataka morfometrijske kvantifikacije biljega proliferacije (Ki-67) na IHC preparatima ANOVA testom, utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između tretiranih skupina i kontrole (Slika 24. i 25.). Najskromniji porast proliferacije vidljiv je u esi*Gfp* tretiranoj skupini kao metodološkoj kontroli, te u teratoma nastalih iz zametaka tretiranih s VAL i esi*Nanog*. Blaži porast proliferacije uočen je u teratoma nastalih iz zametaka tretiranih s TSA. Najsnažniji porast proliferacije zabilježen je u teratomima nastalim iz zametaka tretiranih s esi*Oct3/4* i 5azaC, a posebice esi*Trrap* iako nije dokazana statistički značajna razlika.

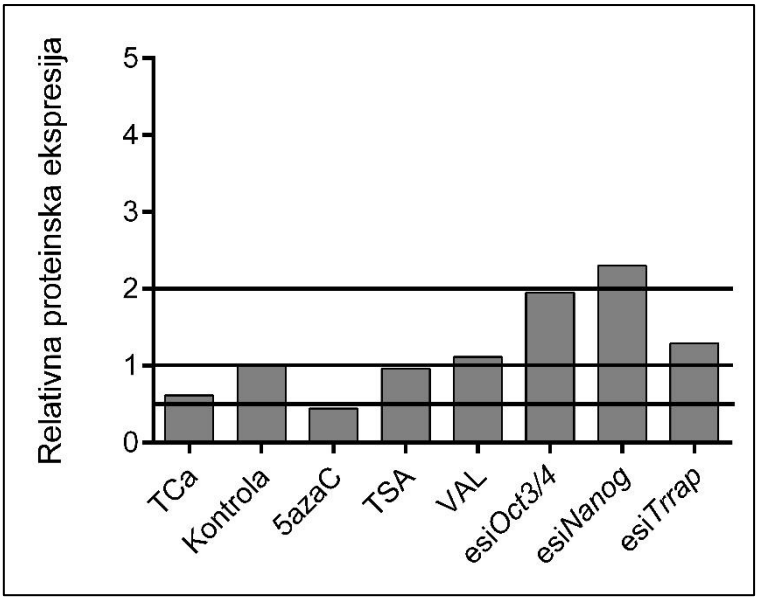


Slika 24. Proliferacijska aktivnost u tkivu teratoma *in vitro*. Ekspresija Ki-67 prikazana IHC. A) esi*Trrap*. B) esi*Gfp*. C) esi*Nanog*. Povećanje 400X, IHC, DAB, pozadinski obojano hemalaunom.

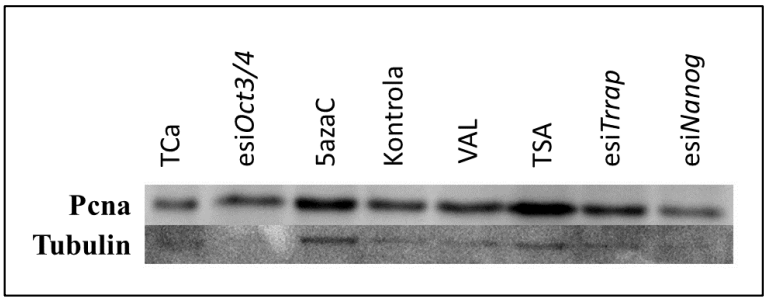


Slika 25. Analiza proliferacijske aktivnosti metodom IHC u teratomima. Grafički prikaz podataka morfometrijske kvantifikacije biljega proliferacije Ki-67 na IHC-im preparatima teratoma *in vitro* koji pokazuju različiti porast proliferacijske aktivnosti u eksperimentalnim skupinama u odnosu na kontrolu, iako bez utvrđene statistički značajne razlike (Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparison test). Prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije.

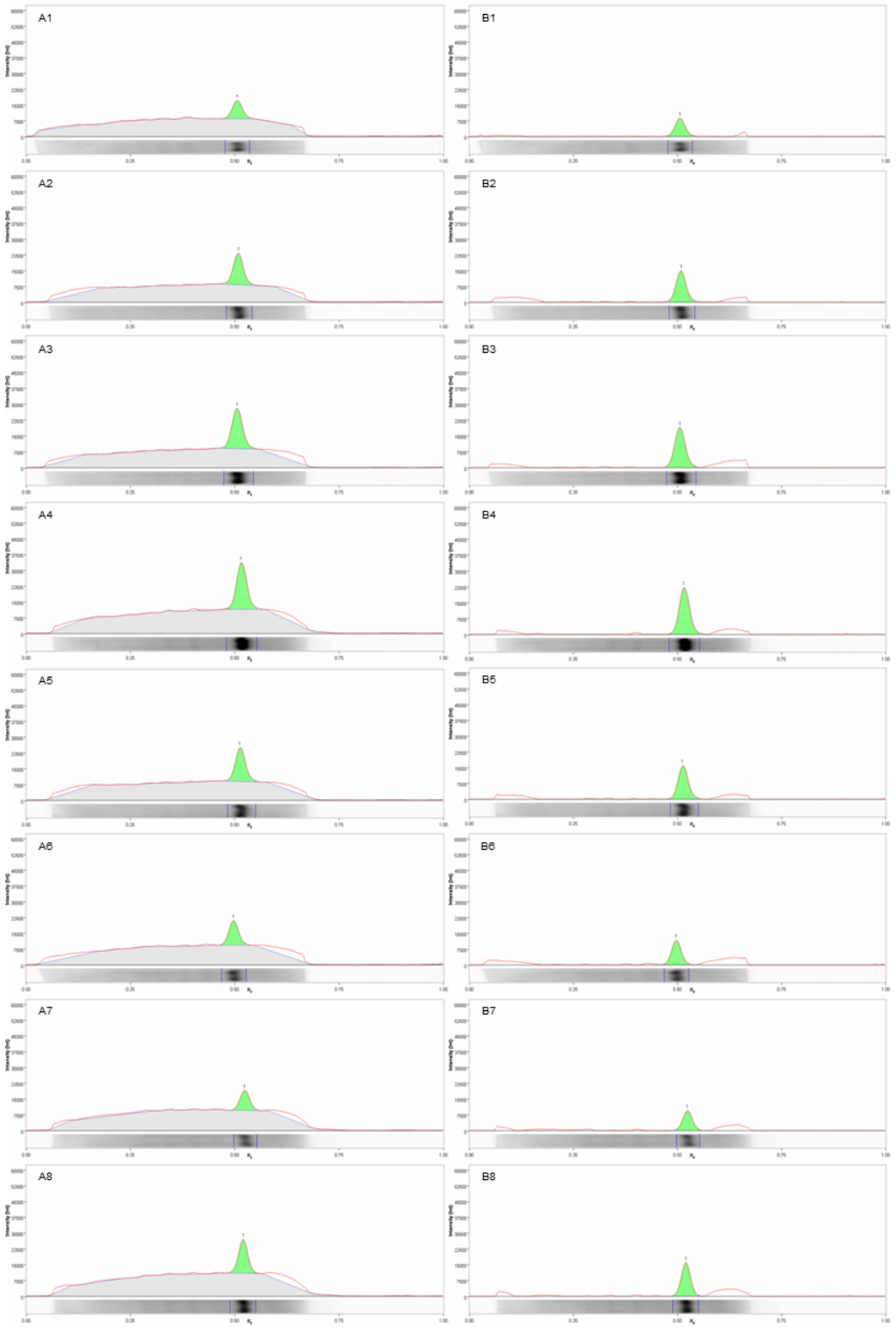
Analiza metodom otiska po Westernu na drugi proliferacijski biljeg Pcna (engl. Proliferating cell nuclear antigen), pokazuje djelomično usporedive rezultate s IHC analizom biljega Ki-67. Naime, teratomi nastali iz zametaka tretiranih s esi*Oct3/4* ili esi*Nanog* također pokazuju intenzivniju proliferaciju u usporedbi s kontrolnom skupinom. Teratomi iz zametaka tretiranih s VAL ili TSA ne uzrokuju razliku u proliferacijskoj aktivnosti teratoma u usporedbi s kontrolom. Oprečno rezultatima dobivenima IHC analizom biljega Ki-67, zameci tretirani s esi*Trrap* ne uzrokuju pojačanu proliferaciju teratoma, dok tretirani s 5azaC pokazuju i smanjenje proliferacijske aktivnosti koja pokazuje statističku relevantnost (Slika 26., 27. i 28.). Zanimljivo je da je maligni teratokarcinom koji je nastao transplantacijom zametka miša *in vivo*, pokazao nižu ekspresiju proliferacijskog biljega od teratomske kontrole.



Slika 26. Analiza proliferacijske aktivnosti u teratomima metodom otiska po Westernu. Prisutnost Pcna u tkivu teratoma *in vitro* analizirana metodom otiska po Westernu i normirana na kontrolu. TCa=teratokarcinom



Slika 27. Prikaz membrane dobivene metodom otiska po Westernu s vizualiziranim signalom na antigen Pcna. Svjetlosni signal Pcna i Tubulina pojedinog uzorka konvertiran je u digitalni podatak. TCa=teratokarcinom

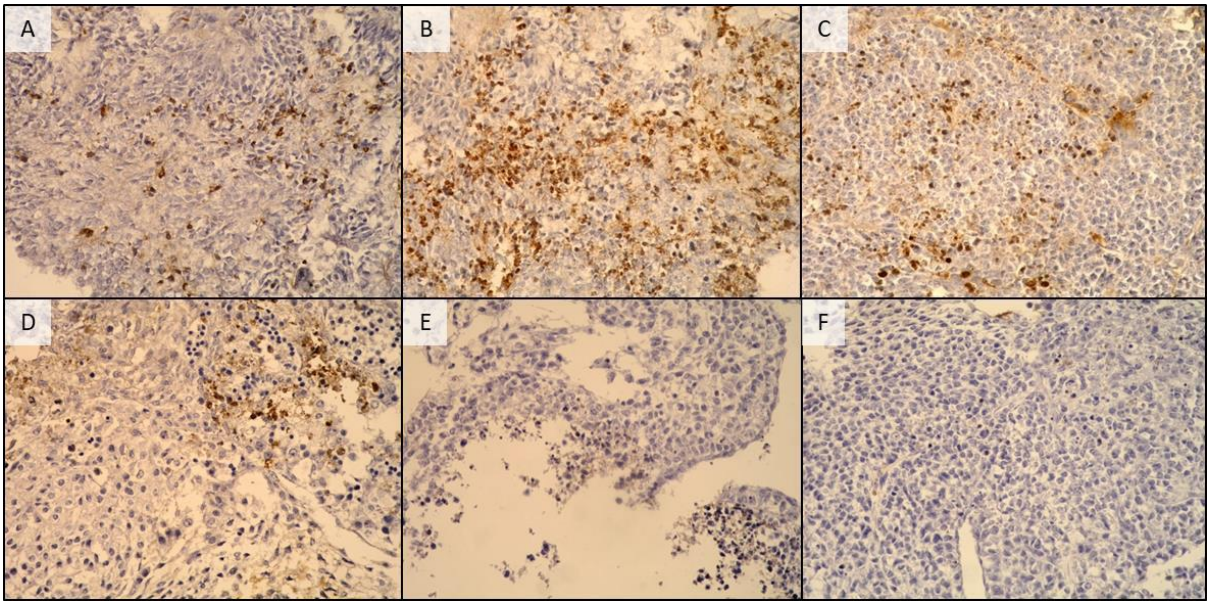


Slika 28. Prikaz računalne analize digitalnog oblika signala (piksela) dobivenog metodom otiska po Westernu na antigen Pcna. A - Prikaz piksela u području očekivane mase antigena Pcna; B - Prikaz piksela u području očekivane mase antigena Tubulin; 1 - TCa; 2 - esi*Oct3/4*; 3 - 5azaC; 4 - Kontrola; 5 - VAL; 6 - TSA; 7 - esi*Trrap*; 8 - esi*Nanog*.

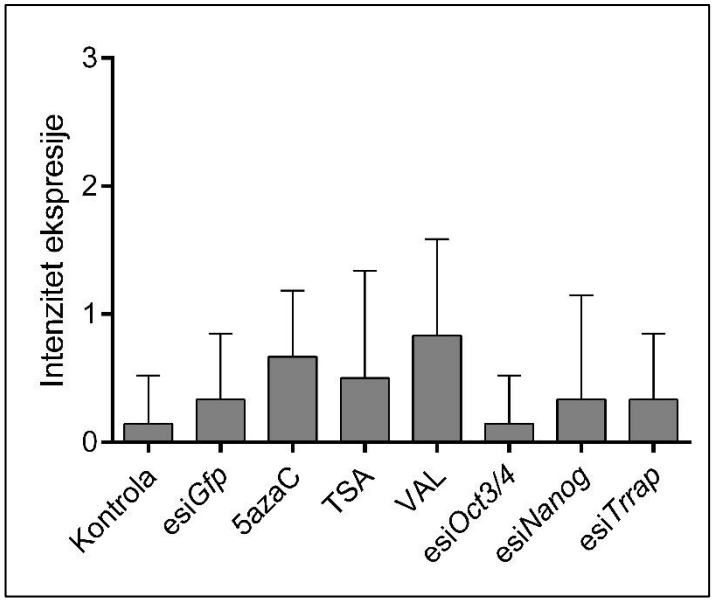
4.3 Apoptozna aktivnost tumora zametnih stanica *in vitro*

Statističkom analizom podataka morfometrijske kvantifikacije biljega apoptoze (aktivne Kaspaze-3) na imunohistokemijskim preparatima ANOVA testom, utvrđeno je da nema značajne razlike između tretiranih grupa i kontrole (Slika 29. i 30.).

Ipak, trend snažnije apoptozne aktivnosti zabilježen je u teratoma porijeklom iz zametaka tretiranih s VAL, TSA ili 5azaC. EsiRNA agensi pak, nisu uzrokovali odmak od vrijednosti dobivenih u teratoma kontrolne skupine.

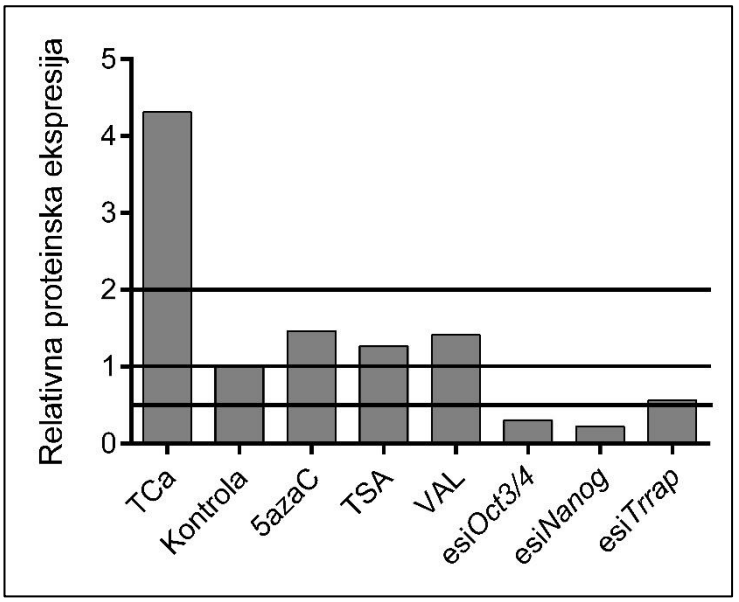


Slika 29. Apoptozna aktivnost u stanicama teratoma *in vitro*. Ekspresija aktivne Kaspaze-3 prikazana IHC analizom. A) i B) VAL. C) GFP. D), E) i F) esi*Oct3/4*. Povećanje 400X, IHC, DAB, pozadinski obojano hemalaunom.

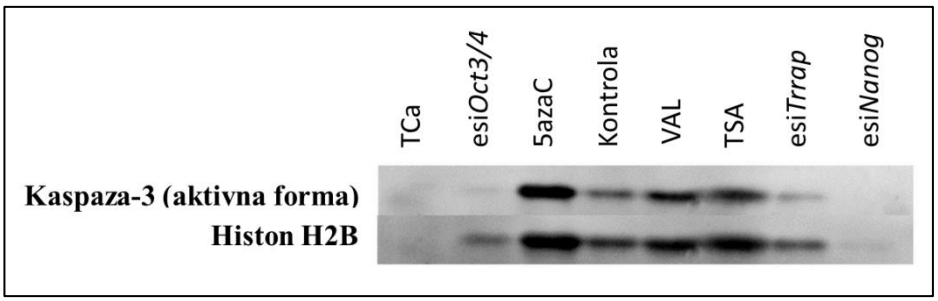


Slika 30. Apoptozna aktivnosti u teratomima analizirana metodom IHC. Grafički prikaz podataka morfometrijske kvantifikacije biljega apoptoze aktivna Kaspaza-3 na IHC preparatima teratoma *in vitro* (Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparison test). Prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije.

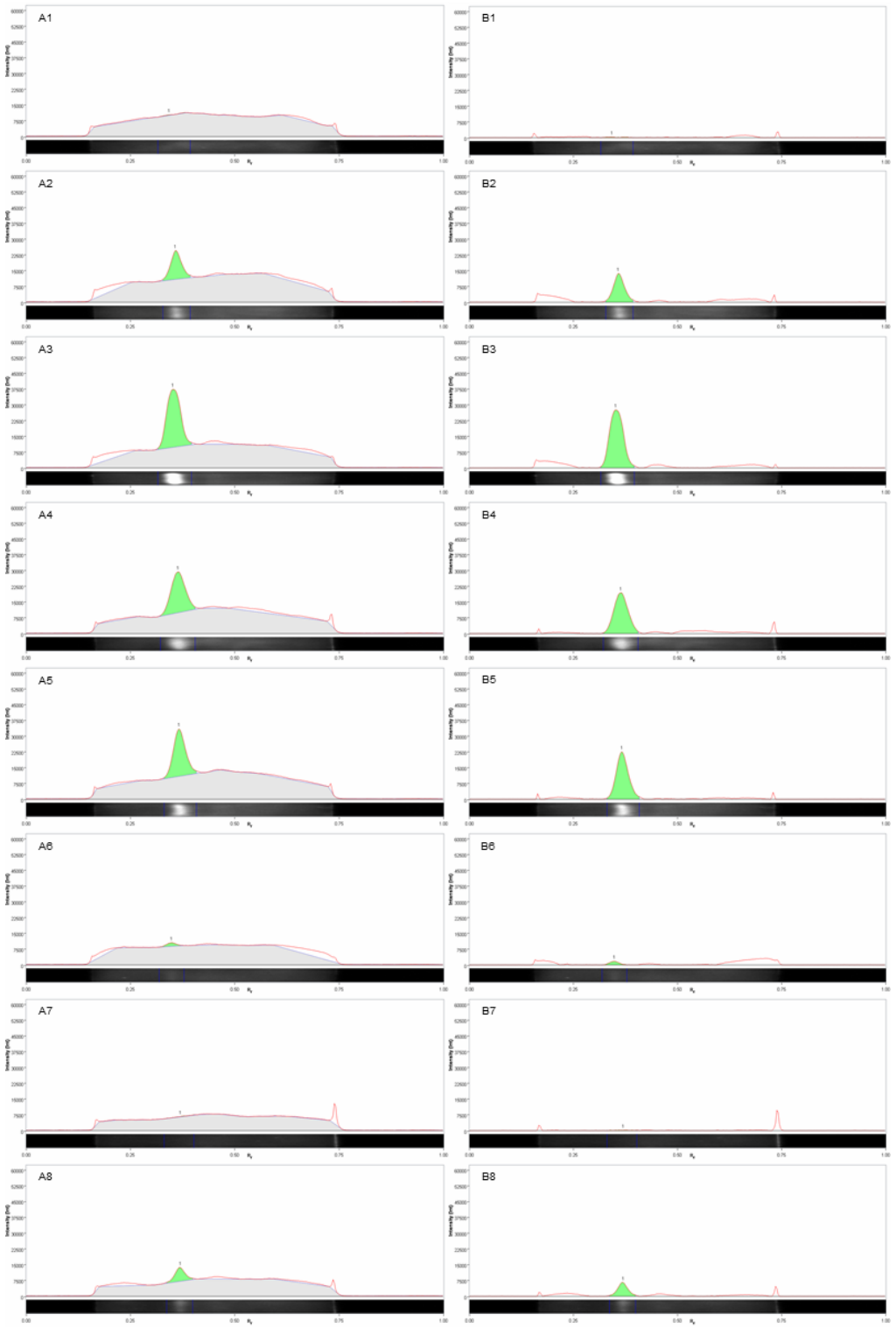
Analiza apoptoze metodom otiska po Westernu na apoptozni biljeg Kaspaza-3, pokazuje djelomično usporedive rezultate. 5azaC, VAL i TSA, ponovno pokazuju indukciju apoptozne aktivnosti u usporedbi s kontrolnim teratomima. Ipak, u teratomima nastalim iz esiRNA tretiranih zametaka detektiran je lagani pad apoptozne aktivnosti u usporedbi s kontrolnom skupinom (Slika 31., 32. i 33.).



Slika 31. Apoptozna aktivnost u teratomima analizirana metodom otiska po Westernu. Prisutnost aktivne forme Kaspaze-3 u tkivu teratoma *in vitro* analizirana metodom otiska po Westernu i normirana na kontrolu. TCa=teratokarcinom



Slika 32. Prikaz membrane dobivene metodom otiska po Westernu s vizualiziranim signalom na antigen aktivna Kaspaza-3. Svjetlosni signal aktivne forme Kaspaze-3 i histona H2B pojedinog uzorka konvertiran je u digitalni podatak.

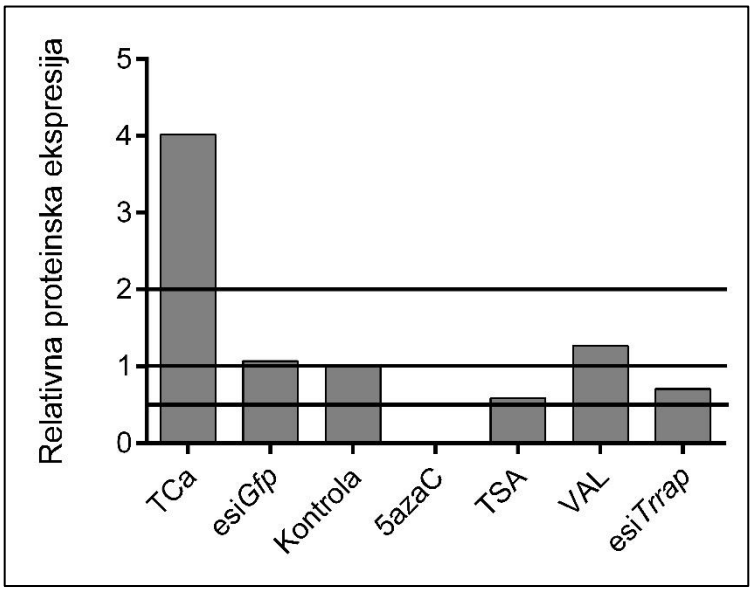


Slika 33. Prikaz računalne analize signala dobivenog metodom otiska po Westernu na antigen aktivnu Kaspazu-3. A - Prikaz piksela u području očekivane mase antigena aktivne Kaspaze-3; B - Prikaz piksela u području očekivane mase antigena Histona H2B; 1 - TCa; 2 - esi*Oct3/4*; 3 - 5azaC; 4 - Kontrola; 5 - VAL; 6 - TSA; 7 - esi*Trrap*; 8 - esi*Nanog*.

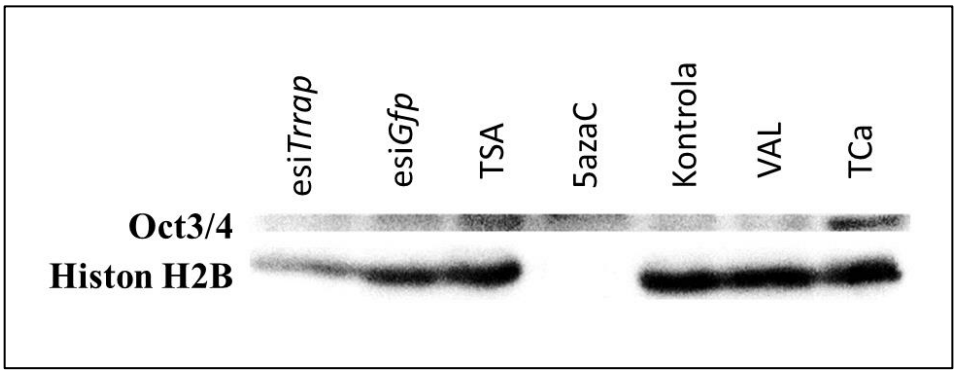
4.4 Markeri matičnosti tumora zametnih stanica *in vitro*

4.4.1 Gen matičnosti *Oct3/4*

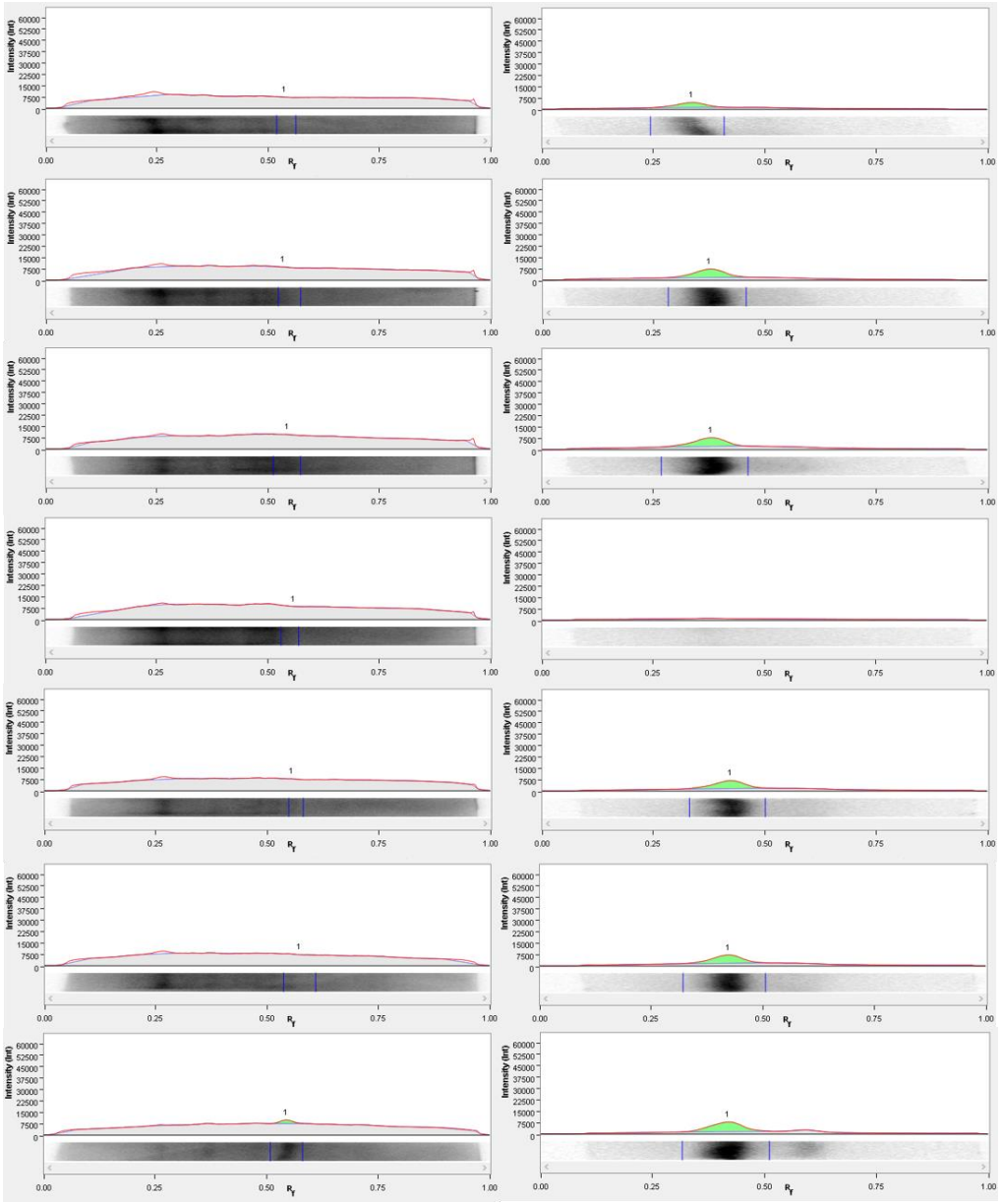
Analiza ekspresije gena matičnosti *Oct3/4* na proteinskoj razini, pokazuje stabilnost ovako postavljenog *in vitro* sustava, budući da se ekspresija u teratomima nastalim iz esi*Gfp* tretiranih zametaka ne razlikuje od ekspresije u teratoma kontrolne skupine. Teratomi nastali iz VAL-tretiranih zametaka također ne pokazuju promjenu u ekspresiji gena matičnosti *Oct3/4*. Ipak, TSA i esi*Trrap*, čini se, blago su inhibirali njegovu ekspresiju. Kod teratoma nastalih iz zametaka tretiranih 5azaC-om, esi*Oct3/4* i esi*Nanog*-om, tehnički se nije mogla dobiti kvalitetna analiza ekspresije *Oct3/4*, te stoga nije prikazana. Kako bi se osigurala kvaliteta dobivenih rezultata, u proces analize uvršten je i uzorak TCa miša nastao transplantacijom zametka *in vivo* kao referentni uzorak visoke ekspresije gena matičnosti *Oct3/4*, kako je i prikazano na grafu (Slika 34., 35. i 36.).



Slika 34. Ekspresija gena matičnosti *Oct3/4* u teratomima na proteinskoj razini analizirana metodom otiska po Westernu. Prisutnost proteina *Oct3/4* u tkivu teratoma *in vitro* analizirana metodom otiska po Westernu i normirana na kontrolu.

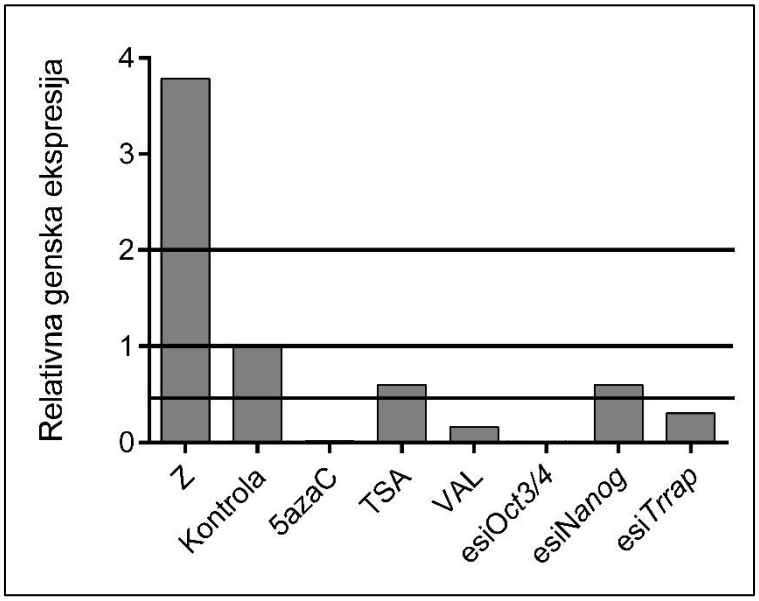


Slika 35. Prikaz membrane dobivene metodom otiska po Westernu s vizualiziranim signalom na antigen Oct3/4. Svjetlosni signal proteina Oct3/4 i histona H2B pojedinog uzorka konvertiran je u digitalni podatak. Sukladno prikazanome na slici, teratomi iz zametaka tretiranih s 5azaC pokazuju ekspresiju gena matičnosti, ali zbog nemogućnosti dobivanja signala histona H2B, isključeni su iz statističke obrade podataka.



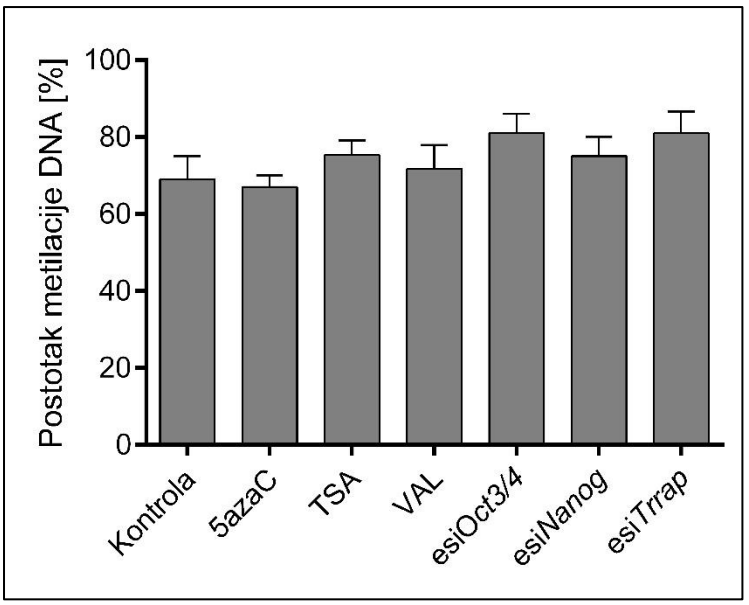
Slika 36. Prikaz računalne analize signala dobivenog metodom otiska po Westernu na antigen Oct3/4. A - Prikaz piksela u području očekivane mase antigena Oct3/4; B - Prikaz piksela u području očekivane mase antigena Histon H2B; 1 - esi*Trrap*; 2 - esi*Gfp*; 3 - TSA; 4 – 5azaC; 5 - Kontrola; 6 - VAL; 7 – TCa.

Analiza teratoma metodom ddPCR-a, pokazuje skoro četiri puta veću ekspresiju gena matičnosti *Oct3/4* u izoliranim zamecima od kontrolnih teratoma te potpuni izostanak ekspresije *Oct3/4* u tumorima iz zametaka tretiranih s 5azaC kao i s esi*Oct3/4* koji interferira s *Oct3/4* mRNA. Značajna smanjenja ekspresije *Oct3/4*su detekt irana u skupinama teratoma nastalih iz zametaka tretiranih s VAL ili esi*Trrap* u odnosu na kontrolu. Premda upitne statističke značajnosti, drastična smanjenja ekspresije gena matičnosti detektirana su i u ostalim skupinama u odnosu na kontrolu (Slika 37.).



Slika 37. Ekspresija gena matičnosti *Oct3/4* na razini mRNA u teratomima. Grafički prikaz prisutnosti biljega matičnosti *Oct3/4* dobivene ddPCRom. Podaci su normirani na kontrolu. Z=zametak

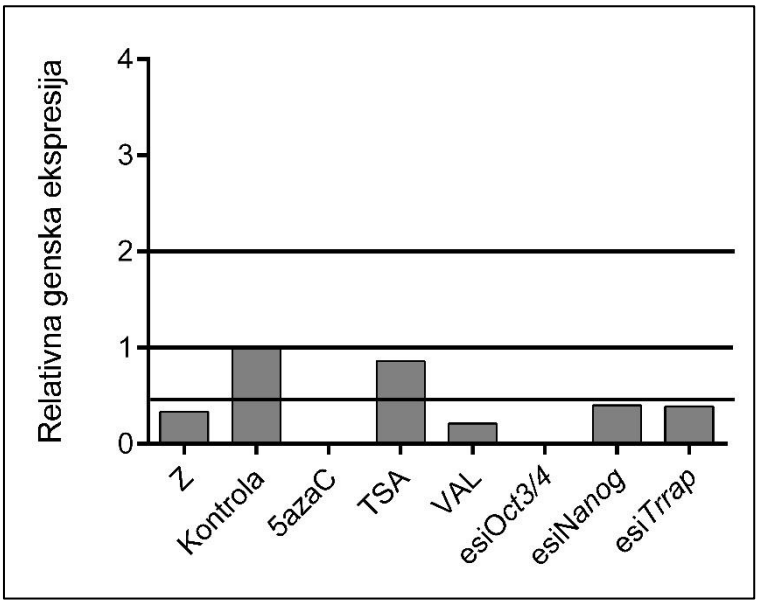
Analiza metilacije DNA promotorske regije gena matičnosti *Oct3/4* pokazuje konzistentno visoku razinu metiliranosti DNA u svim skupinama. U prosjeku, oko 30% stanica kontrolnih tumora pokazuje nemetiliranost DNA promotora dok tumori nastali iz esi*Oct3/4* tretiranih zametaka pokazuju najmanji postotak stanica (20%) s nemetiliranom promotorskom regijom gena matičnosti *Oct3*/4. Postoji također generalni trend hipermetilacije DNA u gotovo svim tretiranim skupinama osim one tretirane s 5azaC u odnosu na kontrolu. Ipak, primijećeni hipermetilacijski trend, nije statistički značajan (Slika 38.).



Slika 38. Metilacija DNA promotorske regije gena matičnosti *Oct3/4* u teratomima. Grafički prikaz metilacije DNA dobiven pirosekvenciranjem (Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparison test). Prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije.

4.4.2 Gen matičnosti *Nanog*

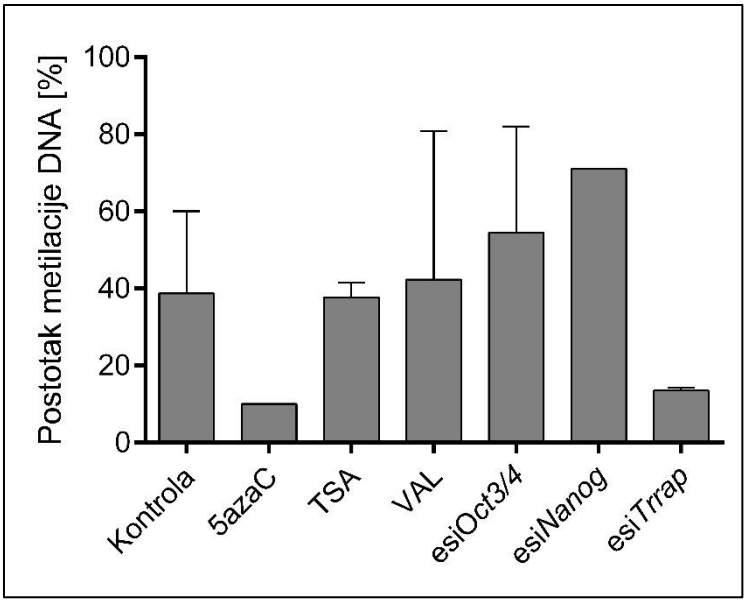
Analiza teratoma metodom ddPCR-a, pokazuje nižu ekspresiju gena matičnosti *Nanog* u zamecima u odnosu na kontrolne teratome te njezin potpuni izostanak u tumorima iz zametaka tretiranih s 5azaC i esi*Oct3/4*, dok su statistički značajna smanjenja detektirana u skupinama tretiranima s VAL, esiNanog i esi*Trrap*. Vrlo blago smanjenje ekspresije gena matičnosti detektirano je u skupini teratoma nastalih iz zametaka tretiranih s TSA (Slika 39.).



Slika 39. Ekspresija gena matičnosti *Nanog* na razini mRNA u teratomima. Grafički prikaz kvantifikacije biljega matičnosti *Nanog* dobivene ddPCRom. Podaci su normirani na kontrolu. Z=zametak

Analiza metilacije DNA promotorske regije gena matičnosti *Nanog* pokazuje snažnu neravnomjernost razine metiliranosti DNA po skupinama uspoređenima međusobno, ali i unutar samih skupina. Tako u tumora iz zametaka teratomima tretiranih s VAL, razina DNA metilacije gena *Nanog* varira za više od 60%. U odnosu na prosječnu vrijednost metilacije DNA kontrolne skupine, TSA i VAL tretirani zameci pokazuju jednaku razinu metiliranosti DNA u nastalim tumorima. Drastičnu demetilaciju u odnosu na kontrolu potaknuo je očekivano 5azaC, ali i esi*Trrap*. Tumori nastali iz zametaka tretiranih s Esi*Oct3/4* i esi*Nanog* pokazuju povećanje razine metilacije DNA. Opisano pokazuje isključivo trendove, budući da statistička obrada podataka

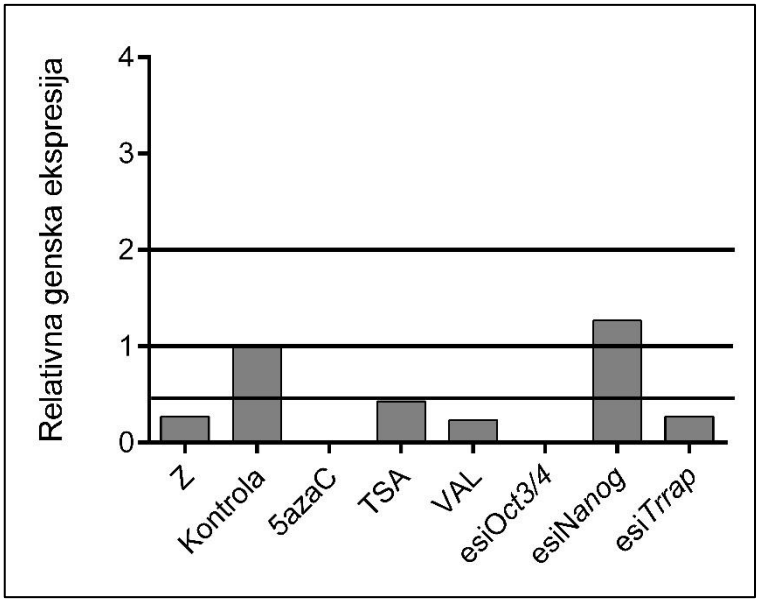
ne pronalazi značajnu razliku među skupinama (Slika 40.).



Slika 40. Metilacija DNA promotorske regije gena matičnosti *Nanog* u teratomima. Grafički prikaz metilacije DNA dobiven pirosekvenciranjem (Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparison test). Prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije.

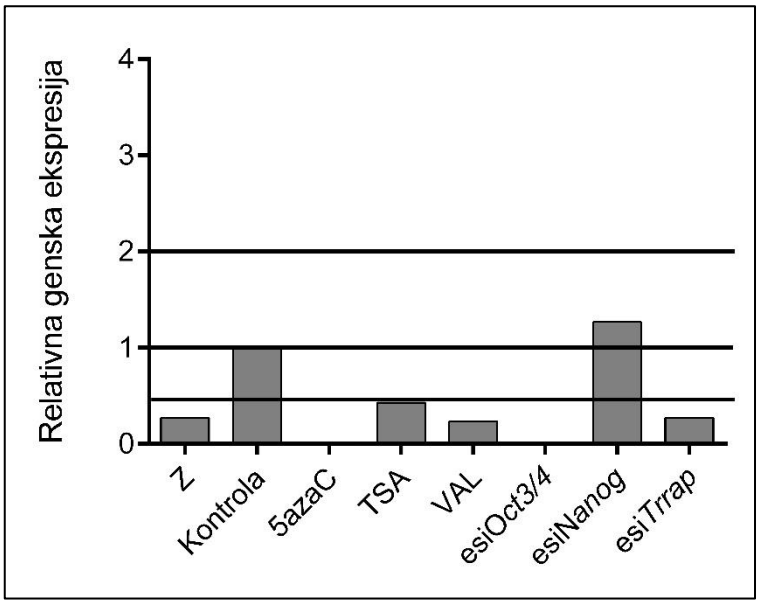
4.4.3 Gen matičnosti *Sox2*

Analiza teratoma metodom ddPCR-a, pokazuje potpuni izostanak ekspresije gena matičnosti *Sox2* u tumorima iz zametaka tretiranih s 5azaC i esi*Oct3/4*, dok su statistički značajna smanjenja u odnosu na kontrolu detektirana u skupinama teratoma dobivenih iz zametaka tretiranih s VAL, TSA i esi*Trrap* . Malo povećanje ekspresije gena matičnosti detektirano je u skupini tretiranoj esi*Nanog* (Slika 41.).



Slika 41. Ekspresija gena matičnosti *Sox2* na razini mRNA u teratomima. Grafički prikaz kvantifikacije biljega matičnosti Sox2 dobivene ddPCR-om. Podaci su normirani na kontrolu. Z=zametak

Analiza metilacije DNA promotorske regije gena matičnosti *Nanog* pokazuje određenu konzistentnost razine metiliranosti DNA unutar skupina. Podaci pojedinih skupina uspoređenih međusobno ne pokazuju statistički značajnu razliku u ekspresiji gena *Sox2*. Također se ne mogu detektirati ni eventualni trendovi pomaka razine metilacije DNA, već su rezultati konzistentno uniformni za sve analizirane skupine (Slika 42.).

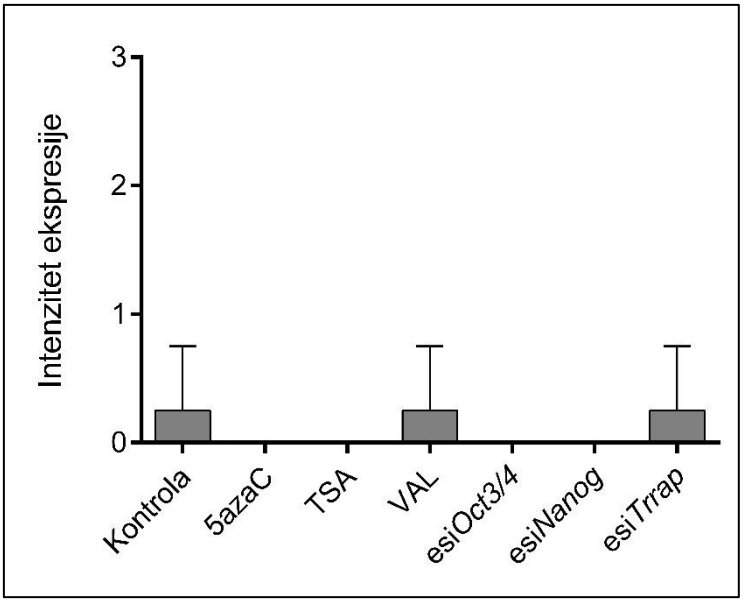


Slika 42. Metilacija DNA promotorske regije gena matičnosti *Sox2*u teratomima. Grafički prikaz metilacije DNA dobiven pirosekvenciranjem (Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparison test). Z=zametak

4.5 Stupanj i smjer diferencijacije stanica tumora zametnih stanica *in vitro*

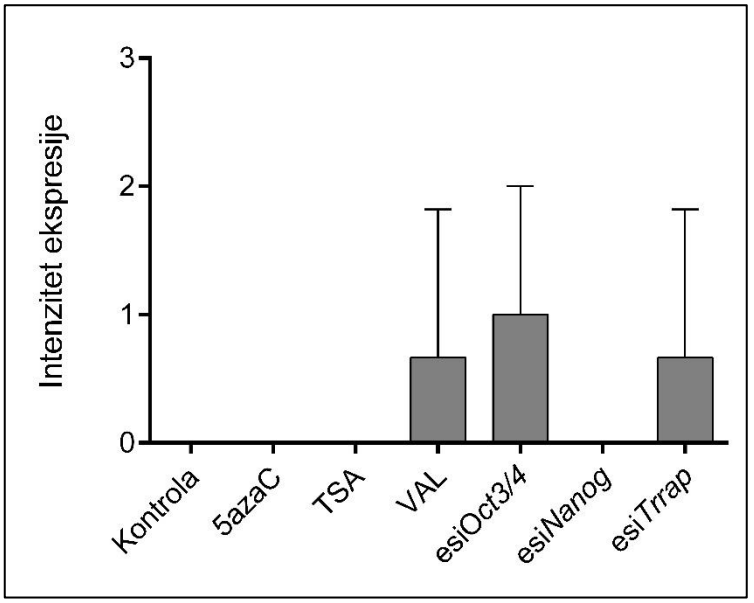
Morfometrijskom analizom ekspresije gena intermedijarnih filamenata kao biljega stanica derivata ektoderma, glije (Gfap) i neurona (Neurofilament), na razini proteina dobivenoj metodom IHC, utvrđeno je da ni u jednom preparatu TZS *in vitro* nijedne skupine nema njihove ekspresije na razini proteina.

Morfometrijskom analizom biljega dermoektoderma, odnosno, matičnih bazalnih stanica epidermisa, Citokeratin-15, utvrđeno je da generalno nema ekspresije na proteinskoj razini u TZS *in vitro*, izuzev rijetkih uzoraka (Slika 43.).



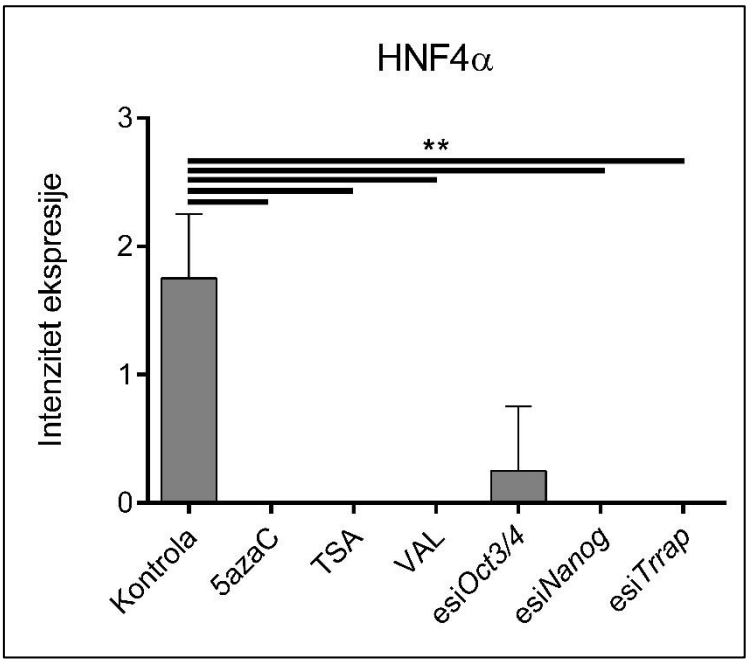
Slika 43. Analiza diferencijacije u smjeru dermoektoderma na proteinskoj razini analizirana metodom IHC u teratomima. Grafički prikaz podataka morfometrijske kvantifikacije biljega epidermisa Citokeratin-15 na imunohistokemijskim preparatima teratoma *in vitro* (Kruskal- Wallis test, Dunn's multiple comparison test). Prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije.

Morfometrijskom analizom utvrđeno je da stanice kontrolnih tumora ne eksprimiraju biljeg neuroektoderma Nestin. Izostanak ekspresije dokazan je i u skupini tumora nastalih iz zametaka tretiranih s 5azaC, TSA i esi*Nanog*. Međutim, tretman s Valproatom, esi*Oct3/4* i esi*Trrap* ukazuje na aktivaciju ekspresije Nestina i diferencijaciju neuroektoderma (Slika 44.).



Slika 44. Analiza diferencijacije u smjeru neuroektoderma na proteinskoj razini analizirana metodom IHC u teratomima. Grafički prikaz podataka morfometrijske kvantifikacije biljega matičnih stanica neuroektoderma nestina na imunohistokemijskim preparatima teratoma *in vitro* (Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparison test). Prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije.

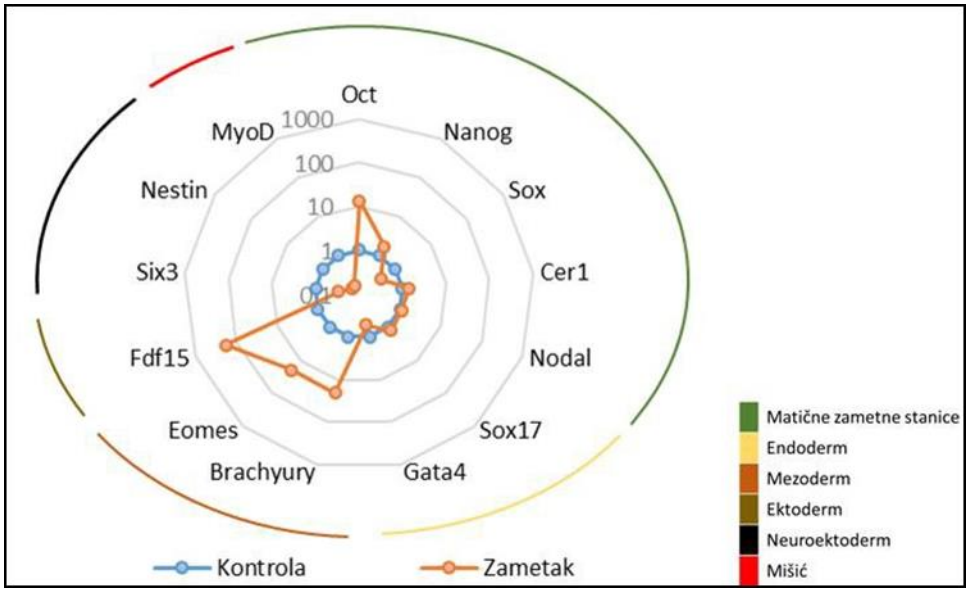
Morfometrijskom analizom ekspresije gena biljega matičnih stanica endoderma, Hnf4α, primijećena je snažna statistički značajna redukcija signala u tumorima svih tretiranih skupina u odnosu na kontrolu. Uistinu, dok je u kontrolnim uzorcima detektirana umjerena ekspresija HNF4α, svi korišteni agensi doveli su do potpune inhibicije ekspresije gena biljega matičnih stanica endoderma HNF4α, na proteinskoj razini (Slika 45.).



Slika 45. Analiza diferencijacije u smjeru endoderma na proteinskoj razini analizirana metodom IHC u teratomima. Grafički prikaz podataka morfometrijske kvantifikacije biljega matičnih stanica endoderma Hnf4α na imunohistokemijskim preparatima teratoma *in vitro* (Kruskal- Wallis test, Dunn's multiple comparison test). Prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije. ** $p \leq 0{,}005$.

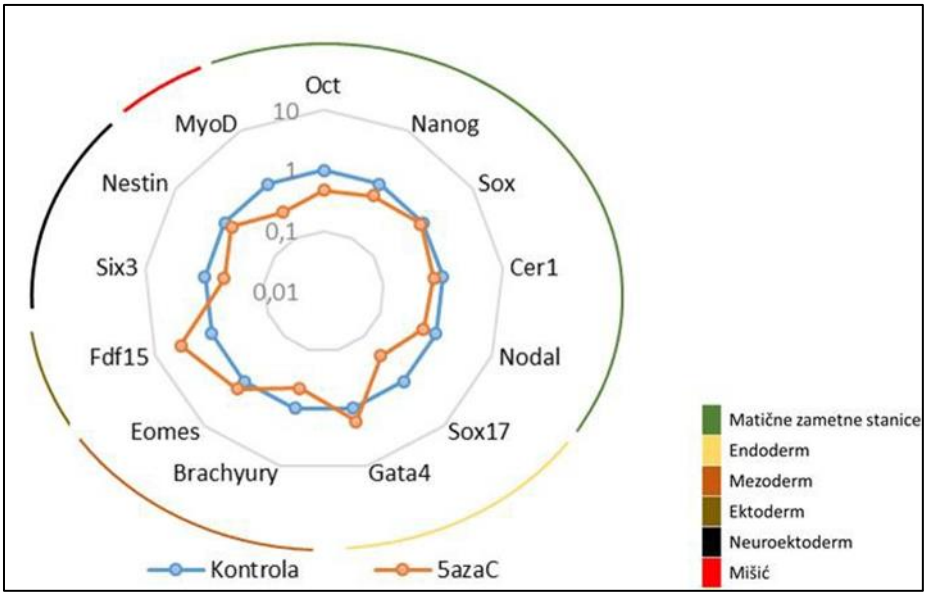
Istraživanje diferencijacijskih procesa analizom genske ekspresije biljega različitih diferencijacijskih linija na razini mRNA pomoću qPCR-a pokazuju slične trendove opisane analizom ekspresije na razini proteina.

Prije svega, snažno je izražen pomak diferencijacijske aktivnosti kontrolnih tumora prema analiziranom zbirnom uzorku gastrulirajućih zametaka. Od panela analiziranih gena biljega matičnosti svi pokazuju istu razinu ekspresije izuzev gena matičnosti *Oct3/4* koji u kontrolnim tumorima pokazuje drastičan pad ekspresije u odnosu na zametak što bi bilo u skladu s postupnim gubitkom matičnosti i početkom diferencijacije u teratomu. Kontrolni tumori ne pokazuju nikakav pomak u endodermalnoj liniji dok je izrazito snažno smanjenje ekspresije gena mezoderma i ektoderma, u odnosu na zametak. Najsnažnije povećanje ekspresije u kontrolnim tumorima pokazuju geni neuroektodermalne diferencijacijske linije te diferencijacije mišića, u odnosu na gastrulirajući zametak koji sadrži ektoderm, mezoderm i endoderm (Slika 46.).



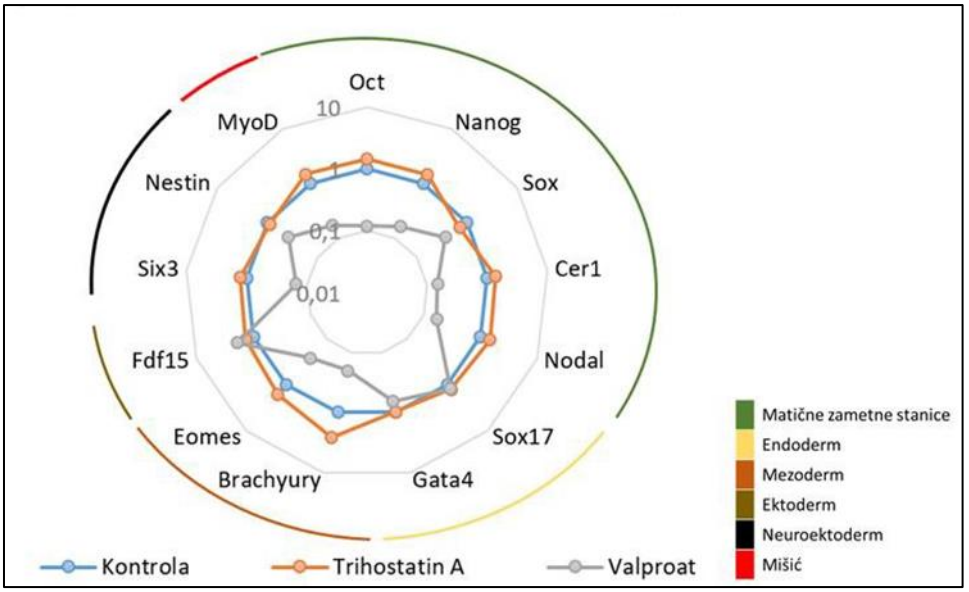
Slika 46. Diferencijacijski pomak zametka u odnosu na kontrolni teratom. Prikaz odstupanja ekspresijskog profila pojedinih gena u tkivu zametnog cilindra u odnosu na kontrolnu skupinu teratoma. Podaci su normirani na vrijednosti kontrolne skupine (logaritamska skala, Radar graf).

DNA demetilacijski agens 5azaC inducirao je diferencijacijski pomak u svim linijama. Najsnažniji pomak uočen je prema ektodermalnoj liniji pojačanjem ekspresije gena *Fdf15*, te mišićne diferencijacijske linije smanjenjem ekspresije gena *MyoD*. Uočena je i smanjena ekspresija gena matičnih stanica, posebice gena matičnosti *Oct3/4* te gena biljega neuroektoderma. Nekonzistentni pomaci uočeni su u ostalim diferencijacijskim linijama (Slika 47.).



Slika 47. Diferencijacijski pomak tumora uzrokovan promjenom metilacije DNA. Prikaz odstupanja ekspresijskog profila pojedinih gena u teratomima nastalim iz zametaka tretiranima 5azaC-om u odnosu na kontrolnu skupinu. Podaci su normirani na vrijednosti kontrolne skupine (logaritamska skala, Radar graf).

Tretiranje zametka inhibitorima histonskih deacetilaza, TSA i VAL u nastalim teratomima uzrokuje različit intenzitet diferencijacijskih pomaka u odnosu na kontrolne tumore, ali i različite trendove djelovanja na ekspresiju analiziranih gena na razini mRNA. Naime, TSA načelno blago podiže ekspresiju gotovo svih analiziranih gena svih diferencijacijskih linija. VAL, naprotiv, snažno inhibira ekspresiju gena svih diferencijacijskih linija izuzev ektodermalne i endodermalne diferencijacijske linije (Slika 48.).

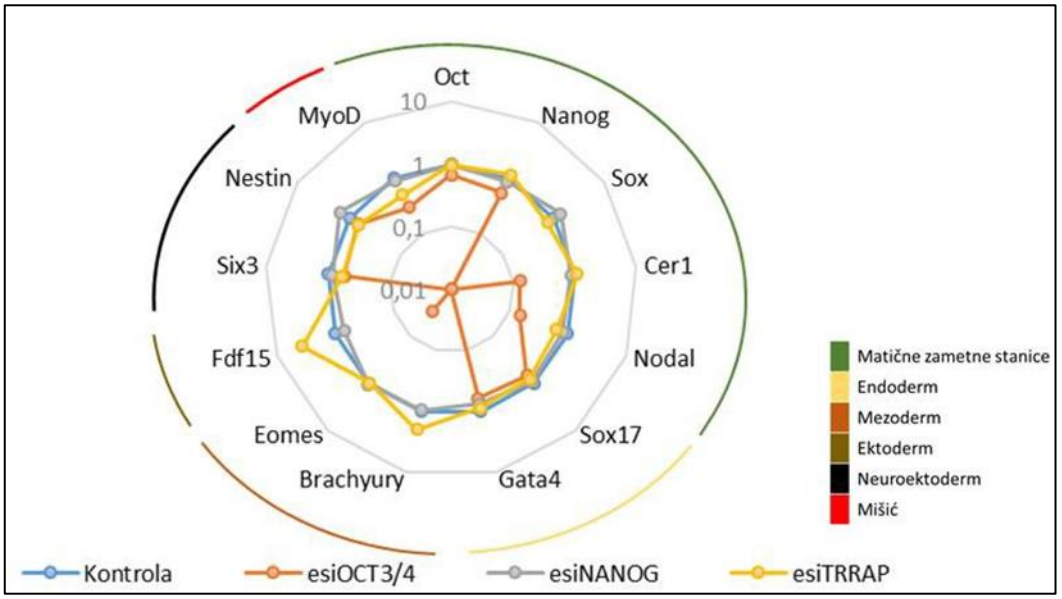


Slika 48. Diferencijacijski pomak tumora uzrokovan modulacijom acetilacije histona. Prikaz odstupanja ekspresijskog profila pojedinih gena u teratomima razvijenim iz zametaka tretiranima s VAL i TSA u odnosu na kontrolnu skupinu teratoma. Podaci su normirani na vrijednosti kontrolne skupine (logaritamska skala, Radar graf).

Tretiranje tumora esiRNA također pokazuje različit intenzitet induciranog pomaka diferencijacijskih procesa u odnosu na kontrolu te različite obrasce pomaka diferencijacijskih linija ovisno o ciljnom genu esiRNA molekula.

Tako esi*Nanog* gotovo u potpunosti prati razine ekspresije analiziranih gena dobivenih u kontrolnih tumora te ne pokazuje značajnu promjenu ekspresije nijednog analiziranog gena na razini mRNA. Esi*Trrap* također nije izazvao značajne pomake ekspresije promatranih gena izuzev značajno povećane ekspresije gena *FDF15* sugerirajući značajan pomak prema ektodermalnoj diferencijacijskoj liniji. Blagi pomaci uočeni su u ekspresiji gena biljega mezoderma i mišićne diferencijacijske linije, odnosno povećanje ekspresije gena *Brachyury* i smanjenje ekspresije gena *MyoD*. Drastičan pomak diferencijacijskih procesa izazvan je tretmanom esi*Oct3/4*. U potpunosti je suprimirana mezodermalna linija, te drastično smanjena ekspresija većine gena biljega matičnosti kao i biljega ektodermalne diferencijacijske linije. Smanjena je također i linija diferencijacije mišića smanjenjem ekspresije gena *MyoD*. S druge

strane, endodermalna i neuroektodermalna linija čine se netaknute tretmanom esi*Oct3/4* bez promjena ekspresije gena biljega ovih diferencijacijskih linija (Slika 49.).



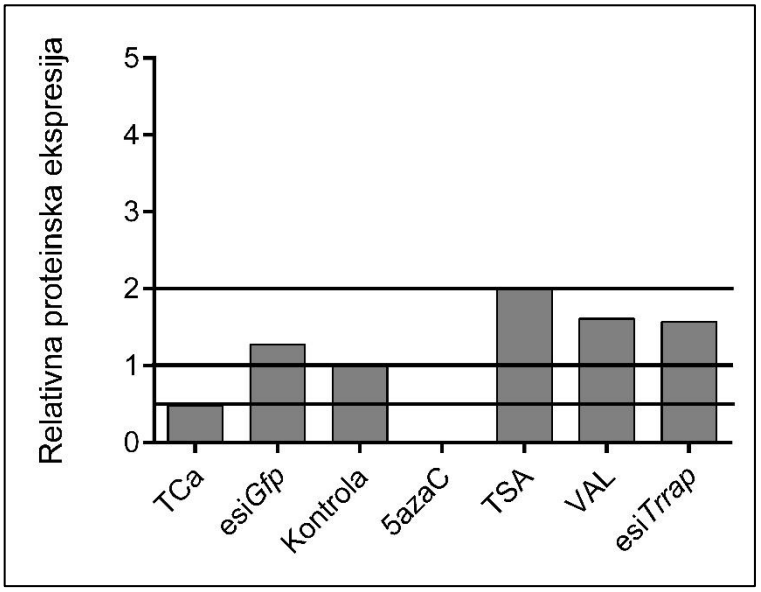
Slika 49. Diferencijacijski pomak uzrokovan modulacijom RNAi. Prikaz odstupanja ekspresijskog profila pojedinih gena u tumorima nastalim iz zametaka tretiranih sa esiRNA molekulama u odnosu na kontrolnu skupinu. Podaci su normirani na vrijednosti kontrolne skupine (logaritamska skala, Radar graf).

4.6 Globalni epigenetički biljezi u tumoru zametnih stanica *in vitro*

Globalna acetilacija histona kao i globalna metilacija DNA upućuju na šire djelovanje testiranih tvari na genom stanica te učinak testiranih tvari na sveukupno stanje kromatina uključujući i permisivnost za transkripciju.

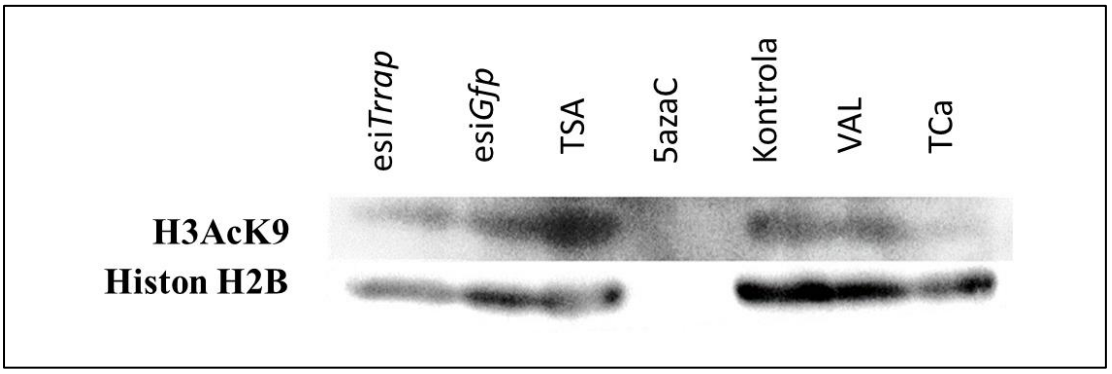
4.6.1 Globalna acetilacija H3

Detekcija prisutnosti biljega acetilacije H3AcK9 upućuje na razinu globalne acetilacije histona. HDCi, TSA i VAL tretman zametka očekivano izazivaju porast prisutnosti biljega acetilacije H3AcK9 u tkivu teratoma odnosno snažnu acetilaciju histona. Gotovo identičan učinak uočen je u tumora nastalih iz esi*Trrap*-tretiranih zametaka (Slika 50., 51. i 52.).

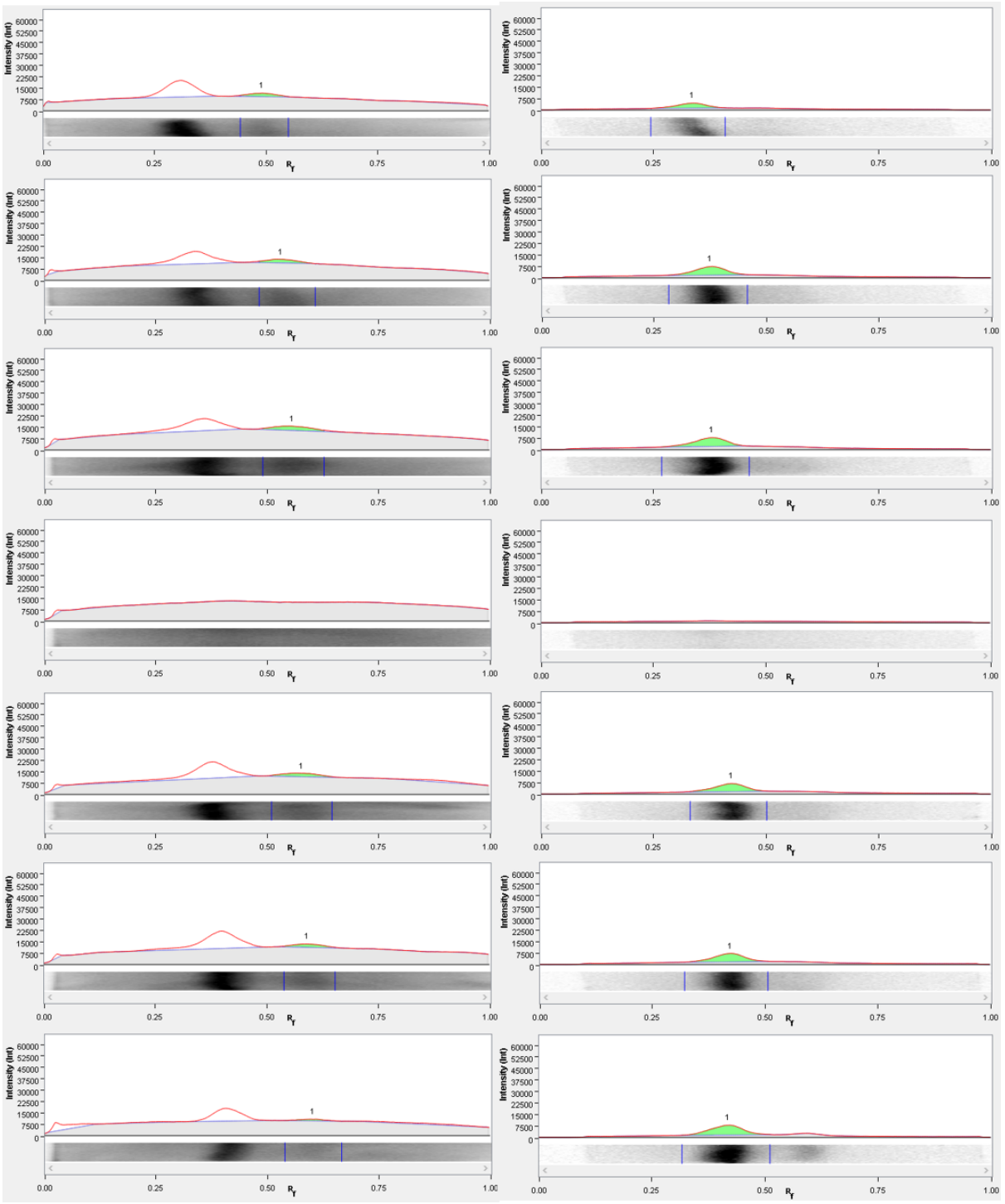


Slika 50. Globalna acetilacija histona u teratomu *in vitro*. Grafički prikaz izmjerene razine H3AcK9 normirane na kontrolu dobiven je metodom otiska po Westernu i normiran na kontrolu. TCa=teratokarcinom

Podaci ostalih skupina su problematični. Naime, značajna deacetilacija histona izazvana 5azaC, vjerojatno je metodološka pogreška uzrokovana malom količinom proteina u homogenatu tkiva, a zbog male količine uzorka uopće. Naime, vrpce koje se odnose na ekspresiju H2B i H3AcK9, vidljive na membrani, iznimno su nježne te računalna obrada digitalizirane vrijednosti pruge nudi mogućnost više rezultata ovisno o razini blokiranja pozadinskog šuma na membrani. Ovdje je prikazan rezultat srednje visokog praga blokiranja šuma što dovodi do matematičkog rezultata ≥0. Podaci za učinak esi*Oct3/4* i esi*Nanog* nisu ni prikazani jer nije bilo moguće uopće detektirati nijedan protein na membranama te postoji opravdana sumnja da na rezultat prisutnosti H3AcK9 presudan utjecaj ima nespecifičan pozadinski šum na membrani (Slika 50., 51. i 52.).



Slika 51. Prikaz membrane dobivene metodom otiska po Westernu s vizualiziranim signalom na antigen H3AcK9. Signali su dobiveni metodom otiska po Westernu. TCa=teratokarcinom

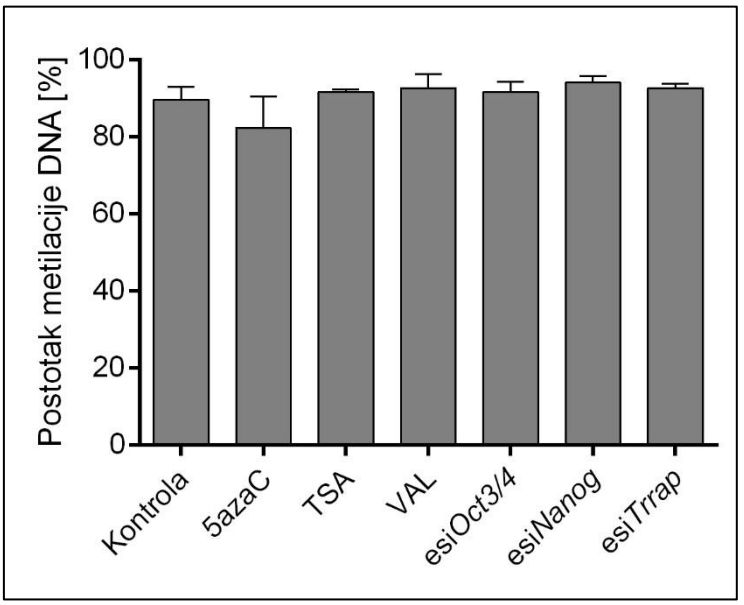


Slika 52. Prikaz računalne analize signala dobivenog metodom otiska po Westernu na antigen H3AcK9. A - Prikaz piksela u području očekivane mase antigena H3AcK9; B - Prikaz piksela u području očekivane mase antigena Histon H2B; 1 - TCa; 2 - esi*Oct3/4*; 3 - 5azaC; 4 - Kontrola; 5 - VAL; 6 - TSA; 7 - esi*Trrap*; 8 - esi*Nanog*.

4.6.2 Globalna metilacija DNA

Detekcija prisutnosti 5-metilcitozina (5mC), biljega metilacije DNA, u repetitivnoj sekvenci *Mml*, ukazuje na razinu globalne metilacije DNA.

Analiza podataka razine globalne metilacije DNA upućuje na konzistentnost unutar pojedine skupine te skupina međusobno. Svi uzorci imaju oko 90% metiliranosti DNA. Izuzetak je većina uzoraka tumora tretiranih demetilacijskim agensom 5azaC. Naime, vrijednosti metilacije DNA vidljivo se smanjuje te načelno ukazuju na trend inducirane hipometilacije DNA s prosječnom vrijednosti metilacije DNA oko 80%. Ipak, opisani trend globalne hipometilacije nije statistički značajan (Slika 53.).



Slika 53. Globalna metilacija DNA teratoma *in vitro*. Grafički prikaz metilacije DNA repetitivne sekvence *Mml* dobiven pirosekvencioniranjem (Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparison test). Prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije.

5 RASPRAVA

U ovom istraživanju proučen je učinak epigenetički aktivnih tvari na rast i razvoj eksperimentalnog tumora zametnih stanica (TZS) miša *in vitro*. Budući da postoje tri kanonska epigenetička mehanizma (7), u cilju određivanja je li jatrogena stimulacija pojedinog epigenetičkog mehanizma snažnija u modulaciji rasta i razvoja tumora, korištene su tvari koje primarno djeluju na jedan od kanonskih mehanizama. Tako je za testiranja učinka jatrogene modulacije metilacije DNA odabran najprominentniji DNA demetilirajući agens 5azaC koji je prvi odobreni epigenetički lijek u medicinskoj praksi (139). Učinak jatrogene modulacije sustava posttranslacijskih modifikacija histona istražen je korištenjem TSA i VAL. Obje supstancije također se koriste u kliničkoj praksi, a primarno podižu stupanj acetiliranosti histona (163). Učinak jatrogene stimulacije RNAi sustava istražen je upotrebom esiRNA molekula sintetiziranih specifično u cilju inhibicije ekspresije gena (218) jezgre matičnosti tumorskih stanica, gena *Oct3/4* i *Nanog*, te gena *Trrap* kojeg se može smatrati tumor promovirajućim genom.

5.1 Utjecaj 5-azacitidina na rast i razvoj eksperimentalnog tumora zametnih stanica miša *in vitro*

DNA demetilirajući agens 5azaC pokazao je drastičan učinak na smanjenje rasta TZS *in vitro*. Krivulja rasta tumora dobivanih iz zametaka tretiranih s 5azaC odvaja se od krivulje kontrolnih tumora u samom početku te ostaje niska tijekom cijelog perioda praćenja rasta tumora. To navodi na zaključak da 5azaC ima snažan biološki učinak odmah po tretmanu te da embrionalne odnosno tumorske stanice nisu više sposobne kompenzirati i restaurirati inhibirani rast. Uistinu, ranije je opisana dugotrajnost inhibicijskog učinka 5azaC-a na rast tumora kao temeljno svojstvo njegove upotrebe u liječenju raka (141).

Istraživanja upućuju na različite biološke učinke 5azaC-a na rast različitih tkiva. Tako 5azaC upravo inhibicijom proliferacije zametnih stanica onemogućava normalan rast pupoljaka uda *in vitro* (219) ili rasta fetalne jetre *in vivo* (220). Nasuprot navedenom, mnoga istraživanja upućuju da 5azaC upravo promiče proliferacijsku aktivnost, posebice nediferenciranih stanica u kulturi poput mezenhimskih matičnih stanica (160). Pojedini autori navode toliko snažno pro-

proliferacijsko djelovanje 5azaC-a da promiču njegovu upotrebu u regenerativnoj medicini (221). Većina istraživanja ipak upućuje na daleko kompleksniji odnos 5azaC-a i proliferacije stanica. Tako primjerice skupina autora opisuje kako 5azaC potiče proliferaciju stanica trofoblasta u ranoj fazi razvoja placente, iako ukupan rast placente značajno zaostaje za kontrolnom skupinom. U istom istraživanju autori opisuju drastičan pad proliferacijske aktivnosti placenti tretiranih s 5azaC kasnije tijekom razvoja uz daljnji nastavak smanjenja ukupne tkivne mase (222). Sličan fenomen pojavljuje se i u ovom istraživanju. U eksperimentalnom TZS *in vitro* 5azaC inducira snažnu inhibiciju rasta tumora, ali i lagani porast broja stanica koje eksprimiraju proliferacijski biljeg. Ipak, pad ukupne količine biljega proliferacije u tumoru svakako upućuje na oštećenje proliferacijske mašinerije tretiranih stanica, koje, čini se, bezuspješno pokušavaju kompenzirati neto gubitak tumorske mase.

Inhibicija rasta tumora zametnih stanica *in vitro* inducirana pomoću 5azaC svakako je izazvana laganim porastom apoptozne aktivnosti. Naime, rezultati upućuju na lagano povećanje populacije stanica koje eksprimiraju biljeg apoptoze, ali i lagani porast količine apoptoznih biljega u ukupnom homogenatu tkiva, što upućuje na proapoptozno djelovanje 5azaC u tumorima s posljedičnim padom ukupne tumorske mase. Sličan proapoptozni učinak 5azaC opisan je u mnogim istraživanjima od kojih je svakako najvažnije ono provedeno na staničnim linijama TZS čovjeka *in vitro*. Naime, 5azaC je inducirao apoptozu pri niskim nanomolarnim koncentracijama. Autori opisuju apoptozni odgovor neposredno po tretmanu iza kojeg je uslijedio produljeni inhibicijski učinak na vitalnost stanica i trajna inhibicija napredovanja staničnog ciklusa tumorskih stanica (223). Pritom, primaran mehanizam proapoptoznog djelovanja 5azaC ostaje i dalje nejasan (141).

Inhibicija ekspresije gena jezgre matičnosti tumorskih stanica svakako je najsnažniji protutumorski učinak 5azaC detektiran u ovom istraživanju. Naime, 5azaC je u potpunosti inhibirao ili drastično smanjio ekspresiju svih gena jezgre matičnosti *Oct3/4*, *Nanog* i *Sox2*. Opisani učinak dokazan je i na proteinskoj i mRNA razini, što nedvosmisleno ukazuje na drastično smanjenje populacije tumorskih matičnih stanica u tumorima nastalim iz zametaka tretiranih s 5azaC u odnosu na kontrolnu skupinu. Premda navedeno pridonosi objašnjenju fenomena inducirane inhibicije rasta tumora pomoću 5azaC, doprinosi također i daljnjem nerazumijevanju njegovog biološkog djelovanja. Naime, pojedini autori opisuju potpuno suprotne rezultate s 5azaC inducirane reekspresije gena matičnosti posebice gena *Oct3/4* i *Sox2* (224, 225). Stoga se nameće kao hipoteza da učinak 5azaC na ekspresiju gena matičnosti

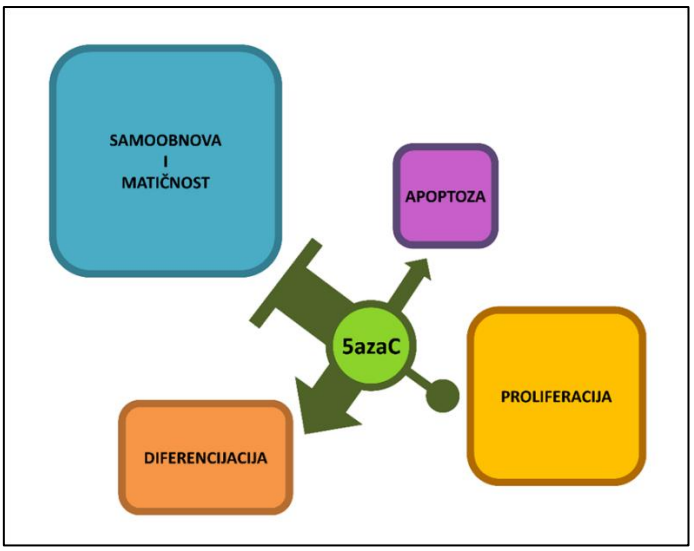
ovisi o histološkom tipu stanice i njenom diferencijacijskom stupnju.

U ovom istraživanju 5azaC je u prvom redu djelovao na čitavi mišji gastrulirajući zametak u užem smislu riječi (zametni cilindar) koji se sastoji od triju zametnih listića (ektoderm, mezoderm, endoderm) koji će se konačno razviti u trilaminarni teratom ali samo u u sustavu kultivacije in vitro na granici zraka i tekućine, dakle u određenim uvjetima okoliša. Znači, zametak za kojega je u ovom radu pokazano da posjeduje veliku količinu markera pluripotentnosti je stvarni izvor teratoma. Prema tome u ovom radu su DNA demetilacijsko sredstvo kao i inhibitori histonske deacetilacije djelovali direktno na stanice iz kojih se razvija tumor i tako značajno inhibirali njegovu sposobnost za rast. Ovi rezultati ujedno dokazuju da relativno kratka epigenetička manipulacija normalnim stanicama zametka stvarno utječe na proces tumorigeneze što je u skladu i s hipotezom da TZS nastaju već *in utero*. Pitanje se postavlja da li bi eksperimentalna metilacija i histonska deacetilacija tkiva zametka djelovale na povećanje rasta mišjeg teratoma, što bi vrijedilo istražiti. Također se postavlja pitanje ostatnog razvojnog potencijala u teratomima. Dakle, trebalo bi se istražiti kakav bi bio i da li bi bio moguć daljnji razvoj naknadnom transplantacijom u bolje metaboličke uvjete *in vivo* jer se znade da se iz vrlo male količine stanica kao što je epiblast u transplantatu može razviti veliki tumor (vidi u Buljubašić 2017).

Sam mehanizam kojim je 5azaC inhibirao ekspresiju gena matičnosti ostaje nerazjašnjen u ovom istraživanju. Naime, 5azaC nije izazvao promjenu razine metilacije promotorske regije gena *Oct3/4*, kao ni globalne metilacije DNA. Pomoću 5azaC inducirana hipometilacija promotora gena matičnosti mnogo je puta opisana u literaturi, ali ona upravo obično dovodi do pojačane, a ne smanjene ekspresije gena matičnosti (147, 226). Drugi mogući mehanizam inhibicije ekspresije gena je deacetilacija histona promotorske regije gena. I uistinu, u ovom istraživanju 5azaC inducirao je gubitak biljega acetilacije histona na globalnoj razini, što ostavlja mogućnost da se dio deacetilacijske aktivnosti dogodio upravo na promotorskim regijama gena matičnosti i inhibirao njihovu ekspresiju. Ipak, valja napomenuti da postoji realna mogućnost metodološke pogreške koja proizlazi iz iznimno male količine proteina iz tumora drastično smanjenog rasta. Pored toga, u literaturi se navodi upravo obrnuti učinak 5azaC. Tako primjerice Manzoni i sur. navode kako 5azaC inducira HAT1 ekspresiju čime se podiže globalna acetiliranost genoma što za posljedicu može imati pojačanu ekspresiju gena matičnosti *Oct3/4*, *Nanog* i *Sox2* (149). Sve navedeno upozorava da učinak 5azaC na smanjenje ekspresije gena matičnosti nije primarno posljedica poremećaja transkripcije nakon DNA demetilacijskih ili

histon acetilacijskih procesa, već potencijalno translacije mRNA. Naime, još prije skoro 50 godina otkriveno je da se 5azaC integrira u RNA molekule te ometa procese u kojima sudjeluju (227). Novija istraživanja potvrđuju ovu hipotezu. Geyer i suradnici navode da 5azaC izaziva inhibiciju *de novo* sinteze proteina u rasponu od 68% do 81%. Ovu snažnu inhibiciju translacije autori objašnjavaju upravo integracijom 5azaC u novosintetizirane molekule RNA (rRNA, tRNA, mRNA i miRNA), što remeti funkciju molekula RNA dovodeći do inhibicije sinteze proteina. Nadalje, autori navode da s 5azaC inducirana inhibicija translacije nije nespecifična i globalna, već zahvaća specifičnu skupinu gena (228). Upravo bi ovaj koncept mogao objasniti mehanizam kako 5azaC inducira u ovom istraživanju otkrivenu inhibiciju ekspresije gena jezgre matičnosti u stanicama eksperimentalnog TZS *in vitro* bez snažnijih promjena u sustavima metilacije DNA i postranslacijskih histonskih modifikacija na promotorskoj ili globalnoj razini.

Učinak 5azaC na diferencijacijske procese možda je i najistraženije djelovanje ovog demetilacijskog agensa. Već desetljećima se 5azaC koristi za snažne jatrogene pomake diferencijacije, iako ne nužno u istom smjeru. Tako je poznat dediferencijacijski učinak 5azaC koji primarno demetilacijskim djelovanjem pomiče diferenciranu stanicu u stanje pluripotentnosti i veće plastičnosti (149, 229) što ga čini važnim oruđem u biologiji reprogramiranja stanica i istraživanju induciranih pluripotentnih stanica, a time i regenerativnoj medicini uopće (230). Ipak, u istraživanjima matičnih i nediferenciranih stanica, a ne samo tumora, 5azaC poznati je induktor diferencijacije. Tako primjerice Rachel i sur. promiču upotrebu 5azaC u liječenje kardiovaskularnih bolesti upotrebom skafoida natopljenih 5azaC koji u *in vivo* uvjetima potiče diferencijaciju mezenhimalnih matičnih stanica u funkcionalne kardiomiocite (231). Epigenetičko remodeliranje pomoću 5azaC dokazano inducira snažnu diferencijaciju stanica karcinoma jetre u nemaligne diferencirane funkcionalne hepatocite zbog čega se 5azaC navodi kao potencijalni lijek upravo za hepatocelularni karcinom (232).



Slika 54. Učinak 5azaC na rast i razvoj eksperimentalnog tumora zametnih stanica *in vitro*. Jednokratni tretman 5azaC-om neposredno pred početak kultiviranja u *in vitro* sustavu izazvao je dugotrajnu inhibiciju rasta tumora primarno potaknuvši apoptoznu aktivnost stanica, te smanjio maligni potencijal tumora inhibicijom ekspresije gena matičnosti tumorskih matičnih stanica te indukcijom diferencijacije.

Pozitivan učinak 5azaC na diferencijaciju tumorskih matičnih stanica dokazan je u čitavom nizu istraživanja različitih tumora *in vivo* i *in vitro* poput leukemije, meduloblastoma, glioblastoma, neuroblastoma raka prostate, raka gušterače te TZS (126). Stoga i ne čudi da je 5azaC inducirao inhibiciju ekspresije gotovo svih biljega tkivnih matičnih stanica i u TZS miša *in vitro* u ovom istraživanju. Točan mehanizam kojim 5azaC pomiče stanice u viši stupanj diferencijacije u ovom istraživanju i dalje ostaje nepoznat, osim smanjenjem razine mRNA gena matičnosti. Pretpostavka je da je mehanizam identičan ili barem sličan gore opisanom mehanizmu kojim 5azaC inhibira ekspresiju gena jezgre matičnosti tumorskih matičnih stanica.

Naposljetku, čini se da je smanjeni rast tumora primarno posljedica s 5azaC induciranog smanjenja populacije tumorskih i tkivnih matičnih stanica te indukcije diferencijacije, uz lagan porast apoptozne aktivnosti bez značajnog utjecaja na proliferaciju (Slika 54). Navedeni učinci nisu se mogli objasniti 5azaC DNA demetilirajućim djelovanjem niti promjenom posttranslacijskih histonskih modifikacija na promotorskoj ili globalnoj razini.

U usporedbi s ostalim epigenetički aktivnim tvarima korištenima u ovom istraživanju, 5azaC nedvosmisleno pokazuje iznimno snažno protutumorsko djelovanje, ali zbog relativno nespecifičnog djelovanja demetilirajućih lijekova, teško je pretpostaviti njihovu masovniju upotrebu u kliničkoj praksi za TZS koji se uspješno liječi. Ipak, ostaje mogućnost korištenja opisanog protutumorskog djelovanja modulatora metilacije DNA u proširenim oblicima bolesti TZS, a posebice oblicima rezistentnima na cisplatinu kao terapijskom zlatnom standardu (223).

5.2 Utjecaj Trihostatina A na rast i razvoj eksperimentalnog tumora zametnih stanica miša *in vitro*

Inhibitor deacetilaza histona TSA pokazao je snažan učinak na smanjenje rasta TZS *in vitro*. Krivulja rasta TSA-om tretiranih tumora odvaja se od krivulje kontrolnih tumora u samom početku te pokazuje inhibirani rast tijekom cijelog perioda praćenja rasta tumora. To navodi na zaključak da TSA ima snažan biološki učinak odmah po tretmanu te da embrionalne odnosno tumorske stanice nisu više sposobne kompenzirati i restaurirati inhibirani rast. Većina istraživanja na tumorskim staničnim linijama upravo upućuje da TSA smanjuje rast tumorske mase, zbog čega se intenzivno istražuje kao potencijalni protutumorski lijek u čovjeka (233-235).

Smanjenje rasta tumora ne prati u potpunosti rezultate analize proliferacije stanica u eksperimentalnom tumoru zametnih stanica *in vitro*. Premda se ukupna količina proliferacijskih biljega u homogenatu proteina ne razlikuje, ukupan broj stanica koje eksprimiraju proliferacijske biljege lagano raste, u odnosu na kontrolnu skupinu. To je načelno u kontradikciji s većinom istraživanja TSA koji navode snažan antiproliferacijski učinak (236). Ipak, ovo djelovanje potencijalno je kontroverzno budući da mnogi autori opisuju upravo suprotan, pro-proliferacijski učinak TSA (171, 237). Nadalje, kao i kod 5azaC, postoji mogućnost da je riječ upravo o kompenzacijskom odgovoru tumorskih stanica koje zbog oštećenja tretiranih stanica bezuspješno pokušavaju kompenzirati neto gubitak tumorske mase.

Gubitak ukupne tumorske mase izazvan s TSA, može se objasniti zabilježenim porastom stanica koje eksprimiraju biljege apoptoze. Premda je porast apoptozne aktivnosti blag, sukladan je upravo nizu istraživanja koja jasno ukazuju na proapoptozno djelovanje TSA na tumorske stanice (168, 170).

TSA nedvosmisleno je smanjio i populaciju tumorskih matičnih stanica. Naime, iako ekspresija gena *Nanog* ostaje nepromjenjena, ekspresija gena jezgre matičnosti *Oct3/4* pada i na proteinskoj i na mRNA razini u usporedbi s kontrolnim tumorima. Gen jezgre matičnosti *Sox2* pokazuje još drastičniji pad ekspresije u TSA tretiranim tumorima. Sličan učinak drastične inhibicije u tumorskim matičnim stanicama opisali su Cai i sur. istražujući učinak TSA na rak gušterače (170). Mehanizam kojim TSA smanjuje ekspresiju gena matičnosti ostaje i dalje nepoznanica posebice zbog činjenice da većina autora opisuje potpuno suprotne rezultate TSA inducirane reekspresije gena matičnosti posebice gena *Oct3/4, Nanog i Sox2* (225, 237). Stoga se ponovno nameće hipoteza da učinak epigenetički aktivnih tvari na ekspresiju gena matičnosti ovisi o histološkom tipu stanice i njenom diferencijacijskom stupnju. kako je već opisano za 5azaC.

Diferencijacijski profil TSA tretiranih tumora ne odudara drastično od profila kontrolnih tumora. To ne iznenađuje budući da većina istraživanja, kako je već navedeno, učinak TSA povezuje primarno s proliferacijom i apoptozom. Ipak, čini se da TSA ima snažan učinak na stanice endodermalne linije budući da je značajno smanjio ekspresiju Hnf4α. Premda je *Hnf4α* neophodan za diferencijaciju hepatocita, važno je napomenuti da je njegova ekspresija važna za linijsko odvajanje endodermalnih matičnih stanica od mezodermalnih (238). Stoga protein Hnf4α predstavlja potentan biljeg endodermalne matične linije koja ako je aktivna pridonosi razvoju raka u čovjeka (239).

TSA, čini se, upravo smanjuje populaciju tumorskih matičnih stanica endodermalnog podrijetla smanjujući ekspresiju *Hnf4α*, gena koji se može promatrati i kao onkogen (239). Alternativno je objašnjenje pada ekspresije *Hnf4α* tranzicija epitelnih stanica u mezenhimalne izazvana sa TSA. Naime, rezultati jasno pokazuju značajno povećanje biljega matičnog mezoderma u odnosu na kontrolne tumore. Sličan učinak već je opisan u literaturi, te je poznato da TSA stimulira epitelno mezenhimalnu tranziciju uz povećanje biljega mezodermalnih matičnih stanica (240).

Što se tiče utjecaja na globalne epigenetičke markere, TSA je inducirao rast globalne acetilacije histona bez promjene globalne metilacije DNA u odnosu na kontrolne tumore. Taj učinak na globalno stanje kromatina dobro je opisan u literaturi, a novija istraživanja upućuju na mogućnost da globalna hiperacetilacija kromatina može izazvati pomak ekspresije specifičnih

gena s posljedičnim protutumorskim djelovanjem ili potencijalom (241).

Zaključno, inhibitor deacetilaza histona TSA drastično je smanjio rast TZS *in vitro* primarno podizanjem intenziteta apoptoze te smanjenjem populacije tumorskih matičnih stanica. Utjecaj TSA na proliferaciju, a posebice diferencijaciju stanica uz potencijalnu stimulaciju epitelno mezenhimalne tranzicije, kontroverzan je i zahtjeva daljnja istraživanja kako bi se razjasnili točni mehanizmi protutumorskog djelovanja TSA.

5.3 Utjecaj Valproata na rast i razvoj eksperimentalnog tumora zametnih stanica miša *in vitro*

Potpuno identičan biološki učinak TSA izazvao je VAL. Naime, inhibitor histonskih deacetilaza VAL također je drastično smanjio rast TZS *in vitro*. Krivulja rasta tumora nastalih iz tretiranih zametaka odvaja se od krivulje kontrolnih tumora u samom početku te pokazuje inhibirani rast tijekom cijelog perioda praćenja rasta tumora. To ponovno navodi na zaključak da inhibitori deacetilaza histona imaju snažan biološki učinak odmah po tretmanu te da embrionalne odnosno tumorske stanice nisu više sposobne kompenzirati i restaurirati inhibirani rast. Većina istraživanja na tumorskim staničnim linijama upravo upućuju na to da TSA smanjuje rast tumorske mase, zbog čega se intenzivno istražuje kao potencijalni protutumorski lijek u čovjeka (233, 235, 242).

Utjecaj VAL na proliferacijske i apoptozne procese, također je identičan učinku TSA, uz nešto slabiju aktivaciju proliferacije. a snažniju promociju apoptoze. Međutim, za razliku od TSA, ovi učinci VAL čine se daleko manje kontroverzni. Naime, poznato je da VAL djeluje na proliferacijske procese u tumorskim stanicama, najčešće inhibirajući mitozu. Najnovija istraživanja pokazuju da VAL inhibira proliferaciju tumorskih stanica smanjujući ekspresiju gena *EgfR*, *ErbB2*, i *ErbB3* u stanicama raka podizanjem ekspresije grupe miRNA koje inhibiraju ekspresiju gena obitelji *ErbB* (243). Indukcija apoptoze objašnjava se interakcijom VAL i različitih proapoptoznih puteva, a najnovija istraživanja ukazuju na stimulaciju apoptoze inhibicijom HDAC1/PTEN/Akt puta te ekspresije *Bcl-2* i *Beclin-1* što pokreće autofagiju tumorskih stanica (244).

Smanjenju tumorske mase svakako pridonosi i smanjenje populacije tumorskih matičnih stanica.

Premda je na razini proteina zabilježena razlika, u ovom je istraživanju VAL drastično smanjio ekspresiju svih gena jezgre matičnosti na razini mRNA. Isti učinak VAL na ekspresiju gena jezgre matičnosti u tumorima opisan je u nizu istraživanja *in vivo* i *in vitro* (245). Smanjenje ekspresije gena jezgre matičnosti zabilježeno je i u netumorskim matičnim stanicama tretiranima VAL kao što su mezenhimske matične stanice pankreasa. Točan mehanizam kojim VAL smanjuje ekspresiju gena jezgre matičnosti nije razjašnjen, iako se vjerojatnim smatra povećanje ekspresije grupe miRNA koje inhibiraju staničnu matičnost (246). Valja napomenuti da neki istraživači upozoravaju da VAL ne uzrokuje smanjenje ekspresije gena jezgre matičnosti u svih tumora te da su potrebna daljnja istraživanja prije značajnije translacije VAL u onkološku praksu (247).

Na proteinskoj razini promatranih diferencijacijskih biljega, VAL je poput TSA značajno smanjio ekspresiju gena *Hnf4α* smanjivši populaciju tumorskih matičnih stanica endodermalne linije, kako je već objašnjeno (239). Međutim, ovaj se učinak kod VAL ne može objasniti epitelno mezenhimalnom tranzicijom budući da VAL upravo drastično smanjuje ekspresiju mezodermalnih matičnih biljega na razini mRNA. Ipak, ove rezultate treba tumačiti s oprezom jer upravo nova istraživanja naglašavaju opasnost korištenja VAL u onkologiji zbog opasnosti od epitelno-mezenhimalne tranzicije (248).

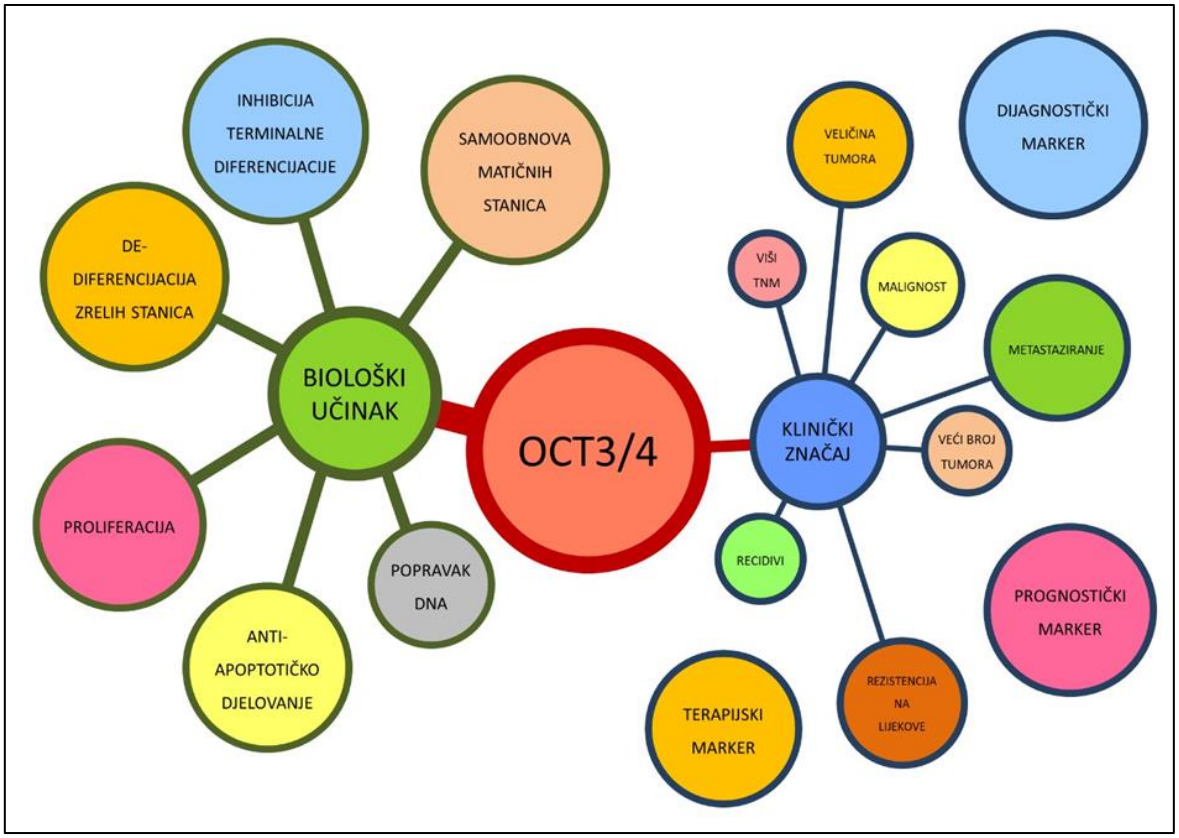
VAL je, za razliku od TSA, izazvao drastičan pad biljega tkivnih matičnih stanica ne samo mezoderma već i neuroektoderma. Premda mehanizam nije razjašnjen, slični učinci VAL već su objavljeni (249).

Što se tiče utjecaja na globalne epigenetičke markere, VAL je inducirao rast globalne acetilacije histona bez promjene globalne metilacije DNA u odnosu na kontrolne tumore. Taj učinak na globalno stanje kromatina opisan je u literaturi, a novija istraživanja upućuje na mogućnost da globalna hiperacetilacija kromatina može izazvati pomak ekspresije specifičnih gena s posljedičnim protutumorskim djelovanjem ili potencijalom (250) kao i kod TSA.

Zaključno, inhibitor deacetilaza histona VAL drastično je smanjio rast TZS *in vitro* primarno podizanjem intenziteta apoptoze, smanjenjem populacije tumorskih matičnih stanica te indukcijom diferencijacijskog pomaka. Utjecaj TSA na proliferaciju, kontroverzan je i zahtjeva daljnja istraživanja kako bi se razjasnili točni mehanizmi protutumorskog djelovanja VAL.

5.4 Utjecaj esi*Oct3/4*-a na rast i razvoj eksperimentalnog tumora zametnih stanica miša *in vitro*

Kako je objašnjeno u uvodu, esiRNA molekule stimuliraju RNAi sustav izazivajući ablaciju ili inhibiciju ekspresije ciljnog gena. Njihova specifičnost ovisi o stupnju komplementarnosti s mRNA te se pažljivim dizajnom sekvence može postići apsolutna ablacija ekspresije jednog jedinog ciljnog gena (89). Sukladno hipotezi onkogene ovisnosti (188), u ovom istraživanju inhibiran je gen *Oct3/4* kojeg se smatra genom jezgre matičnosti i pokretačem onkogeneze TZS u čovjeka. Ekspresija gena *Oct3/4* neophodna je za inicijaciju TZS i progresiju najnediferenciranijih oblika te se stoga koristi upravo u dijagnostičke svrhe, a na temelju čega se određuje terapija i prognoza tijeka bolesti (214). Djelovanje esi*Oct3/4*-a dakle proizlazi iz inhibicije ekspresije gena *Oct3/4* te se očekuju inverzije svih bioloških procesa u koje je *Oct3/4* uključen (Slika 55.).



Slika 55. Biološki učinci ekspresije gena *Oct3/4* i njihov klinički značaj u onkologiji. Pojednostavljeni prikaz u literaturi opisanih bioloških učinaka ekspresije gena *Oct3/4* te njihova iskoristivost u kliničkoj praksi. (Zbirni prikaz prema *Liang i sur., 2018, Wang i sur., 2015, Zeineddine i sur., 2014* i *Shi i sur., 2010*)

Budući da je *Oct3/4* pokretač onkogeneze TZS čovjeka, ne čudi da je upravo esi*Oct3/4* izazvala najsnažniju inhibiciju rasta TZS *in vitro*. Premda su slična istraživanja na TZS rijetka, postoje istraživanja koja opisuju sličan efekt u tumorima općenito (251, 252).

Iako je opisano da *Oct3/4* potiče proliferaciju i inhibira apoptozu tumorskih stanica (253), inhibicijom njegove ekspresije putem esi*Oct3/4* izostala je očekivana inverzija u ovom istraživanju. Naime, esi*Oct3/4* povećao je broj stanica koje eksprimiraju biljege proliferacije te povećao količinu biljega u ukupnom homogenatu proteina. Ovaj efekt nije uobičajen te nismo pronašli istraživanje koje opisuje sličan efekt. Dapače, većina istraživanja naglašava smanjenje intenziteta proliferacije tumorskih stanica izazvanu jatrogenom inhibicijom ekpsresije gena *Oct3/4* te posljedične inhibicije AKT signalnog puta (254). Također je neočekivan pad količine biljega apoptoze u ukupnom homogenatu tumora tretiranima esi*Oct3/4*-om u usporedbi s kontrolom. Naime, supresija *Oct3/4* gena dokazano dovodi do reekspresije proapoptoznih te inhibicije ekspresije antiapoptoznih gena u tumorskim stanicama (255). Ovi kontroverzni rezultati ne umanjuju drastičnost smanjenja rasta tumora izazvanog s esi*Oct3/4*, ali postavljaju nova pitanja vezana za mehanizam djelovanja i kompleksnost biološkog djelovanja gena *Oct3/4* koje je potrebno još razjasniti (256).

Za razliku od učinka na proliferaciju i apoptozu, esi*Oct3/4* očekivano je zaustavio ekspresiju gena *Oct3/4*, ali i ostalih gena jezgre matičnosti *Nanog i Sox2*. Ovi rezultati upućuju na drastično smanjenje populacije matičnih stanica u esi*Oct3/4* tretiranim TZS *in vitro* te potvrđuju važnost ekspresije gena *Oct3/4* u održavanju fukcionalnosti *Oct3/4-Sox2-Nanog* jezgre matičnosti i vijabilnosti tumora kao cjeline (256).

Pored smanjenja populacije matičnih stanica, esi*Oct3/4* potaknuo je i snažan diferencijacijski pomak te smanjenu ekspresiju gotovo svih promatranih biljega tkivnih matičnih stanica. Taj učinak nije neočekivan budući je ekspresija *Oct3/4* ključna za održavanje matičnosti i spriječavanje diferencijacije stanica. Inhibicija ekspresije uvijek dovodi do smanjene matičnosti te snažne diferencijacije stanica (257).

5.5 Utjecaj esi*Nanog* na rast i razvoj eksperimentalnog tumora zametnih stanica miša *in vitro*

Kao što je već opisano, gen *Nanog* jedan je od tri gena jezgre maičnosti te je usko povezan s održavanjem pluripotentnosti matičnih stanica (258). EsiNanog pokreće RNAi mehanizam inhibicije ekspresije gena *Nanog* te se očekuje inverzija svih staničnih procesa koje se nalaze pod njegovom kontrolom s posljedičnim zastojem u rastu tumora te smanjenju malignosti (259). Međutim, u ovom istraživanju, inhibicija ekspresije gena *Nanog* nije izazvala značajno smanjenje rasta tumora očekivano na temelju objavljenih istraživanja (260). Valja napomenuti da krivulja rasta esi*Nanog* tretiranih TZS *in vitro* disocira od krivulje rasta kontrolnih tumora u drugoj polovici promatranog perioda kultiviranja. Premda pad rasta nije statistički značajan, ukazuje na mogućnost da je došlo do blažih oštećenja proliferacije za koje stanice, barem u početku, pokazuju kompenzacijski potencijal. Sukladno blagom učinku na rast tumora, rezultati upućuju da esi*Nanog* nije značajno utjecao ni na proliferacijske niti na apoptozne procese što također nije u skladu s objavljenim istraživanjima (259, 260). Što se diferencijacijskih procesa tiče, esi*Nanogom* tretirani tumori gotovo u potpunosti prate diferencijacijske procese kontrolnih tumora. Međutim, biološka aktivnost dizajnirane esi*Nanog* sekvence potvrđena je rezultatima analize ekspresije gena jezgre matičnosti iz kojih je jasno vidljiv biološki učinak esi*Nanog*-a u smanjenju njihove ekspresije i na proteinskoj i na mRNA razini. U literaturi nismo pronašli sličan opis djelovanja smanjenja ekspresije gena Nanog te su za objašnjenje ovog fenomena potrebna daljnja istraživanja.

5.6 Utjecaj esi*Trrap* na rast i razvoj eksperimentalnog tumora zametnih stanica miša *in vitro*

Protein Trrap dijeli homologiju s PIKK kinazama, ali mu nedostaje svojstvena aktivnost. Trrap promiče acetilaciju histona i reorganizaciju kromatina regulirajući ekspresiju gena u embriogenezi i kancerogenezi (261). Međutim, rezultati ovog istraživanja pokazuju da inhibicija ekspresije gena *Trrap* ne utječe značajno na inhibiciju rasta TZS *in vitro*. Premda nismo pronašli slično istraživanje, ekspresija gena *Trrap* povezuje se upravo s poticanjem rasta tumora i agresivnošću posebice ovarija i dojke (261, 262). Ipak valja napomenuti da krivulja rasta tumora dobivenih iz zametaka tretiranih esi*Trrap* u prvoj polovici promatranog perioda kultiviranja u potpunosti se preklapa s krivuljama inhibiranog rasta TSA i VAL tretmanom zametka. Međutim,

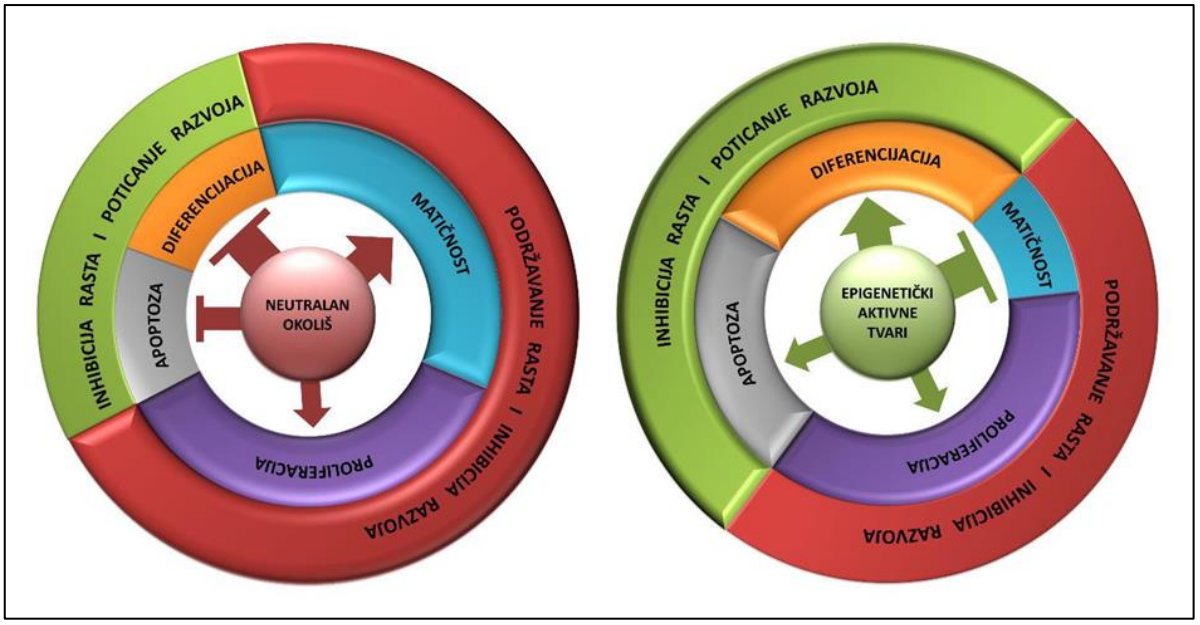
u drugoj polovici promatranog perioda kultiviranja, rast tumora dobivenih iz esi*Trrap* tretiranih zametaka značajno se povećava primičući se krivulji rasta tretiranih s esi*Nanog*. Time utjecaj esi*Trrap* na ukupan rast tumora postaje beznačajan. Navedeno može upućivati na uistinu inhibicijski učinak esi*Trrap* odmah po tretmanu, ali da inhibicijski učinak s vremenom slabi te da tretirani tumor ima sposobnost naknadnog potpunog oporavka. I uistinu, na kraju perioda kultiviranja nema razlike u proliferacijskoj i apoptoznoj aktivnosti tumora tretiranih s esi*Trrap* u odnosu na kontrolu, iako literatura navodi upravo suprotni očekivani učinak (261). Neovisno o utjecaju na proliferaciju i apoptozu, esi*Trrap* smanjio je populaciju matičnih stanica odnosno ekspresiju gena svih gena jezgre matičnosti, efekt opisan u literaturi iako točan mehanizam još nije razjašnjen (261, 263). U spomenutim istraživanjima, upravo pad ekspresije esi*Trrap* izaziva reorganizaciju kromatina s povezanom inhibicijom ekspresija gena matičnosti i početkom ekspresije diferencijacijskih gena (263). I uistinu, esi*Trrap* izazvao je diferencijacijske pomake, ali očito nedovoljno za ukupno smanjenje TZS *in vitro*.

6 ZAKLJUČAK

Epigenetički aktivne molekule koje su djelovale na zametak iznimno su snažni inhibitori rasta eksperimentalnog TZS *in vitro* posebice 5azaC, VAL, TSA i esi*Oct3/4*. Ipak, oni potiču proliferacijsku aktivnost stanica u eksperimentalnom TZS *in vitro* što se može tumačiti kao kompenzacijski odgovor stanica na propadanje tkiva i zaostajanje u rastu tumora. Pojedine epigenetički aktivne tvari poput 5azaC, VAL i TSA potiču apoptoznu aktivnost u eksperimentalnom TZS *in vitro*, dok stimulacija RNAi sustava, čini se, smanjuje intenzitet apoptoze.

Epigenetički aktivne tvari snažno smanjuju maligni potencijal TZS *in vitro* odnosno populaciju tumorskih matičnih stanica smanjujući ekspresiju gena matičnosti posebice 5azaC i esi*Oct3/4* koji imaju sposobnost u potpunosti inhibirati ekspresiju gena matičnosti *Oct3/4, Nanog* i *Sox2* na razini mRNA i proteina. Pored navedenog, imaju znatan učinak na diferencijacijsku aktivnost u TZS *in vitro* mijenjajući obrazac ekspresije diferencijacijskih gena. Ipak, epigenetičke tvari ne pokazuju jedinstven obrazac već induciraju uspostavu različitih diferencijacijskih obrazaca.

Sukladno rezultatima ovog istraživanja može se zaključiti da epigenetičke tvari koje djeluju na zametak kao izvor tumora imaju generalno snažan inhibicijski učinak na ukupan rast i maligni potencijal tumora uz poticanje pozitivnog razvoja tkiva primarno djelujući na osovine proliferacija-apoptoza te matičnost-diferencijacija, mijenjajući gensku ekspresiju na razini mRNA, a posljedično i proteina, bez znatnog zadiranja u status globalne metilacije DNA i acetilacije histona, odnosno epigenetički status cjelokupnog kromatina (Slika 54.).



Slika 54. Pojednostavljeni prikaz rasta i razvoja tumora zametnih stanica *in vitro*. Snažan rast i visoki maligni potencijal odnosno nerazvijenost TZS *in vitro* u nemodificiranom neutralnom okolišu posljedica je podržavanja snažne proliferacijske aktivnosti i održavanja populacije tumorskih matičnih stanica uz blagu apoptotsku aktivnost te tek početne diferencijacijske procese. Epigenetički aktivne tvari djelujući na zametak, snažno potiču diferencijaciju stanica uz drastično smanjenje populacije tumorskih matičnih stanica te lagani porast apoptozne aktivnosti. Stoga, usprkos održanoj proliferaciji stanica, epigenetički aktivnim molekulama obogaćeni okoliš snažno inhibira rast tumora uz drastičan pomak prema razvijenom diferenciranom tkivu smanjenog malignog potencijala.

7 LITERATURA

1. Sincic N, Kulis T, Znaor A, Bray F. Time trends in testicular cancer in Croatia 1983-2007: rapid increases in incidence, no declines in mortality. Cancer Epidemiol. 2012;36(1):11-5.
2. 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.
3. Malavalli G, Karra S, Muniyappa B. Teratocarcinoma in a non seminomatous, mixed germ cell tumour of the testis-a rare entity. J Clin Diagn Res. 2013;7(7):1439-40.
4. Díez-Torre A, Silván U, Díaz-Núñez M, Aréchaga J. The role of microenvironment in testicular germ cell tumors. Cancer Biol Ther. 2010;10(6):529-36.
5. Skreb N, Crnek V. Development of embryo-derived teratomas in vitro. Results Probl Cell Differ. 1980;11:283-9.
6. Garner MJ, Turner MC, Ghadirian P, Krewski D. Epidemiology of testicular cancer: an overview. Int J Cancer. 2005;116(3):331-9.
7. Sinčić N, Herceg Z. DNA methylation and cancer: ghosts and angels above the genes. Curr Opin Oncol. 2011;23(1):69-76.
8. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. Cell. 2012;150(1):12-27.
9. Reik W, Santos F, Dean W. Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. Theriogenology. 2003;59(1):21-32.
10. Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. Nature. 1999;402(6758):187-91.
11. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. J Pathol. 2002;196(1):1-7.
12. Müller AM, Florek M. 5-Azacytidine/5-Azacitidine. Recent Results Cancer Res. 2014;201:299-324.
13. Mack GS. Epigenetic cancer therapy makes headway. J Natl Cancer Inst. 2006;98(20):1443-4.
14. Brownell JE, Allis CD. Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. Curr Opin Genet Dev. 1996;6(2):176-84.
15. Herceg Z, Vaissière T. Epigenetic mechanisms and cancer: an interface between the environment and the genome. Epigenetics. 2011;6(7):804-19.

16. Li J, Jin H, Wang X. Epigenetic biomarkers: potential applications in gastrointestinal cancers. ISRN Gastroenterol. 2014;2014:464015.
17. Taddei A, Roche D, Bickmore WA, Almouzni G. The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: implications for anticancer therapy? EMBO Rep. 2005;6(6):520-4.
18. Larsson C. Epigenetic aspects on therapy development for gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. Neuroendocrinology. 2013;97(1):19-25.
19. Shankar S, Srivastava RK. Histone deacetylase inhibitors: mechanisms and clinical significance in cancer: HDAC inhibitor-induced apoptosis. Adv Exp Med Biol. 2008;615:261-98.
20. Iwahashi S, Shimada M, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, et al. Histone deacetylase inhibitor enhances the anti-tumor effect of gemcitabine: a special reference to gene-expression microarray analysis. Oncol Rep. 2011;26(5):1057-62.
21. Slingerland M, Guchelaar HJ, Gelderblom H. Histone deacetylase inhibitors: an overview of the clinical studies in solid tumors. Anticancer Drugs. 2014;25(2):140-9.
22. Uchino K, Ochiya T, Takeshita F. RNAi therapeutics and applications of microRNAs in cancer treatment. Jpn J Clin Oncol. 2013;43(6):596-607.
23. Gomes AQ, Nolasco S, Soares H. Non-coding RNAs: multi-tasking molecules in the cell. Int J Mol Sci. 2013;14(8):16010-39.
24. Surendranath V, Theis M, Habermann BH, Buchholz F. Designing efficient and specific endoribonuclease-prepared siRNAs. Methods Mol Biol. 2013;942:193-204.
25. Wang X, Yang S, Zhao X, Guo H, Ling X, Wang L, et al. OCT3 and SOX2 promote the transformation of Barrett's esophagus to adenocarcinoma by regulating the formation of tumor stem cells. Oncol Rep. 2014;31(4):1745-53.
26. Bogusławska J, Małecki M. siRNA preparations in gene therapy of melanoma. Med Wieku Rozwoj. 2013;17(3):196-201.
27. Cavalie G, Bellier A, Marnas G, Boisson B, Robert Y, Rabattu PY, et al. Anatomy and histology of the scrotal ligament in adults: inconsistency and variability of the gubernaculum testis. Surg Radiol Anat. 2017.
28. Sharpe RM. Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. Toxicol Lett. 2001;120(1-3):221-32.
29. Borg CL, Wolski KM, Gibbs GM, O'Bryan MK. Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a 'non-performer'. Hum Reprod Update. 2010;16(2):205-24.

30. Gnessi L, Fabbri A, Spera G. Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. Endocr Rev. 1997;18(4):541-609.
31. Cheng YH, Wong EW, Cheng CY. Cancer/testis (CT) antigens, carcinogenesis and spermatogenesis. Spermatogenesis. 2011;1(3):209-20.
32. Trabert B, Chen J, Devesa SS, Bray F, McGlynn KA. International patterns and trends in testicular cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1973-2007. Andrology. 2015;3(1):4-12.
33. Elzinga-Tinke JE, Dohle GR, Looijenga LH. Etiology and early pathogenesis of malignant testicular germ cell tumors: towards possibilities for preinvasive diagnosis. Asian J Androl. 2015;17(3):381-93.
34. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Bray F. International testicular cancer incidence trends: generational transitions in 38 countries 1900-1990. Cancer Causes Control. 2015;26(1):151-8.
35. Holmes L, Escalante C, Garrison O, Foldi BX, Ogungbade GO, Essien EJ, et al. Testicular cancer incidence trends in the USA (1975-2004): plateau or shifting racial paradigm? Public Health. 2008;122(9):862-72.
36. 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.
37. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Jemal A, Bray F. International variations and trends in testicular cancer incidence and mortality. Eur Urol. 2014;65(6):1095-106.
38. 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.
39. Ondrusova M, Balogova S, Lehotska V, Kajo K, Mrinakova B, Ondrus D. Controversies in the management of clinical stage I testicular seminoma. Cent European J Urol. 2016;69(1):35-9.
40. Dearnaley D, Huddart R, Horwich A. Regular review: Managing testicular cancer. BMJ. 2001;322(7302):1583-8.
41. Damjanov I, Andrews PW. The terminology of teratocarcinomas and teratomas. Nat Biotechnol. 2007;25(11):1212; discussion

42. Korde LA, Premkumar A, Mueller C, Rosenberg P, Soho C, Bratslavsky G, et al. Increased prevalence of testicular microlithiasis in men with familial testicular cancer and their relatives. Br J Cancer. 2008;99(10):1748-53.
43. Rashid HH, Cos LR, Weinberg E, Messing EM. Testicular microlithiasis: a review and its association with testicular cancer. Urol Oncol. 2004;22(4):285-9.
44. Henderson BE, Benton B, Jing J, Yu MC, Pike MC. Risk factors for cancer of the testis in young men. Int J Cancer. 1979;23(5):598-602.
45. Hemminki K, Li X. Familial risk in testicular cancer as a clue to a heritable and environmental aetiology. Br J Cancer. 2004;90(9):1765-70.
46. Dong C, Hemminki K. Modification of cancer risks in offspring by sibling and parental cancers from 2,112,616 nuclear families. Int J Cancer. 2001;92(1):144-50.
47. Donovan PJ. The germ cell--the mother of all stem cells. Int J Dev Biol. 1998;42(7):1043-50.
48. McLaren A. Primordial germ cells in the mouse. Dev Biol. 2003;262(1):1-15.
49. Donovan PJ. Growth factor regulation of mouse primordial germ cell development. Curr Top Dev Biol. 1994;29:189-225.
50. Godin I, Deed R, Cooke J, Zsebo K, Dexter M, Wylie CC. Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture. Nature. 1991;352(6338):807-9.
51. Wylie CC. The biology of primordial germ cells. Eur Urol. 1993;23(1):62-6; discussion 7.
52. Runyan C, Schaible K, Molyneaux K, Wang Z, Levin L, Wylie C. Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. Development. 2006;133(24):4861-9.
53. Polanco JC, Koopman P. Sry and the hesitant beginnings of male development. Dev Biol. 2007;302(1):13-24.
54. Gaskell TL, Esnal A, Robinson LL, Anderson RA, Saunders PT. Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations. Biol Reprod. 2004;71(6):2012-21.
55. Gashaw I, Dushaj O, Behr R, Biermann K, Brehm R, Rübben H, et al. Novel germ cell markers characterize testicular seminoma and fetal testis. Mol Hum Reprod. 2007;13(10):721-7.
56. Wong CC, Gaspar-Maia A, Ramalho-Santos M, Reijo Pera RA. High-efficiency stem cell fusion-mediated assay reveals Sall4 as an enhancer of reprogramming. PLoS One. 2008;3(4):e1955.
57. Cao D, Li J, Guo CC, Allan RW, Humphrey PA. SALL4 is a novel diagnostic marker for testicular germ cell tumors. Am J Surg Pathol. 2009;33(7):1065-77.

58. Bosl GJ, Motzer RJ. Testicular germ-cell cancer. N Engl J Med. 1997;337(4):242-53.
59. Depue RH, Pike MC, Henderson BE. Estrogen exposure during gestation and risk of testicular cancer. J Natl Cancer Inst. 1983;71(6):1151-5.
60. Swerdlow AJ, Huttly SR, Smith PG. Prenatal and familial associations of testicular cancer. Br J Cancer. 1987;55(5):571-7.
61. Smith-Sørensen B, Lind GE, Skotheim RI, Fosså SD, Fodstad Ø, Stenwig AE, et al. Frequent promoter hypermethylation of the O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) gene in testicular cancer. Oncogene. 2002;21(57):8878-84.
62. Gilbert D, Rapley E, Shipley J. Testicular germ cell tumours: predisposition genes and the male germ cell niche. Nat Rev Cancer. 2011;11(4):278-88.
63. Looijenga LH, de Leeuw H, van Oorschot M, van Gurp RJ, Stoop H, Gillis AJ, et al. Stem cell factor receptor (c-KIT) codon 816 mutations predict development of bilateral testicular germ-cell tumors. Cancer Res. 2003;63(22):7674-8.
64. Besmer P, Murphy JE, George PC, Qiu FH, Bergold PJ, Lederman L, et al. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. Nature. 1986;320(6061):415-21.
65. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. EMBO J. 1987;6(11):3341-51.
66. Flanagan JG, Chan DC, Leder P. Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant. Cell. 1991;64(5):1025-35.
67. Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Expression of the c-kit protein product in carcinoma-in-situ and invasive testicular germ cell tumours. Int J Androl. 1994;17(2):85-92.
68. Kemmer K, Corless CL, Fletcher JA, McGreevey L, Haley A, Griffith D, et al. KIT mutations are common in testicular seminomas. Am J Pathol. 2004;164(1):305-13.
69. Swiatecka G, Sielski S, Wilczek R, Jackowiak D, Kubica J, Raczak G. Atrioventricular conduction disturbances in patients with sinoatrial node disease and atrial pacing. Pacing Clin Electrophysiol. 1992;15(11 Pt 2):2074-6.
70. McGlynn KA, Devesa SS, Graubard BI, Castle PE. Increasing incidence of testicular germ cell tumors among black men in the United States. J Clin Oncol. 2005;23(24):5757-61.
71. Gajendran VK, Nguyen M, Ellison LM. Testicular cancer patterns in African-American men. Urology. 2005;66(3):602-5.

72. Turnbull C, Rahman N. Genome-wide association studies provide new insights into the genetic basis of testicular germ-cell tumour. Int J Androl. 2011;34(4 Pt 2):e86-96; discussion e-7.
73. Brokken LJ, Lundberg-Giwercman Y, Rajpert De-Meyts E, Eberhard J, Ståhl O, Cohn-Cedermark G, et al. Association of polymorphisms in genes encoding hormone receptors ESR1, ESR2 and LHCGR with the risk and clinical features of testicular germ cell cancer. Mol Cell Endocrinol. 2012;351(2):279-85.
74. Romerius P, Giwercman A, Moëll C, Relander T, Cavallin-Ståhl E, Wiebe T, et al. Estrogen receptor α single nucleotide polymorphism modifies the risk of azoospermia in childhood cancer survivors. Pharmacogenet Genomics. 2011;21(5):263-9.
75. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. Nat Rev Cancer. 2007;7(8):573-84.
76. Raghavan D. Testicular cancer: maintaining the high cure rate. Oncology (Williston Park). 2003;17(2):218-28; discussion 28-9, 34-5, passim.
77. Romano FJ, Rossetti S, Conteduca V, Schepisi G, Cavaliere C, Di Franco R, et al. Role of DNA repair machinery and p53 in the testicular germ cell cancer: a review. Oncotarget. 2016;7(51):85641-9.
78. Deans C, Maggert KA. What do you mean, "epigenetic"? Genetics. 2015;199(4):887-96.
79. Arand J, Spieler D, Karius T, Branco MR, Meilinger D, Meissner A, et al. In vivo control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases. PLoS Genet. 2012;8(6):e1002750.
80. Suzuki H, Yamamoto E, Maruyama R, Niinuma T, Kai M. Biological significance of the CpG island methylator phenotype. Biochem Biophys Res Commun. 2014;455(1-2):35-42.
81. Li L, Choi JY, Lee KM, 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.
82. Hammoud SS, Cairns BR, Jones DA. Epigenetic regulation of colon cancer and intestinal stem cells. Curr Opin Cell Biol. 2013;25(2):177-83.
83. Barnes CE, English DM, Cowley SM. Acetylation & Co: an expanding repertoire of histone acylations regulates chromatin and transcription. Essays Biochem. 2019;63(1):97-107.
84. Huang C, Wen B. "Identification Card": Sites on Histone Modification of Cancer Cell. Chin Med Sci J. 2015;30(4):203-9.
85. Murnyák B, Bognár L, Klekner Á, Hortobágyi T. Epigenetics of Meningiomas. Biomed Res Int. 2015;2015:532451.
86. Sawan C, Herceg Z. Histone modifications and cancer. Adv Genet. 2010;70:57-85.

87. Hałasa M, Wawruszak A, Przybyszewska A, Jaruga A, Guz M, Kałafut J, et al. H3K18Ac as a Marker of Cancer Progression and Potential Target of Anti-Cancer Therapy. Cells. 2019;8(5).
88. Zhao QY, Lei PJ, Zhang X, Zheng JY, Wang HY, Zhao J, et al. Global histone modification profiling reveals the epigenomic dynamics during malignant transformation in a four-stage breast cancer model. Clin Epigenetics. 2016;8:34.
89. Crotty S, Pipkin ME. In vivo RNAi screens: concepts and applications. Trends Immunol. 2015;36(5):315-22.
90. Rao DD, Wang Z, Senzer N, Nemunaitis J. RNA interference and personalized cancer therapy. Discov Med. 2013;15(81):101-10.
91. Guo M, Yan W. Epigenetics of gastric cancer. Methods Mol Biol. 2015;1238:783-99.
92. Wang W, Luo YP. MicroRNAs in breast cancer: oncogene and tumor suppressors with clinical potential. J Zhejiang Univ Sci B. 2015;16(1):18-31.
93. He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. Science. 2011;333(6047):1303-7.
94. Hajkova P, Jeffries SJ, Lee C, Miller N, Jackson SP, Surani MA. Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway. Science. 2010;329(5987):78-82.
95. Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. Science. 2011;333(6047):1300-3.
96. Morgan HD, Dean W, Coker HA, Reik W, Petersen-Mahrt SK. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. J Biol Chem. 2004;279(50):52353-60.
97. Kristensen DG, Nielsen JE, Jørgensen A, Skakkebæk NE, Rajpert-De Meyts E, Almstrup K. Evidence that active demethylation mechanisms maintain the genome of carcinoma in situ cells hypomethylated in the adult testis. Br J Cancer. 2014;110(3):668-78.
98. Dobrovic A, Kristensen LS. DNA methylation, epimutations and cancer predisposition. Int J Biochem Cell Biol. 2009;41(1):34-9.
99. Mirabello L, Savage SA, Korde L, Gadalla SM, Greene MH. LINE-1 methylation is inherited in familial testicular cancer kindreds. BMC Med Genet. 2010;11:77.

100. Nielsen H, Nielsen M, Skakkebaek NE. The fine structure of possible carcinoma-in-situ in the seminiferous tubules in the testis of four infertile men. Acta Pathol Microbiol Scand A. 1974;82(2):235-48.
101. 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.
102. Almstrup K, Nielsen JE, Mlynarska O, Jansen MT, Jørgensen A, Skakkebæk NE, et al. Carcinoma in situ testis displays permissive chromatin modifications similar to immature foetal germ cells. Br J Cancer. 2010;103(8):1269-76.
103. Manivel JC, Jessurun J, Wick MR, Dehner LP. Placental alkaline phosphatase immunoreactivity in testicular germ-cell neoplasms. Am J Surg Pathol. 1987;11(1):21-9.
104. 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. 2012;106(2):414-23.
105. Wermann H, Stoop H, Gillis AJ, Honecker F, van Gurp RJ, Ammerpohl O, et al. Global DNA methylation in fetal human germ cells and germ cell tumours: association with differentiation and cisplatin resistance. J Pathol. 2010;221(4):433-42.
106. Smiraglia DJ, Szymanska J, Kraggerud SM, Lothe RA, Peltomäki P, Plass C. Distinct epigenetic phenotypes in seminomatous and nonseminomatous testicular germ cell tumors. Oncogene. 2002;21(24):3909-16.
107. Cheung HH, Davis AJ, Lee TL, Pang AL, Nagrani S, Rennert OM, et al. Methylation of an intronic region regulates miR-199a in testicular tumor malignancy. Oncogene. 2011;30(31):3404-15.
108. Chen BF, Gu S, Suen YK, Li L, Chan WY. microRNA-199a-3p, DNMT3A, and aberrant DNA methylation in testicular cancer. Epigenetics. 2014;9(1):119-28.
109. Mirabello L, Kratz CP, Savage SA, Greene MH. Promoter methylation of candidate genes associated with familial testicular cancer. Int J Mol Epidemiol Genet. 2012;3(3):213-27.
110. Mühlhauser J, Crescimanno C, Kasper M, Zaccheo D, Castellucci M. Differentiation of human trophoblast populations involves alterations in cytokeratin patterns. J Histochem Cytochem. 1995;43(6):579-89.
111. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. Cell. 2003;113(5):643-55.

112. Hart AH, Hartley L, Parker K, Ibrahim M, Looijenga LH, Pauchnik M, et al. The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors. Cancer. 2005;104(10):2092-8.
113. Nettersheim D, Biermann K, Gillis AJ, Steger K, Looijenga LH, Schorle H. NANOG promoter methylation and expression correlation during normal and malignant human germ cell development. Epigenetics. 2011;6(1):114-22.
114. Ferreira HJ, Heyn H, Garcia del Muro X, 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.
115. Hotaling JM, Walsh TJ. Male infertility: a risk factor for testicular cancer. Nat Rev Urol. 2009;6(10):550-6.
116. Peng X, Zeng X, Peng S, Deng D, Zhang J. The association risk of male subfertility and testicular cancer: a systematic review. PLoS One. 2009;4(5):e5591.
117. Peltomäki P. DNA methylation changes in human testicular cancer. Biochim Biophys Acta. 1991;1096(3):187-96.
118. Looijenga LH, Gillis AJ, van Gurp RJ, Verkerk AJ, Oosterhuis JW. X inactivation in human testicular tumors. XIST expression and androgen receptor methylation status. Am J Pathol. 1997;151(2):581-90.
119. Okada K, Katagiri T, Tsunoda T, Mizutani Y, Suzuki Y, Kamada M, et al. Analysis of gene-expression profiles in testicular seminomas using a genome-wide cDNA microarray. Int J Oncol. 2003;23(6):1615-35.
120. Baylin SB, Chen WY. Aberrant gene silencing in tumor progression: implications for control of cancer. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2005;70:427-33.
121. Jüttermann R, Li E, Jaenisch R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(25):11797-801.
122. Palii SS, Van Emburgh BO, Sankpal UT, Brown KD, Robertson KD. DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B. Mol Cell Biol. 2008;28(2):752-71.
123. Pfeifer GP, Yoon JH, Liu L, Tommasi S, Wilczynski SP, Dammann R. Methylation of the RASSF1A gene in human cancers. Biol Chem. 2002;383(6):907-14.

124. Chen WY, Zeng X, Carter MG, Morrell CN, Chiu Yen RW, Esteller M, et al. Heterozygous disruption of Hic1 predisposes mice to a gender-dependent spectrum of malignant tumors. Nat Genet. 2003;33(2):197-202.
125. 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. 2004;3:16.
126. Wongtrakoongate P. Epigenetic therapy of cancer stem and progenitor cells by targeting DNA methylation machineries. World J Stem Cells. 2015;7(1):137-48.
127. Sonnenburg D, Spinella MJ, Albany C. Epigenetic Targeting of Platinum Resistant Testicular Cancer. Curr Cancer Drug Targets. 2016;16(9):789-95.
128. Kaminskas E, Farrell AT, Wang YC, Sridhara R, Pazdur R. FDA drug approval summary: azacitidine (5-azacytidine, Vidaza) for injectable suspension. Oncologist. 2005;10(3):176-82.
129. Edlin R, Connock M, Tubeuf S, Round J, Fry-Smith A, Hyde C, et al. Azacitidine for the treatment of myelodysplastic syndrome, chronic myelomonocytic leukaemia and acute myeloid leukaemia. Health Technol Assess. 2010;14 Suppl 1:69-74.
130. Shapiro RM, Lazo-Langner A. Systematic review of azacitidine regimens in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. BMC Hematol. 2018;18:3.
131. Dombret H, Itzykson R. How and when to decide between epigenetic therapy and chemotherapy in patients with AML. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2017;2017(1):45-53.
132. Lauschke VM, Barragan I, Ingelman-Sundberg M. Pharmacoepigenetics and Toxicoepigenetics: Novel Mechanistic Insights and Therapeutic Opportunities. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2018;58:161-85.
133. Majchrzak-Celińska A, Baer-Dubowska W. Pharmacoepigenetics: an element of personalized therapy? Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2017;13(4):387-98.
134. Kelly AD, Issa JJ. The promise of epigenetic therapy: reprogramming the cancer epigenome. Curr Opin Genet Dev. 2017;42:68-77.
135. Shastry BS. Pharmacogenomics and pharmacoepigenomics in pediatric medicine. Methods Mol Biol. 2014;1175:671-85.
136. Serman A, Vlahović M, Serman L, Bulić-Jakus F. DNA methylation as a regulatory mechanism for gene expression in mammals. Coll Antropol. 2006;30(3):665-71.
137. Bulic-Jakuš F, Vlahovic M, Juric-Lekic G, Crnek-Kunstelj V, Šerman D. Gastrulating Rat Embryo in a Serum-free Culture Model: Changes of Development Caused by Teratogen 5-Azacytidine. Altern Lab Anim. 1999;27(6):925-33.

138. Burchenal JH, Carter SK. New cancer chemotherapeutic agents. Cancer. 1972;30(6):1639-46.
139. Raj K, Mufti GJ. Azacytidine (Vidaza(R)) in the treatment of myelodysplastic syndromes. Ther Clin Risk Manag. 2006;2(4):377-88.
140. Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. Cell. 1980;20(1):85-93.
141. Stresemann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. Int J Cancer. 2008;123(1):8-13.
142. Jones PA, Taylor SM, Wilson VL. Inhibition of DNA methylation by 5-azacytidine. Recent Results Cancer Res. 1983;84:202-11.
143. Hosokawa M, Tanaka S, Ueda K, Iwakawa S. Different Schedule-Dependent Effects of Epigenetic Modifiers on Cytotoxicity by Anticancer Drugs in Colorectal Cancer Cells. Biol Pharm Bull. 2017;40(12):2199-204.
144. Glover AB, Leyland-Jones B. Biochemistry of azacitidine: a review. Cancer Treat Rep. 1987;71(10):959-64.
145. Zadrazil S, Fucík V, Bartl P, Sormová Z, Sorm F. The structure of DNA from Escherichia coli cultured in the presence of 5-azacytidine. Biochim Biophys Acta. 1965;108(4):701-3.
146. Santi DV, Norment A, Garrett CE. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984;81(22):6993-7.
147. Komashko VM, Farnham PJ. 5-azacytidine treatment reorganizes genomic histone modification patterns. Epigenetics. 2010;5(3):229-40.
148. Takebayashi S, Nakao M, Fujita N, Sado T, Tanaka M, Taguchi H, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine induces histone hyperacetylation of mouse centromeric heterochromatin by a mechanism independent of DNA demethylation. Biochem Biophys Res Commun. 2001;288(4):921-6.
149. Manzoni EF, Pennarossa G, deEguileor M, Tettamanti G, Gandolfi F, Brevini TA. 5-azacytidine affects TET2 and histone transcription and reshapes morphology of human skin fibroblasts. Sci Rep. 2016;6:37017.
150. Pazin MJ, Kadonaga JT. What's up and down with histone deacetylation and transcription? Cell. 1997;89(3):325-8.
151. Corominas-Faja B, Cuyàs E, Lozano-Sánchez J, Cufí S, Verdura S, Fernández-Arroyo S, et al. Extra-virgin olive oil contains a metabolo-epigenetic inhibitor of cancer stem cells. Carcinogenesis. 2018.

152. Lin JR, Wen J, Zhang H, Wang L, Gou FF, Yang M, et al. Interleukin-17 promotes the production of underglycosylated IgA1 in DAKIKI cells. Ren Fail. 2018;40(1):60-7.
153. Turner TB, Meza-Perez S, Londoño A, Katre A, Peabody JE, Smith HJ, et al. Epigenetic modifiers upregulate MHC II and impede ovarian cancer tumor growth. Oncotarget. 2017;8(27):44159-70.
154. Konieczny SF, Emerson CP. 5-Azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells: evidence for regulatory genes controlling determination. Cell. 1984;38(3):791-800.
155. Montesano A, Luzi L, Senesi P, Terruzzi I. Modulation of cell cycle progression by 5-azacytidine is associated with early myogenesis induction in murine myoblasts. Int J Biol Sci. 2013;9(4):391-402.
156. Kaur K, Yang J, Eisenberg CA, Eisenberg LM. 5-azacytidine promotes the transdifferentiation of cardiac cells to skeletal myocytes. Cell Reprogram. 2014;16(5):324-30.
157. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. J Clin Invest. 1999;103(5):697-705.
158. Mundre RS, Koka P, Dhanaraj P, Khatri N, Vig S, Chandramohan Y, et al. Synergistic role of 5-azacytidine and ascorbic acid in directing cardiosphere derived cells to cardiomyocytes in vitro by downregulating Wnt signaling pathway via phosphorylation of β-catenin. PLoS One. 2017;12(11):e0188805.
159. Vlahović M, Bulić-Jakus F, Jurić-Lekić G, Serman L, Sincić N, Katusić A. Epigenetic deregulation through DNA demethylation seems not to interfere with the differentiation of epithelia from pre-gastrulating rat embryos in vitro. Acta Dermatovenerol Croat. 2008;16(4):183-9.
160. Yan X, Ehnert S, Culmes M, Bachmann A, Seeliger C, Schyschka L, et al. 5-azacytidine improves the osteogenic differentiation potential of aged human adipose-derived mesenchymal stem cells by DNA demethylation. PLoS One. 2014;9(6):e90846.
161. Huber LC, Distler JH, Moritz F, Hemmatazad H, Hauser T, Michel BA, et al. Trichostatin A prevents the accumulation of extracellular matrix in a mouse model of bleomycin-induced skin fibrosis. Arthritis Rheum. 2007;56(8):2755-64.
162. Misaki K, Morinobu A, Saegusa J, Kasagi S, Fujita M, Miyamoto Y, et al. Histone deacetylase inhibition alters dendritic cells to assume a tolerogenic phenotype and ameliorates arthritis in SKG mice. Arthritis Res Ther. 2011;13(3):R77.

163. Santini V, Gozzini A, Ferrari G. Histone deacetylase inhibitors: molecular and biological activity as a premise to clinical application. Curr Drug Metab. 2007;8(4):383-93.
164. Kularatne RN, Washington KE, Bulumulla C, Calubaquib EL, Biewer MC, Oupicky D, et al. Histone Deacetylase Inhibitor (HDACi) Conjugated Polycaprolactone for Combination Cancer Therapy. Biomacromolecules. 2018;19(3):1082-9.
165. Chen WP, Bao JP, Hu PF, Feng J, Wu LD. Alleviation of osteoarthritis by Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, in experimental osteoarthritis. Mol Biol Rep. 2010;37(8):3967-72.
166. Ding D, Chen LL, Zhai YZ, Hou CJ, Tao LL, Lu SH, et al. Trichostatin A inhibits the activation of Hepatic stellate cells by Increasing C/EBP-α Acetylation in vivo and in vitro. Sci Rep. 2018;8(1):4395.
167. Niki T, Rombouts K, De Bleser P, De Smet K, Rogiers V, Schuppan D, et al. A histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, suppresses myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells in primary culture. Hepatology. 1999;29(3):858-67.
168. Dalla Pozza E, Manfredi M, Brandi J, Buzzi A, Conte E, Pacchiana R, et al. Trichostatin A alters cytoskeleton and energy metabolism of pancreatic adenocarcinoma cells: An in depth proteomic study. J Cell Biochem. 2018;119(3):2696-707.
169. Wächter S, Damanakis AI, Elxnat M, Roth S, Wunderlich A, Verburg FA, et al. Epigenetic Modifications in Thyroid Cancer Cells Restore NIS and Radio-Iodine Uptake and Promote Cell Death. J Clin Med. 2018;7(4).
170. Cai MH, Xu XG, Yan SL, Sun Z, Ying Y, Wang BK, et al. Depletion of HDAC1, 7 and 8 by Histone Deacetylase Inhibition Confers Elimination of Pancreatic Cancer Stem Cells in Combination with Gemcitabine. Sci Rep. 2018;8(1):1621.
171. Lam YM, Chan YF, Chan LC, Ng RK. Histone deacetylase inhibitors induce leukemia gene expression in cord blood hematopoietic stem cells expanded ex vivo. Int J Hematol. 2017;105(1):37-43.
172. Henry TR. The history of valproate in clinical neuroscience. Psychopharmacol Bull. 2003;37 Suppl 2:5-16.
173. Haddad PM, Das A, Ashfaq M, Wieck A. A review of valproate in psychiatric practice. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2009;5(5):539-51.
174. Ge Y, Xu B, Zhu S, Li C, He Q, Zhu T, et al. Severe Acute Valproic Acid Intoxication Successfully Treated with Liver Support Therapy. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2017;121(4):368-70.

175. Fountoulakis KN, Gonda X, Samara M, Siapera M, Karavelas V, Ristic DI, et al. Antiepileptic drugs and suicidality. J Psychopharmacol. 2012;26(11):1401-7.
176. Blaheta RA, Nau H, Michaelis M, Cinatl J. Valproate and valproate-analogues: potent tools to fight against cancer. Curr Med Chem. 2002;9(15):1417-33.
177. Dueñas-Gonzalez A, Coronel J, Cetina L, González-Fierro A, Chavez-Blanco A, Taja-Chayeb L. Hydralazine-valproate: a repositioned drug combination for the epigenetic therapy of cancer. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2014;10(10):1433-44.
178. Sharma RP. Schizophrenia, epigenetics and ligand-activated nuclear receptors: a framework for chromatin therapeutics. Schizophr Res. 2005;72(2-3):79-90.
179. Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. J Biol Chem. 2001;276(39):36734-41.
180. Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. EMBO J. 2001;20(24):6969-78.
181. Ideta-Otsuka M, Igarashi K, Narita M, Hirabayashi Y. Epigenetic toxicity of environmental chemicals upon exposure during development - Bisphenol A and valproic acid may have epigenetic effects. Food Chem Toxicol. 2017;109(Pt 1):812-6.
182. Marks PA. The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs. Expert Opin Investig Drugs. 2010;19(9):1049-66.
183. Ma XJ, Wang YS, Gu WP, Zhao X. The role and possible molecular mechanism of valproic acid in the growth of MCF-7 breast cancer cells. Croat Med J. 2017;58(5):349-57.
184. Yan HC, Zhang J. Effects of sodium valproate on the growth of human ovarian cancer cell line HO8910. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13(12):6429-33.
185. Romain B, Benbrika-Nehmar R, Marisa L, Legrain M, Lobstein V, Oravecz A, et al. Histone hypoacetylation contributes to CXCL12 downregulation in colon cancer: impact on tumor growth and cell migration. Oncotarget. 2017;8(24):38351-66.
186. Unniyampurath U, Pilankatta R, Krishnan MN. RNA Interference in the Age of CRISPR: Will CRISPR Interfere with RNAi? Int J Mol Sci. 2016;17(3):291.
187. Vojta A, Dobrinić P, Tadić V, Bočkor L, Korać P, Julg B, Klasić M, Zoldoš V. Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. Nucleic Acids Res. 2016;44:5615-28.
188. Pagliarini R, Shao W, Sellers WR. Oncogene addiction: pathways of therapeutic response, resistance, and road maps toward a cure. EMBO Rep. 2015;16(3):280-96.

189. Phalon C, Rao DD, Nemunaitis J. Potential use of RNA interference in cancer therapy. Expert Rev Mol Med. 2010;12:e26.
190. Xin Y, Huang M, Guo WW, Huang Q, Zhang LZ, Jiang G. Nano-based delivery of RNAi in cancer therapy. Mol Cancer. 2017;16(1):134.
191. Schultheis B, Strumberg D, Santel A, Vank C, Gebhardt F, Keil O, et al. First-in-human phase I study of the liposomal RNA interference therapeutic Atu027 in patients with advanced solid tumors. J Clin Oncol. 2014;32(36):4141-8.
192. Downs KM, Gardner RL. An investigation into early placental ontogeny: allantoic attachment to the chorion is selective and developmentally regulated. Development. 1995;121(2):407-16.
193. Tam PP. Postimplantation mouse development: whole embryo culture and micro-manipulation. Int J Dev Biol. 1998;42(7):895-902.
194. Nicholas JS, Rudnick D. The Development of Rat Embryos in Tissue Culture. Proc Natl Acad Sci U S A. 1934;20(12):656-8.
195. Deuchar EM. The mechanism of axial rotation in the rat embryo: an experimental study in vitro. J Embryol Exp Morphol. 1971;25(2):189-201.
196. Deuchar E. Regeneration of amputated limb-buds in early rat embryos. J Embryol Exp Morphol. 1976;35(2):345-54.
197. New DA, Coppola PT, Terry S. Culture of explanted rat embryos in rotating tubes. J Reprod Fertil. 1973;35(1):135-8.
198. New DA. Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. Biol Rev Camb Philos Soc. 1978;53(1):81-122.
199. Steele CE, New DA. Serum variants causing the formation of double hearts and other abnormalities in explanted rat embryos. J Embryol Exp Morphol. 1974;31(3):707-19.
200. Sanyal MK, Naftolin F. In vitro development of the mammalian embryo. J Exp Zool. 1983;228(2):235-51.
201. Cockroft DL. Growth and proliferation in mouse parietal yolk sac during whole embryo culture. J Reprod Fertil. 1987;81(2):575-81.
202. Tam PP, Snow MH. The in vitro culture of primitive-streak-stage mouse embryos. J Embryol Exp Morphol. 1980;59:131-43.
203. Lawson KA, Pedersen RA. Cell fate, morphogenetic movement and population kinetics of embryonic endoderm at the time of germ layer formation in the mouse. Development. 1987;101(3):627-52.

204. Lawson KA, Meneses JJ, Pedersen RA. Cell fate and cell lineage in the endoderm of the presomite mouse embryo, studied with an intracellular tracer. Dev Biol. 1986;115(2):325-39.
205. Lawson KA, Meneses JJ, Pedersen RA. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. Development. 1991;113(3):891-911.
206. Sadler TW, New DA. Culture of mouse embryos during neurulation. J Embryol Exp Morphol. 1981;66:109-16.
207. Cuthbertson RA, Beck F. Postimplantation whole embryo culture: a new method for studying ocular development. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1990;31(8):1653-6.
208. Webster WS, Brown-Woodman PD, Ritchie HE. A review of the contribution of whole embryo culture to the determination of hazard and risk in teratogenicity testing. Int J Dev Biol. 1997;41(2):329-35.
209. Škreb N, Švajger A. Histogenetic capacity of rat and mouse embryonic shields cultivatedin vitro. Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org. 1973;173(3):228-34.
210. Bulić-Jakus F, Ulamec M, Vlahović M, Sincić N, Katusić A, Jurić-Lekić G, et al. Of mice and men: teratomas and teratocarcinomas. Coll Antropol. 2006;30(4):921-4.
211. Kittler R, Surendranath V, Heninger AK, Slabicki M, Theis M, Putz G, et al. Genome-wide resources of endoribonuclease-prepared short interfering RNAs for specific loss-of-function studies. Nat Methods. 2007;4(4):337-44.
212. Yang D, Buchholz F, Huang Z, Goga A, Chen CY, Brodsky FM, et al. Short RNA duplexes produced by hydrolysis with Escherichia coli RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(15):9942-7.
213. Kittler R, Heninger AK, Franke K, Habermann B, Buchholz F. Production of endoribonuclease-prepared short interfering RNAs for gene silencing in mammalian cells. Nat Methods. 2005;2(10):779-84.
214. Buljubašić R, Buljubašić M, Bojanac AK, Ulamec M, Vlahović M, Ježek D, et al. Epigenetics and testicular germ cell tumors. Gene. 2018;661:22-33.
215. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985;150(1):76-85.
216. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-5.
217. Vaissière T, Hung RJ, Zaridze D, Moukeria A, Cuenin C, Fasolo V, et al. Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. Cancer Res. 2009;69(1):243-52.

218. Theis M, Buchholz F. MISSION esiRNA for RNAi screening in mammalian cells. J Vis Exp. 2010(39).

219. Muzic V, Katusic Bojanac A, Juric-Lekic G, Himelreich M, Tupek K, Serman L, et al. Epigenetic drug 5-azacytidine impairs proliferation of rat limb buds in an organotypic model-system in vitro. Croat Med J. 2013;54(5):489-95.

220. Sobočan N, Katušić Bojanac A, Sinčić N, Himelreich-Perić M, Krasić J, Majić Ž, et al. A Free Radical Scavenger Ameliorates Teratogenic Activity of a DNA Hypomethylating Hematological Therapeutic. Stem Cells Dev. 2019;28(11):717-33.

221. Kornicka K, Marycz K, Marędziak M, Tomaszewski KA, Nicpoń J. The effects of the DNA methyltranfserases inhibitor 5-Azacitidine on ageing, oxidative stress and DNA methylation of adipose derived stem cells. J Cell Mol Med. 2017;21(2):387-401.

222. Serman L, Vlahović M, Sijan M, Bulić-Jakus F, Serman A, Sincić N, et al. The impact of 5-azacytidine on placental weight, glycoprotein pattern and proliferating cell nuclear antigen expression in rat placenta. Placenta. 2007;28(8-9):803-11.

223. Oing C, Verem I, Mansour WY, Bokemeyer C, Dyshlovoy S, Honecker F. 5-Azacitidine Exerts Prolonged Pro-Apoptotic Effects and Overcomes Cisplatin-Resistance in Non-Seminomatous Germ Cell Tumor Cells. Int J Mol Sci. 2018;20(1).

224. Zhou Y, Song N, Li X, Han Y, Ren Z, Xu JX, et al. Changes in the methylation status of the Oct3/4, Nanog, and Sox2 promoters in stem cells during regeneration of rat tracheal epithelium after injury. Oncotarget. 2017;8(2):2984-94.

225. Chen H, Jin K, Song J, Zuo Q, Yang H, Zhang Y, et al. Functional characterization of the Sox2, c-Myc, and Oct4 promoters. J Cell Biochem. 2019;120(1):332-42.

226. Headley KM, Kedziora KM, Alejo A, Lai EZ, Purvis JE, Hathaway NA. Chemical screen for epigenetic barriers to single allele activation of Oct4. Stem Cell Res. 2019;38:101470.

227. Reichman M, Penman S. The mechanism of inhibition of protein synthesis by 5-azacytidine in HeLa cells. Biochim Biophys Acta. 1973;324(2):282-9.

228. Geyer KK, Munshi SE, Vickers M, Squance M, Wilkinson TJ, Berrar D, et al. The anti-fecundity effect of 5-azacytidine (5-AzaC) on Schistosoma mansoni is linked to dis-regulated transcription, translation and stem cell activities. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2018;8(2):213-22.

229. Costa JJDN, de Souza GB, Bernardo JMP, Ribeiro RP, Passos JRS, Bezerra FTG, et al. Expression of markers for germ cells and oocytes in cow dermal fibroblast treated with 5-azacytidine and cultured in differentiation medium containing BMP2, BMP4 or follicular fluid. Zygote. 2017;25(3):341-57.

230. Chandrakanthan V, Yeola A, Kwan JC, Oliver RA, Qiao Q, Kang YC, et al. PDGF-AB and 5-Azacytidine induce conversion of somatic cells into tissue-regenerative multipotent stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(16):E2306-15.

231. Rachel K, Pathak S, Moorthi A, Narasimhan S, Murugesan R, Narayan S. 5-Azacytidine incorporated polycaprolactone-gelatin nanoscaffold as a potential material for cardiomyocyte differentiation. J Biomater Sci Polym Ed. 2019:1-18.

232. Gailhouste L, Liew LC, Yasukawa K, Hatada I, Tanaka Y, Nakagama H, et al. Differentiation Therapy by Epigenetic Reconditioning Exerts Antitumor Effects on Liver Cancer Cells. Mol Ther. 2018;26(7):1840-54.

233. Spartalis E, Athanasiadis DI, Chrysikos D, Spartalis M, Boutzios G, Schizas D, et al. Histone Deacetylase Inhibitors and Anaplastic Thyroid Carcinoma. Anticancer Res. 2019;39(3):1119-27.

234. Schnekenburger M, Dicato M, Diederich MF. Anticancer potential of naturally occurring immunoepigenetic modulators: A promising avenue? Cancer. 2019;125(10):1612-28.

235. De Souza C, Chatterji BP. HDAC Inhibitors as Novel Anti-Cancer Therapeutics. Recent Pat Anticancer Drug Discov. 2015;10(2):145-62.

236. Zhang H, Zhao X, Liu H, Jin H, Ji Y. Trichostatin A inhibits proliferation of PC3 prostate cancer cells by disrupting the EGFR pathway. Oncol Lett. 2019;18(1):687-93.

237. Han B, Li J, Li Z, Guo L, Wang S, Liu P, et al. Trichostatin A stabilizes the expression of pluripotent genes in human mesenchymal stem cells during ex vivo expansion. PLoS One. 2013;8(11):e81781.

238. Tada S, Era T, Furusawa C, Sakurai H, Nishikawa S, Kinoshita M, et al. Characterization of mesendoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture. Development. 2005;132(19):4363-74.

239. Zhang B, Wang J, Wang X, Zhu J, Liu Q, Shi Z, et al. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. Nature. 2014;513(7518):382-7.

240. Shen Z, Liao X, Shao Z, Feng M, Yuan J, Wang S, et al. Short-term stimulation with histone deacetylase inhibitor trichostatin a induces epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma cells without increasing cell invasion ability. BMC Cancer. 2019;19(1):262.

241. Halaburková A, Jendželovský R, Kovaľ J, Herceg Z, Fedoročko P, Ghantous A. Histone deacetylase inhibitors potentiate photodynamic therapy in colon cancer cells marked by chromatin-mediated epigenetic regulation of. Clin Epigenetics. 2017;9:62.

242. Goey AK, Sissung TM, Peer CJ, Figg WD. Pharmacogenomics and histone deacetylase inhibitors. Pharmacogenomics. 2016;17(16):1807-15.

243. Lin T, Ren Q, Zuo W, Jia R, Xie L, Lin R, et al. Valproic acid exhibits anti-tumor activity selectively against EGFR/ErbB2/ErbB3-coexpressing pancreatic cancer via induction of ErbB family members-targeting microRNAs. J Exp Clin Cancer Res. 2019;38(1):150.

244. Sun J, Piao J, Li N, Yang Y, Kim KY, Lin Z. Valproic acid targets HDAC1/2 and HDAC1/PTEN/Akt signalling to inhibit cell proliferation via the induction of autophagy in gastric cancer. FEBS J. 2019.

245. Lee SH, Nam HJ, Kang HJ, Samuels TL, Johnston N, Lim YC. Valproic acid suppresses the self-renewal and proliferation of head and neck cancer stem cells. Oncol Rep. 2015;34(4):2065-71.

246. Coskun E, Ercin M, Gezginci-Oktayoglu S. The Role of Epigenetic Regulation and Pluripotency-Related MicroRNAs in Differentiation of Pancreatic Stem Cells to Beta Cells. J Cell Biochem. 2018;119(1):455-67.

247. La Noce M, Paino F, Mele L, Papaccio G, Regad T, Lombardi A, et al. HDAC2 depletion promotes osteosarcoma's stemness both in vitro and in vivo: a study on a putative new target for CSCs directed therapy. J Exp Clin Cancer Res. 2018;37(1):296.

248. Zhang S, Tang Z, Qing B, Tang R, Duan Q, Ding S, et al. Valproic acid promotes the epithelial-to-mesenchymal transition of breast cancer cells through stabilization of Snail and transcriptional upregulation of Zeb1. Eur J Pharmacol. 2019;865:172745.

249. Rempel E, Hoelting L, Waldmann T, Balmer NV, Schildknecht S, Grinberg M, et al. A transcriptome-based classifier to identify developmental toxicants by stem cell testing: design, validation and optimization for histone deacetylase inhibitors. Arch Toxicol. 2015;89(9):1599-618.

250. Arvidsson Y, Johanson V, Pfragner R, Wängberg B, Nilsson O. Cytotoxic Effects of Valproic Acid on Neuroendocrine Tumour Cells. Neuroendocrinology. 2016;103(5):578-91.

251. Lo WL, Chien Y, Chiou GY, Tseng LM, Hsu HS, Chang YL, et al. Nuclear localization signal-enhanced RNA interference of EZH2 and Oct4 in the eradication of head and neck squamous cell carcinoma-derived cancer stem cells. Biomaterials. 2012;33(14):3693-709.

252. Villodre ES, Felipe KB, Oyama MZ, Oliveira FH, Lopez PLDC, Solari C, et al. Silencing of the transcription factors Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc or Nanog has different effect on teratoma growth. Biochem Biophys Res Commun. 2019;517(2):324-9.

253. Liang C, Xu Y, Ge H, Li G, Wu J. Clinicopathological and prognostic significance of OCT4 in patients with hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. Onco Targets Ther. 2018;11:47-57.

254. Lin H, Sun LH, Han W, He TY, Xu XJ, Cheng K, et al. Knockdown of OCT4 suppresses the growth and invasion of pancreatic cancer cells through inhibition of the AKT pathway. Mol Med Rep. 2014;10(3):1335-42.

255. Mirzaei MR, Najafi A, Arababadi MK, Asadi MH, Mowla SJ. Altered expression of apoptotic genes in response to OCT4B1 suppression in human tumor cell lines. Tumour Biol. 2014;35(10):9999-10009.

256. Shi G, Jin Y. Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. Stem Cell Res Ther. 2010;1(5):39.

257. Johari B, Zargan J. Simultaneous targeted inhibition of Sox2-Oct4 transcription factors using decoy oligodeoxynucleotides to repress stemness properties in mouse embryonic stem cells. Cell Biol Int. 2017;41(12):1335-44.

258. Hadjimichael C, Chanoumidou K, Papadopoulou N, Arampatzi P, Papamatheakis J, Kretsovali A. Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells. World J Stem Cells. 2015;7(9):1150-84.

259. Gong S, Li Q, Jeter CR, Fan Q, Tang DG, Liu B. Regulation of NANOG in cancer cells. Mol Carcinog. 2015;54(9):679-87.

260. Sheikine Y, Genega E, Melamed J, Lee P, Reuter VE, Ye H. Molecular genetics of testicular germ cell tumors. Am J Cancer Res. 2012;2(2):153-67.

261. Kang KT, Kwon YW, Kim DK, Lee SI, Kim KH, Suh DS, et al. TRRAP stimulates the tumorigenic potential of ovarian cancer stem cells. BMB Rep. 2018;51(10):514-9.

262. Wang J, Shan M, Liu T, Shi Q, Zhong Z, Wei W, et al. Analysis of TRRAP as a Potential Molecular Marker and Therapeutic Target for Breast Cancer. J Breast Cancer. 2016;19(1):61-7.

263. Sawan C, Hernandez-Vargas H, Murr R, Lopez F, Vaissière T, Ghantous AY, et al. Histone acetyltransferase cofactor Trrap maintains self-renewal and restricts differentiation of embryonic stem cells. Stem Cells. 2013;31(5):979-91.

8 ŽIVOTOPIS

Robert Buljubašić rođen je 19. svibnja 1975. u Splitu. Nakon završene Prirodoslovno-matematičke gimnazije u Splitu studirao je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci na kojem je diplomirao 2001. godine i stekao zvanje doktora medicine. Nakon odrađenog vojnog roka i pripravničkog staža radio je kao liječnik hitne medicine (UHMP) te u ambulantama obiteljske medicine i pedijatrije unutar primarne zdravstvene zaštite. Specijalizirao je opću kirurgiju 2010. godine na Klinici za kirurgiju Kliničke bolnice Dubrava te stekao zvanje specijalista opće kirurgije. Subspecijalizaciju je završio 2015. godine prema programu MZRH, te stekao zvanje subspecijalista traumatologije. Sukladno smjernicama EU dodatno se usavršavao u skladu s programom MZRH, te 2016. godine postao specijalist opće kirurgije i ortopedije, subspecijalist traumatolog. Sudjelovao je na mnogobrojnim stručnim edukacijama u zemlji i inozemstvu, te aktivno i svakodnevno sudjeluje u praktičnoj nastavi studenata, specijalizanata i subspecijalizanata. Godine 2017. dodijeljena mu je nagrada „Naj doktor“ od strane Udruge pacijenata Republike Hrvatske. Aktivno sudjeluje u znanstvenom radu kao doktorand Centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u okviru kojega je autor niza stručnih i znanstvenih publikacija u indeksiranim časopisima te sažetaka predstavljenih na nacionalnim i međunarodnim kongresima.